

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАЙКОВИЧ ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 675.043.82; 675.043.84; 675.043.6; 66.095.26

ДИСЕРТАЦІЯ

**Гідрогелеві желатинвмісні матеріали для медичних застосувань:
синтез та дослідження**

Спеціальність 102 *Хімія*
Галузь знань 10 *Природничі науки*

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ О.В. Майкович

Науковий керівник

Варваренко Сергій Миколайович, д. х. н., професор

Львів – 2025

АНОТАЦІЯ

Майкович О. В. Гідрогелеві желатинвмісні матеріали для медичних застосувань: синтез та дослідження. - Кваліфікована наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 102 Хімія. – Національний університет «Львівська політехніка», Міністерство освіти та науки України, Львів, 2025.

Дисертаційна робота присвячена розробленню методів одержання та визначення параметрів синтезу гідрогелевих матеріалів на основі полімерів природнього походження (желатину, альгілату натрію) та олігомерних структуруючих агенів на основі поліетиленгліколю, які можуть бути одержані в одну стадію та не потребують застосування регуляторів водневого показника та додаткових ініціаторів.

У вступній частині обґрунтовано важливість та актуальність обраної теми, продемонстровано взаємозв'язок із науковими програмами та пріоритетними напрямками досліджень кафедри органічної хімії і сучасними науковими тенденціями в галузі. Сформульовано мету та конкретні завдання дослідження, визначено наукову новизну роботи та зроблено аналіз практичного потенціалу отриманих результатів. Зазначено інформацію про особистий внесок автора та відомості про апробацію результатів дослідження (публікації, конференції). Вказано обсяг та структуру дисертації.

У першому розділі проаналізовано класифікацію гідрогелів з урахуванням різних критеріїв. Розглянуто природні полімери, що найчастіше застосовуються для синтезу гідрогелів, та охарактеризовано їх властивості як ключових компонентів у створенні нових медичних і терапевтичних матеріалів. Особливу увагу приділено використанню таких природних полімерів як желатин та альгілат натрію, які характеризуються власною біологічною активністю в процесах загоєння ран.

Перелічено основні методи фізичного та хімічного структурування гідрогелів, а також їхні переваги, обмеження та можливі сфери використання. Окреслено основні вимоги до гідрогелів медичного призначення.

Окрему увагу приділено ефективності застосування гідрогелів із контрольованим вивільненням активних речовин для ранових покриттів.

На підставі аналізу досягнень у галузі розробки гідрогелевих матеріалів зроблено висновки, щодо перспектив їхнього подальшого вдосконалення завдяки надання їм спеціальних функціональних властивостей. На завершення, на основі проведеного літературного огляду, визначено мету дисертаційного дослідження.

У другому розділі наведено опис вихідних речовин та матеріалів, застосованих у дослідженні, викладено методи синтезу зразків гідрогелів та експериментальні підходи. Окрім цього, вказано статистичні методи обробки даних, які були використані у дисертаційній роботі.

У третьому розділі системно досліджено процеси синтезу та структурування гідрогелів на основі желатину з використанням дигліцидилових етерів поліоксиетиленгліколю (PEGDE) різної молекулярної маси (300-2100 г/моль). Встановлено ключові закономірності:

1) Синтез та характеристика структуруючих агентів: оптимізовано методику синтезу PEGDE з виходом 80-90 %; методами FTIR та NMR підтверджено формування епоксидних груп; структуруючий агент PEGDE 500 (на основі ПЕГ-400) виявлено як оптимальний агент за критеріями реакційної здатності (98-99 % епоксидних груп), економічної доцільності та безпечності.

2) Кінетичні закономірності гідролізу PEGDE500 у водному середовищі: доведено псевдоперший порядок реакції гідролізу ($R^2 > 0.93$); розраховано енергію активації ($95.0 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$), що підтверджує відносну стабільність епоксидних сполук за відсутності каталізаторів (повна конверсія гідролізу досягається через 12 год, при 80°C), що виключає суттєві втрати агента під час структурування.

3) Механізм структурування желатину: основним типом взаємодії є реакція ϵ -аміногруп лізину (вміст у желатині 4 %) з епоксидами; за умов рН 5.5-6.5 (близько до ІЕТ желатину) без додаткових каталізаторів переважає утворення β -гідроксиамінів; запропоновано триетапну модель гелеутворення: ковалентне зшивання агрегатів макромолекул $\rightarrow$ формування мікрогелів $\rightarrow$ утворення макроскопічної сітки.

4) Оптимізація параметрів синтезу: задовільні значення гель-фракції (близько 70-80 %) досягаються при використанні структуруючого на основі поліетиленгліколю-400 (PEGDE 500) і при співвідношеннях PEGDE 500 до желатину від 1:2 до 1:5; DLS-аналіз виявив зростання розмірів частинок з 25 нм до 190 нм за 2 год, що корелює з даними віскозиметрії (час гелювання 102-128 хв при 80 °C).

Вперше кількісно оцінено вплив молекулярної маси PEGDE на структуру гідрогелів (оптимум для PEGDE 500). Встановлено оптимальний час синтезу (4-5 год), що забезпечує баланс між ступенем структурування та стабільністю гідрогелевої матриці. За розробленим методом при використанні PEGDE 500 отримуються стабільні желатинвмісні гідрогелі.

У четвертому розділі представлено результати синтезу та комплексного дослідження властивостей желатинових гідрогелів, структурованих діоксирановим похідним поліетиленгліколю (PEGDE 500). Основні результати:

1) Синтез гідрогелів: оптимальне співвідношення PEGDE 500 : желатин = 1:5 забезпечує максимальну гель-фракцію, міцність та стабільність при температурі тіла (37 °C), метод не вимагає додаткових каталізаторів, регуляторів рН та додаткових стадій очистки, що суттєво спрощує технологію їх отримання.

2) Фізико-хімічні властивості:

- Механічна міцність: максимальне зусилля стиснення досягається для зразків гідрогелів отриманих при співвідношенні PEGDE 500:желатин як 1:5; гідрогелі не руйнуються навіть при деформації до 80 %, зберігають еластичність і відновлюють форму після знімання навантаження.

- Ступінь набрякання у фізіологічному розчині та модельному ексудаті становить 30 – 45 г/дм² гідрогелевого матеріалу при товщині зразка 4 мм залежно від складу. Найнижчі значення набрякання спостерігаються для зразка 1:5, що добре корелює з його найвищими гель-фракцією і фізико-механікою та найменшими розмірами пор.

- Термічна стабільність: при тому що структуровані зразки желатину зберігають формостійкість при нагріванні за даними DSC-аналізу виявлено температурні переходи, які свідчать про наявність фази желатину у структурі гідрогелю; в результаті утворення ковалентно зв'язаних макромолекул спостерігається підвищення температури фазового переходу у структурованих гідрогелів (до 34 °C) порівняно з неструктурованим желатином (31.5 °C).

3) Морфологія та структура: IR-спектроскопією підтверджено утворення ковалентних зв'язків між желатином і PEGDE 500; пористість визначена за SEM-аналізом становить 7 – 25 мкм, що може сприяти поглинанню ранових виділень і міграції клітин.

4) Біологічна сумісність:

- Цитотоксичність: гідрогелі не виявляють токсичності *in vitro*, що підтверджує їх безпеку для живих клітин.

- Ферментативна деградація: структуровані гідрогелі руйнуються повільніше (залишається 40 % полімерів після 24 год) порівняно з неструктурованим желатином (8 %).

5) Контрольоване вивільнення ліків: вивільнення лідокаїну, новокаїну та диклофенаку описується моделлю Хігучі ($R^2 > 0.9$) з механізмом квазі-Фікової дифузії ($n < 0.5$); хлоргексидин зі складу гідрогелю ефективно пригнічує ріст *S. aureus* (радіус зони інгібування 10–12.5 мм) та *E. coli* (15–17.5 мм).

Запропонований метод синтезу желатинових гідрогелів із PEGDE 500 є перспективним для створення біомедичних матеріалів, зокрема ранових пов'язок. Гідрогелі демонструють високу механічну стабільність при фізіологічних умовах, контрольовану деградацію та вивільнення ліків, біосумісність та антимікробну активність.

У п'ятому розділі проведено комплексну характеристику синтезованих желатин-альгінатних гідрогелевих систем із використанням сучасних фізико-хімічних методів. Отримані результати встановлюють чіткі кореляції між умовами синтезу та властивостями матеріалів. Основні результати і ключові відмінності від желатинових гідрогелів:

1) Склад та структура:

- одержано нову систему за рахунок комбінації желатину з альгінатом натрію, визначено оптимальне співвідношення між біополімерами (10:1) за якого утворюється водорозчинний поліелектролітний комплекс структурування якого діоксирановим структуруючим агентом дозволяє отримувати гідрогелі;

- основною перевагою такої системи є зниження загальної концентрації полімерів у вихідній суміші з 18 % до 12 % при збереженні гелеутворення, і також розширення діапазону співвідношень при отриманні формостійких гідрогелевих матеріалів (1:2 – 1:15 для PEGDE 500 до желатин-альгінатної суміші);

2) Фізико-механічні властивості:

- механічна міцність: максимальне зусилля стиснення 34 кПа (PEGDE 500:желатин-альгінатна основа як 1:8, концентрація полімерів у гідрогелі 12 %) при 20 °C і 12 кПа при 37 °C;

- термостабільність: зразки 12 % (за включеними полімерами) гідрогелю зберігають фізико-механічні властивості при 37 °C на рівні структурованого желатинового гідрогелю з вмістом полімерів 18 %, а за DSC-аналізом фазовий перехід виявлений при температурі 34.1°C;

- реологічні залежності: модуль зберігання (G') для желатин-альгінатних гідрогелів досягає 9100 Па ($T = 25\text{ °C}$), що на 20 % вище за аналогічно отримані гідрогелі структурованого желатину;

3) Ступінь набрякання синтезованих гідрогелів у всіх досліджуваних середовищах (60-90 г в перерахунку на 1 дм² гідрогелевого матеріалу товщиною 4 мм) є задовільним для того, щоб поглинати ранові виділення;

4) Вивільнення ліків: процеси вивільнення препаратів найбільшою мірою відповідають моделі Хігучі ($R^2 > 0,93$), значення показника вивільнення ($n < 0.5$) для лідокаїну гідрохлориду та новокаїну, отримані з моделі Корсмейєра–Пепаса, вказують що процес контролюється квазі-Фіковою дифузією. Для диклофенаку показник дифузії $n > 0.5$, що вказує на аномальний механізм вивільнення препарату; гідрогелі з хлоргексидином ефективно гальмують ріст мікроорганізмів *S. aureus* (зона інгібування 7.3–9.8 мм) та *E. coli* (12.9–16.5 мм).

Введення альгінату натрію до складу гідрогелів у порівнянні з желатиновими гідрогелями мало позитивний вплив на властивості матеріалу, зокрема дозволило зберегти їх фізико-механічні властивості при зменшенні концентрації преполімерів у вихідній композиції з 18 до 12 % та, водночас, підвищило стійкість до ферментативної деградації одержаних зразків.

У шостому розділі розглянуто окремі напрямки практичного застосування комбінованих гідрогелевих систем при використанні водорозчинного багатоцентрового структуруючого агента - полі-N-гідроксиметилоакриламід. Основні результати:

1) Поліакриламід-желатинові гідрогелі для ветеринарії: визначено оптимальний склад для синтезу систем з 12-14 % з вмістом полімерів (поліакриламід, полі-N-гідроксиметилоакриламід, желатин у співвідношенні 4.9:7:2.1) та визначено умови ($T = 60-70\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 2$; $t = 12\text{ год}$). Отримані зразки гідрогелів досягають міцності при випробуванні на стиск до 24 МПа, що майже на порядок переважає желатинові та желатин – альгінатні гідрогелі, і при тому зберігають здатність до набрякання ($18-36\text{ г}_{\text{води}}/\text{г}_{\text{полімерів}}$).

2) Отримані армовані гідрогелі з поліпропіленовою сіткою, двошарові гідрогелі: введення армуючих елементів в гідрогелеву матрицю дозволило одержати двошаровий матеріал (нижній шар: армований поліакриламідний гідрогель (механічна основа) та верхній шар: желатиновий гідрогель, ковалентно зв'язаний з нижнім шаром), що забезпечило поєднання високої міцності з біосумісністю.

3) рН-чутливі поліакриламідні гідрогелі для діагностики: введення флуоресцеїновмісних кополієстерів (GluLa-PEG1000-F, GluLa-PEG1500-F) надало гідрогелям чутливість до рН. Оптичні властивості: лінійна залежність оптичної густини від рН у діапазоні 4.0–9.2, дозволяє використовувати їх як дешеві та точні сенсори для медичної діагностики.

Поліакриламід-желатинові гідрогелі з армованою сіткою є перспективними для лікування ран у тварин, поєднуючи міцність, гідрофільність та пролонговану деградацію. рН-чутливі гідрогелі на основі флуоресцеїну пропонують простий метод моніторингу ранових процесів. Розроблені системи можуть вирішувати проблеми традиційних пов'язок (часті зміни, больові відчуття) та комерційних аналогів (низька механічна міцність). Технологія синтезу придатна для промислового виробництва.

Ключові слова: гідрогель, полімери, желатин, альгінат натрію, поліакриламід, структурування, полімеризація, поліетиленгліколь дигліцидил етер, синтез, гідроліз, гібридні композити, коефіцієнт дифузії, системи доставки, ранові покриття, вивільнення препаратів, антимікробна активність.

ABSTRACT

Maikovych O. V. Hydrogel gelatin-containing materials for medical applications: synthesis and characterisation. – Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation for the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 102 Chemistry. - Lviv Polytechnic National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2025.

The dissertation is devoted to the development of methods for obtaining and determining the synthesis parameters of hydrogel materials based on natural polymers (gelatin, sodium alginate) and oligomeric structuring agents derived from polyethylene glycol, which can be obtained in a single step without requiring pH regulators or additional initiators.

In the introductory section, the importance and relevance of the chosen topic are substantiated, demonstrating its connection with scientific programs and priority research directions of the Department of Organic Chemistry, as well as modern scientific trends in the field. The research objectives and specific tasks are formulated, the scientific novelty of the work is defined, and the practical potential of the obtained results is analyzed. Information on the author's personal contribution and the validation of research results (publications, conferences) is provided. The volume and structure of the dissertation are outlined.

The first section analyzes the classification of hydrogels based on various criteria. Natural polymers most commonly used for hydrogel synthesis are reviewed, and their properties as key components in the development of new medical and therapeutic materials are characterized. Special attention is given to natural polymers such as gelatin and sodium alginate, which exhibit inherent biological activity in wound healing processes.

The main methods of physical and chemical structuring of hydrogels are listed, along with their advantages, limitations, and potential applications. Key requirements for medical hydrogels are outlined. Particular emphasis is placed on the effectiveness of hydrogels with controlled release of active substances for wound dressings.

Based on an analysis of advancements in hydrogel material development, conclusions are drawn regarding the prospects for their further improvement by endowing them with special functional properties. Finally, the objective of the dissertation research is defined based on the literature review.

In the second section, the initial substances and materials used in the study are described, along with the methods for synthesizing hydrogel samples and experimental approaches. Additionally, the statistical data processing methods employed in the dissertation are specified.

The third section systematically investigates the synthesis and structuring processes of gelatin-based hydrogels using diglycidyl ethers of polyoxyethylene glycol (PEGDE) of varying molecular weights (300–2100 g/mol). Key findings include:

1. Synthesis and characterization of structuring agents:
 - The synthesis of PEGDE was optimized with a yield of 80 – 90 %.
 - FTIR and NMR confirmed the formation of epoxy groups.
 - PEGDE 500 (based on PEG-400) was identified as the optimal agent in terms of reactivity (98–99% epoxy groups), cost-effectiveness, and safety.
2. Kinetics of PEGDE500 hydrolysis in an aqueous medium:
 - Pseudo-first-order hydrolysis kinetics ($R^2 > 0.93$) were established.
 - The activation energy ($95.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) confirmed the relative stability of epoxy compounds in the absence of catalysts (complete hydrolysis conversion achieved after 12 h at 80 °C), minimizing agent loss during structuring.
3. Mechanism of gelatin structuring:
 - The primary interaction involves the reaction between ϵ -amino groups of lysine (4% content in gelatin) and epoxy groups.
 - At pH 5.5–6.5 (near gelatin's IEP), β -hydroxyamines formation dominates without additional catalysts.
 - A three-stage gelation model was proposed: covalent crosslinking of macromolecular aggregates $\rightarrow$ microgel formation $\rightarrow$ macroscopic network formation.
4. Optimization of synthesis parameters:

- Satisfactory gel fraction values (~70–80%) were achieved using PEGDE 500 (PEG-400-based) at PEGDE 500-to-gelatin ratios of 1:2 to 1:5.

- DLS analysis showed particle size growth from 25 nm to 190 nm over 2 h, correlating with viscometry data (gelation time: 102–128 min at 80 °C).

For the first time, the influence of PEGDE molecular weight on hydrogel structure was quantitatively assessed (optimum for PEGDE 500). The optimal synthesis time (4–5 h) was established, ensuring a balance between crosslinking degree and hydrogel matrix stability. Stable gelatin-containing hydrogels were obtained using PEGDE 500.

The fourth section presents the synthesis and comprehensive characterization of gelatin hydrogels structured with PEGDE 500. Key results:

1. Hydrogel synthesis:

- Optimal PEGDE 500-to-gelatin ratio (1:5) ensured maximum gel fraction, strength, and stability at body temperature (37 °C).

- No additional catalysts, pH regulators, or purification steps were required, simplifying production.

2. Physicochemical properties:

- Mechanical strength: Maximum compression resistance was observed in 1:5 hydrogels, which remained elastic even at 80% deformation.

- Swelling: Swelling in physiological and model exudate solutions was 30–45 g/dm² (4 mm thickness), with the lowest swelling in 1:5 hydrogels due to higher gel fraction and smaller pore size.

- Thermal stability: DSC revealed phase transitions indicating gelatin presence in hydrogels; covalent crosslinking increased transition temperature to 34 °C (vs. 31.5 °C for non-crosslinked gelatin).

3. Morphology and structure:

- IR spectroscopy confirmed covalent bonds between gelatin and PEGDE 500.

- SEM showed porosity of 7–25 µm, facilitating wound exudate absorption and cell migration.

4. Biocompatibility:

- Cytotoxicity: Hydrogels showed no in vitro toxicity.

- Enzymatic degradation: Crosslinked hydrogels degraded slower (40 % polymer remaining after 24 h) than non-crosslinked gelatin (8 %).

5. Controlled drug release:

- Lidocaine, novocaine, and diclofenac release followed the Higuchi model ($R^2 > 0.9$) with quasi-Fickian diffusion ($n < 0.5$).

- Chlorhexidine-loaded hydrogels inhibited *S. aureus* (10 – 12.5 mm inhibition zone) and *E. coli* (15 – 17.5 mm).

The proposed PEGDE 500-based gelatin hydrogel synthesis is promising for biomedical materials, particularly wound dressings, offering mechanical stability, controlled degradation/drug release, biocompatibility, and antimicrobial activity.

The fifth section provides a comprehensive characterization of gelatin-alginate hydrogels. Key differences from gelatin-only hydrogels:

1. Composition and structure:

- Optimal gelatin-to-alginate ratio (10:1) formed a water-soluble polyelectrolyte complex, allowing hydrogel formation at reduced polymer concentration (12% vs. 18% for gelatin-only).

2. Physicomechanical properties:

- Mechanical strength: Maximum compression resistance of 34 kPa (PEGDE 500-to-gelatin-alginate ratio 1:8, 12 % polymer content).

- Thermal stability: Phase transition at 34.1 °C (DSC).

- Rheology: Storage modulus (G') reached 9100 Pa (25 °C), 20 % higher than gelatin-only hydrogels.

3. Swelling: 60–90 g/dm² (4 mm thickness), suitable for wound exudate absorption.

4. Drug release:

- Lidocaine and novocaine followed Higuchi kinetics ($R^2 > 0.93$, quasi-Fickian diffusion, $n < 0.5$).

- Diclofenac exhibited anomalous release ($n > 0.5$).

- Chlorhexidine inhibited *S. aureus* (7.3–9.8 mm) and *E. coli* (12.9–16.5 mm).

Incorporating sodium alginate improved properties, allowing reduced polymer concentration (12 % vs. 18 %) while enhancing enzymatic degradation resistance.

The sixth section explores practical applications of combined hydrogel systems using a water-soluble multicentered structuring agent (poly-N-hydroxymethylolacrylamide). Key results:

1. Polyacrylamide-gelatin hydrogels for veterinary use: Optimal composition (12–14 % polymer content, polyacrylamide/poly-N-hydroxymethylolacrylamide/gelatin ratio 4.9:7:2.1) yielded hydrogels with 24 MPa compressive strength (10× higher than gelatin/alginate hydrogels) and swelling capacity (18–36 gwater/gpolymer).

2. Reinforced hydrogels: Polypropylene mesh-reinforced, bilayer hydrogels combined mechanical strength (polyacrylamide base) with biocompatibility (gelatin top layer).

3. pH-sensitive polyacrylamide hydrogels for diagnostics: Fluorescein-containing copolymers (GluLa-PEG1000-F, GluLa-PEG1500-F) enabled pH-dependent optical density changes (linear response at pH 4.0–9.2), suitable for medical sensors.

Polyacrylamide-gelatin reinforced hydrogels are promising for animal wound care, while pH-sensitive hydrogels offer simple wound monitoring. The developed systems address limitations of traditional dressings (frequent changes, pain) and commercial analogs (low strength). The synthesis technology is scalable for industrial production.

Keywords: hydrogel, polymers, gelatin, sodium alginate, polyacrylamide, crosslinking, polymerization, polyethylene glycol diglycidyl ether, synthesis, hydrolysis, hybrid composites, diffusion coefficient, drug delivery systems, wound dressings, drug release, antimicrobial activity.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових періодичних виданнях іноземних держав та у виданнях України, що індексовані в наукометричних базах даних (Scopus, Web of Science):

1. Maikovych, O., Pasetto, P., Nosova, N., Kudina, O., Ostapiv, D., Samaryk, V., & Varvarenko, S. (2025). Functional Properties of Gelatin–Alginate Hydrogels for Use in Chronic Wound Healing Applications. *Gels*, 11(3), 174. (Scopus Q1). <https://doi.org/10.3390/gels11030174>. *Особистий внесок: розроблення методики синтезу гідрогелів на основі желатину та альгінату натрію структурованих дигліцидиловим етером поліетиленгліколю-400, проведення експериментальних досліджень, обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації.*

2. Olha Maikovych, Nataliia Nosova, Nataliia Bukartyk, Nataliia Fihurka, Dmytro Ostapiv, Volodymyr Samaryk, Pamela Pasetto, Serhii Varvarenko (2023). Gelatin-based hydrogel with antiseptic properties: synthesis and properties. *Appl Nanosci.* (Scopus Q2). <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02956-6>. *Особистий внесок: розроблення методики синтезу гідрогелів на основі желатину, проведення експериментальних досліджень, обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації.*

3. Marta M. Bukartyk, Nataliia G. Nosova, Olha V. Maikovych, Nataliia M. Bukartyk, Anna V. Stasiuk, Iryna A. Dron, Nataliia V. Fihurka, Semen V. Khomyak, Dmytro D. Ostapiv, Vasyl V. Vlizlo, Volodymyr Ya. Samaryk, Serhii M. Varvarenko (2022). Preparation and research of properties of combined alginate/gelatin hydrogels. - *Journal of Chemistry and Technologies* (Scopus Q4). – 2022. – No. 1. – pp. 11-20. <https://doi.org/10.15421/jchemtech.v30i1.242230>. *Особистий внесок: обробка результатів дослідження, підготовка матеріалів до публікації.*

4. O.V. Maikovych, N.G. Nosova, M.V. Yakoviv, I.À. Dron, A.V. Stasiuk, V.Ya. Samaryk, S.M. Varvarenko, S.A. Voronov. Composite materials based on polyacrylamide and gelatin reinforced with polypropylene microfiber // *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*, 2021, No. 1, pp. 45-54 (Scopus Q4)

<http://dx.doi.org/10.32434/0321-4095-2021-134-1-45-54>. *Особистий внесок: синтез поліакриламід-желатинових гідрогелевих матеріалів, проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів до публікації.*

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Hnyp A. V., Bukartyk N. M., Maikovych O. V., Cherkas Y. V., Nosova N. G., Varvarenko S. M. Hydrogels based on natural polymers structured with propylene glycol diepoxide for drug delivery // Chemistry, Technology and Application of Substances. – 2024. – Vol. 7, № 2. – С. 176–183. *Особистий внесок: проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів до публікації.*

2. O.V. Maikovych, N.G. Nosova, Z.Ya. Nadashkevych, S.M. Varvarenko (2022). Preparation and research of gelatine hydrogel anti-bedsore materials properties // Journal "Chemistry, technology and application of substances". – 2022. – Vol. 5 , No. 1 , pp. 166-172. <https://doi.org/10.23939/ctas2022.01.166>. *Особистий внесок: синтез желатинових гідрогелів, проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів до публікації.*

3. O. V. Maikovych, I. A. Dron, N. M. Bukartyk, O. Yu. Bordeniuk, N. G. Nosova. Investigation of gel formation peculiarities and properties of hydrogels obtained by the structuring of acrylamide prepolymers // Journal "Chemistry, technology and application of substances". – 2021. – Vol. 4. – No. 1. – с. 179-185. <https://doi.org/10.23939/ctas2021.01.179>. *Особистий внесок: синтез преполімерів, синтез гідрогелів, проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів до публікації.*

4. N. G. Nosova, O. V. Maikovych, O. Yu. Bordeniuk, M. V. Yakoviv, S. M. Varvarenko. Reinforcement of alginate-gelatin hydrogel using functionalized polypropylene microfiber // Journal "Chemistry, technology and application of substances", Vol. 3, No. 1, 2020, с. 232-238. *Особистий внесок: функціоналізація поліпропіленового мікрОВОлокна, синтез гідрогелевих матеріалів, проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів до публікації.*

5. M. I. Nahorniak, A. V. Voronovska, M. V. Yakoviv, O. V. Maikovich, S. M. Varvarenko. Receipt features of polyacrylamide hydrogel dispersions filled with magnetite // Journal "Chemistry, technology and application of substances"-Vol. 2. Num.2 . 2019. С. 159-166. <http://dx.doi.org/10.23939/ctas2019.02.159>. *Особистий внесок: синтез поліакриламідних гідрогелів, підготовка матеріалів до публікації.*

6. O. V. Maikovich, N. G. Nosova, O. Yu. Bordenyuk, N. V. Fihurka, S. M. Varvarenko. Investigation of sorption / desorption processes of medical substances by combined hydrogels. // Journal "Chemistry, technology and application of substances" -Vol. 2. Num. 2. 2019. С.154-158. <http://dx.doi.org/10.23939/ctas2019.02.154>. *Особистий внесок: синтез комбінованих гідрогелів, проведення досліджень сорбції та вивільнення медикаментів, підготовка матеріалів до публікації.*

Список публікацій, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації. Тези доповідей та матеріали конференцій:

1. Maikovich O.V., Nosova N.G., Samaryk V.Y., Varvarenko S.M. XII International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO-2024). Section “Nanobiotechnology for health-care”, topic of poster presentation: “Hydrogel therapeutic materials based on natural polymers. Synthesis and study of properties”, 21 – 24 of August 2024, Uzhhorod, Ukraine, - P. 325.

2. Olha Maikovich, Nataliia Bukartyk, Yuliia Cherkas, Yuliia Kyrychuk, Volodymyr Samaryk, Serhii Varvarenko. «Hydrogels based on natural polymers and structured with propyleneglycol diepoxide for biomedical applications»/ XII International Scientific-Technical Conference “Advance in Petroleum and Gas Industry and Petrochemistry” (APGIP-12), Lviv Polytechnic National University, May 20-24, 2024 – P. 47

3. XI International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO-2023), Bukovel, Ukraine, from 16 to 19 August 2023. Section “Nanobiotechnology for health-care”, topic of poster presentation “Investigation of the properties and microstructure of gelatin-alginate hydrogels for

wound healing” (Authors: Olha Maikovych, Nataliia Nosova, Pamela Pasetto, Serhii Varvarenko)

4. 13th International Conference “Nanomaterials: Applications & Properties (IEEE NAP-2023)”, that was held in Bratislava, September 10-15, 2023 with the poster presentation titled “Functionalization of Silica Particles with Polyisoprene or Methacrylate Groups to Improve Macroscopic Mechanical Properties of Thick Elastomeric Films” (Authors: Olha Maikovych, Emilie Choppé, Anna Stasiuk, Serhii Varvarenko, Wasan Thaokotsee, Jean-Francois Bardeau, Pamela Pasetto)

5. International Scientific Conference "Modern Achievements in Food, Organic and Polymer Chemistry" is dedicated to the bright memory of Professor Stanislav Voronov, Lviv Polytechnic National University, Department of Organic Chemistry, Ukraine, from 24 to 26 October 2023. Section “Polymer Chemistry” with an oral presentation “Synthesis and properties of hybrid hydrogels based on gelatin structured by poly(ethylene) glycol diglycidylether” (Authors: Olha Maikovych, Nataliia Nosova, Dmytro Ostapiv, Pamela Pasetto, Volodymyr Samaryk, Serhii Varvarenko)

6. Olha Maikovych, Natalya Nosova, Natalya Bukartyk, Zoriana Nadashkevych, Serhii Varvarenko. Synthesis and study of properties of combined alginate/gelatin hydrogels. 65th International Conference For Students Of Physics And Natural Science "Open Readings 2022". March 15-18, 2022. Vilnius, Lithuania - P.392

7. Наталія Носова, Наталія Букартик, Ольга Майкович, Зоряна Надашкевич, Сергій Варваренко, Володимир Самарик. Дослідження процесів сорбції/десорбції знеболювальних речовин гідрогелевими пластинами. XI International Scientific-Technical Conference “Advance in Petroleum and Gas Industry and Petrochemistry” (APGIP-11). May 16-20, 2022. Lviv, Ukraine - P. 166-167

8. Майкович О.В., Ковальчук Д.О., Помилуйко О.П., Матіїшин Р.В., Варваренко С.М. Желатинові гідрогелі з покращеними фізико-механічними характеристиками. I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Recent Trends in Science». 5-6 травня 2022 року. Дніпро, Україна. 165-166 с.

9. О.Майкович, А.Сачук, В. Шабікова, Д. Боцула, Д. Остапів. Синтез гідрогелів на основі желатину та дослідження їх цитотоксичності. XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НААН, заслуженого діяча науки і техніки України Макара Івана Арсентійовича. 19 травня 2022 року. Львів. Біологія тварин, 2022, т. 24, № 2. ст. 48.

10. Maikovich O.V., Nosova N.G., Varvarenko S.M. Peculiarities of the microstructure of gelatin hydrogel structured by bifunctional dioxirane crosslinkers. 10th jubilee International Conference "Nanotechnologies and Nanomaterials" NANO-2022, 25 - 27 August 2022, Lviv - P. 127

11. Варваренко С.М., Яковів М.В., Майкович О.В. Особливості кополіконденсації флуоресцеїну з 2-(додеканоїламіно)пентадіовою кислотою за реакцією Стегліха // IV Всеукраїнська наукова конференція «Теоретичні та експериментальні аспекти сучасної хімії та матеріалів ТАСХ-2020», 10 квітня 2020 року, м. Дніпро. с. 175-176

12. Н.Г.Носова, М.М. Букартик, І.О. Грабазей, О.В. Майкович, В.Я. Самарик Армовані поліпропіленовим мікрОВОЛОКНОМ гідрогелі на основі желатину та альгінату натрію // IV Всеукраїнська наукова конференція «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» 29 квітня 2020 року, м. Житомир. с.209.

13. Стасюк А.В., Майкович О.В., Борденюк О.Ю., Букартик М.М., Грабазей І. О. Математична модель формування поліакриламідного гідрогелю армованого поліпропіленовою сіткою // XII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання-2020" (ХКЧ'20), 21-23 квітня 2020 року, м. Харків. с. 99-100.

14. Bordeniuk O.Yu., Bucartuk M.M., Maikovich O.V., Stasiuk A. V. Reinforcement of alginate-gelatin hydrogel using functionalized polypropylene

microfiber // Тези доповідей XXI Міжнародної конференції студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії", 20-22 травня 2020 року, м. Київ. с. 250.

15. Dron I.A., Maikovykh O.V., Bukartyk N.M., Nadashkevych Z.Y., Nosova N.G., Samaryk V.Y. Methods of preparation and properties of pectin-alginate hydrogels. Their morphology and structure // X Ukrainian-Polish Scientific conference "Polymers of special applications" Lviv, September 21-24, 2020. – p.24

16. Maikovykh O.V., Yakoviv M.V., Nagornyak M.I., Vasylyshyn T.M., Varvarenko S.M. Synthesis of hydrogels of modified dispersions with magnetically sensitive particles of the core-shell type as carriers for biomedical applications // Development of Education, Science and Business: Results 2020: abstracts of the International Scientific and Practical Internet Conference, December 3-4, 2020. – Ukraine, Dnipro, 2020. – P.2. – p.24.

17. Яковів М.В., Майкович О.В., Солодкий І.Т., Носова Н.Г., Варваренко С.М. Дослідження гідролітичних властивостей флуоресцеїновмісних кополієстерів. VI Всеукраїнська науково-практична конференція «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості» – Херсон: ХНТУ, Україна, 14-15 листопада 2019, с.18-19

18. Maikovykh O.V., Bordenyuk O.Yu., Bukartyk M.M., Nadashkevych Z.Y., Varvarenko S.M. Investigation of sorption / desorption processes of medical substances by combined hydrogels. VI Всеукраїнська науково-практична конференція «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості» – Херсон: ХНТУ, Україна, 14-15 листопада 2019, с.20

Список публікацій, які додатково відображають наукові результати дисертації. Патенти України:

1. Патент на корисну модель № 152001 «Спосіб отримання желатинового гідрогелю», винахідники: Майкович Ольга Володимирівна; Остапів Дмитро Дмитрович; Сачук Альона Віталіївна; Носова Наталія

Геріанівна; Самарик Володимир Ярославович; Варваренко Сергій Миколайович.
Патент опубліковано 12.10.2022, бюл. № 41/2022

2. Патент України на винахід № 123489 «Спосіб одержання рН-чутливого поліакриламідного гідрогелю», винахідники: Варваренко Сергій Миколайович; Васишин Тарас Михайлович; Яковів Марія Василівна; Носова Наталія Геріанівна; Майкович Ольга Володимирівна; Дронь Ірина Анатоліївна; Фігурка Наталія Володимирівна; Стасюк Анна Василівна; Самарик Володимир Ярославович; Остапів Дмитро Дмитрович; Воронов Станіслав Андрійович. Патент опубліковано 07.04.2021, бюл. № 14/2021

3. Патент України на винахід № 120731 «Поліакриламідний гідрогель армований поліпропіленовим мікрОВОЛОКОМ», винахідники: Дронь І.А., Германович С.Б., Носова Н.Г., Майкович О.В., Варваренко С.М., Самарик В.Я., Воронов С.А. Патент опубліковано 27.01.2020, бюл. № 2/2020

4. Патент на корисну модель № 143783 «Спосіб отримання антисептичної гідрогелевої пов'язки», винахідники: Дронь Ірина Анатоліївна; Носова Наталія Геріанівна; Яковів Марія Василівна; Букартик Марта Миронівна; Стасюк Анна Василівна; Варваренко Сергій Миколайович; Борденюк Олена Юріївна; Майкович Ольга Володимирівна; Фігурка Наталія Володимирівна; Самарик Володимир Ярославович; Воронов Станіслав Андрійович. Патент опубліковано 10.08.2020, бюл. № 15/2020

5. Патент на корисну модель № 145083 «Альгінат-желатиновий гідрогель», винахідники: Носова Наталія Геріанівна; Букартик Марта Миронівна; Стасюк Анна Василівна; Варваренко Сергій Миколайович; Борденюк Олена Юріївна; Дронь Ірина Анатоліївна; Яковів Марія Василівна; Майкович Ольга Володимирівна; Фігурка Наталія Володимирівна; Воронов Станіслав Андрійович; Самарик Володимир Ярославович. Патент опубліковано 25.11.2020, бюл. № 22/2020

6. Патент на корисну модель № 155474 «Спосіб одержання гідрогелю для вогнетривких протипожежних скляних конструкцій», винахідники:

Варваренко Сергій Миколайович; Самарик Володимир Ярославович; Король Сергій Миколайович; Носова Наталія Геріанівна; Букартик Наталія Миколаївна; Надашкевич Зоряна Якимівна; Капаціла Соломія Михайлівна; Стасюк Анна Василівна; Майкович Ольга Володимирівна; Хом'як Семен Володимирович.
Патент опубліковано 28.02.2024, бюл. № 9/2024

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	14
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1	35
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	35
1.1. Класифікація гідрогелів.....	37
1.2. Природні полімери для виготовлення гідрогелів.....	38
1.3. Методи структурування гідрогелів	42
1.4. Вимоги, що висуваються до гідрогелів медичного призначення.....	53
1.5. Застосування гідрогелів як ранових покриттів.....	54
<i>Підсумки до розділу 1</i>	<i>57</i>
РОЗДІЛ 2	59
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	59
ВИХІДНІ РЕЧОВИНИ, МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ СИНТЕЗІВ ТА АНАЛІЗІВ	59
2.1. Вихідні речовини та їх характеристики	59
2.2. Методики синтезів та експериментів.....	65
2.3. Методики проведення аналізів.....	76
РОЗДІЛ 3	78
ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРУВАННЯ ЖЕЛАТИНВМІСНИХ ГІДРОГЕЛІВ ПОХІДНИМИ ПОЛІОКСИЕТИЛЕНІВ	78

3.1. Синтез та дослідження властивостей структуруючих на основі поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси.....	78
3.2. Особливості перебігу реакції структурування у водному середовищі з використанням діоксирану PEGDE 500	82
3.3. Механізм утворення гідрогелю желатину при структуруванні PEGDE 500.....	88
3.4. Порівняння ефективності структурування желатину одержаними дигліцидиловими естерами різної молекулярної маси	93
3.5. Дослідження структурування гідрогелів на основі желатину	95
РОЗДІЛ 4	103
СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЖЕЛАТИНОВИХ ГІДРОГЕЛІВ	103
4.1. Синтез желатинових гідрогелів.....	105
4.2. Визначення ефективності структурування желатину за використання PEGDE 500.	107
4.3. Дослідження механічних властивостей зразків желатинових гідрогелів.....	109
4.4. Дослідження набрякання і морфології зразків гідрогелів.	111
4.5. Дослідження реологічних властивостей желатинових гідрогелів.	116
4.6. Теплова поведінка гідрогелів на основі желатину.	121
4.7. Дослідження цитотоксичності одержаних зразків желатинових гідрогелів.....	123
4.8. Дослідження деградації зразків желатинових гідрогелів під дією ферменту протеази.	124
4.9. Дослідження закономірностей вивільнення препаратів з гідрогелів желатину структурованого PEGDE500.....	126
4.10. Дослідження антимікробних властивостей зразків желатинових гідрогелів завантажених бактерицидними препаратами.	130
<i>Підсумки до розділу 4.....</i>	133

РОЗДІЛ 5	134
СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЖЕЛАТИН-АЛЬГІНАТНИХ ГІДРОГЕЛІВ.....	134
5.1. Характеристики умов синтезу желатин-альгінатних гідрогелів.	134
5.2. ІЧ -дослідження желатин-альгінатного гідрогелю.....	138
5.3. Механічні властивості желатин-альгінатних гідрогелів	141
5.4. Дослідження реологічних характеристик отриманих гідрогелів.....	142
5.5. Дослідження гідрогелів на основі желатину та альгінату методом диференційної сканувальної калориметрії.	149
5.6. Дослідження морфології отриманих гідрогелів	150
5.7. Набрякання желатин-альгінатних гідрогелів в модельних насередовищах	152
5.8. Деградація желатин-альгінатних гідрогелів під впливом ензиму	155
5.9. Дослідження вивільнення медикаментів з желатин-альгінатних гідрогелів.....	157
5.10. Дослідження антимікробних властивостей зразків желатин-альгінатних гідрогелів завантажених бактерицидними препаратами....	161
<i>Підсумки до розділу 5.....</i>	<i>162</i>
РОЗДІЛ 6	164
ОКРЕМІ НАПРЯМКИ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ КОМБІНОВАНИХ ГІДРОГЕЛЕВИХ СИСТЕМ.....	164
6.1. Одержання та дослідження властивостей поліакриламід-желатинових гідрогелів для застосування у ветеринарії.....	164
6.2. Армовані поліакриламід-желатинові гідрогелі.	170
6.3. Функціоналізовані поліакридамідні гідрогелі.	173
ВИСНОВКИ	177
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	179

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

PEG	Поліоксиетилен, поліетиленгліколь
PEGDE 500	Поліоксиетилен (поліетиленгліколь) дигліцидил етер з молекулярною масою 500 г/моль
BSA	Бичачий сироватковий альбумін
TPIC	2-аміно-2-гідроксиметил-пропан-1,3-діол
pH	Водневий показник
IR-FTIR / ІЧ	Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є
SEM / СЕМ	Скануюча електронна мікроскопія
NMR / ЯМР	Ядерний магнітний резонанс
TGA / ТГА	Термогравіметричний аналіз
DSC / ДСК	Диференційна скануюча калориметрія
DLS / ДЛС	Динамічне світло розсіювання
UV / УФ	Ультрафіолетова спектроскопія
SEC	Ексклюзійна хроматографія
ККГ	Критична концентрація гелеутворення
СДЛП	Системи доставки лікарських препаратів
ММ	Молярна маса
ЕПХ	3-хлор-1,2-пропиленоксид, епіхлоргідрин
G'	Модуль накопичення
G''	Модуль втрат
LVR	Лінійна в'язкопружна область
PBS	Фосфатно-сольовий буферний розчин
CH	Ступінь набрякання
ПКМ	Позаклітинний матрикс
ВІМ	Взаємопроникні мережі
ПЕК	Поліелектролітний комплекс

ВСТУП

Актуальність теми. Гідрогелеві матеріали знаходять широке застосування в медицині завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям. Природні полімери, часто використовуються як основа для таких гідрогелів, оскільки придатні до модифікації та мають високу біосумісність, біорозкладність. Це робить їх надзвичайно привабливими для медичних застосувань, таких як трансплантація тканин, створення біоінженерних конструкцій, локальна доставка лікарських препаратів, а також у регенеративній медицині при створенні покриттів для догляду за ранами. Здатність гідрогелевих матеріалів поглинати рідини (набрякати) стає надзвичайно корисною, коли є потреба у догляді та лікуванні ескуючих ран. При їх використанні також реалізується ефективний метод «вологого» загоєння ран, який знаходить щораз більшого поширення в медичній практиці.

На сьогоднішній день актуальність досліджень у сфері гідрогелевих матеріалів на основі природних полімерів, обумовлена необхідністю розробки нових, ефективних і, водночас, безпечних матеріалів для медичних імплантатів і тканинної інженерії. Останні тенденції в цій галузі спрямовані на покращення механічних властивостей гідрогелів, розширення їхніх біологічних функцій, а також оптимізацію методів їх створення.

Велике різноманіття полімерів природного походження – пектин, альгінат, колаген, желатин, каррагенан, хітозан, декстран, целюлоза, та інші відкриває широке поле для досліджень. Проте слід також враховувати такі параметри як ринкова вартість, масштаби виготовлення та потенціал відновлювання, особливо, коли йдеться про товари масового вжитку для забезпечення комерційної доступності кінцевого товарного виробу. Усім переліченим параметрам достатньо добре відповідає – полімер білкової природи – желатин. Зокрема, можна зазначити, що загальний обсяг світового виробництва желатину оцінюється в сотні тисяч тонн на рік. Наприклад, у 2022 році обсяг ринку

споживання желатину склав близько 3,5 мільярдів доларів США, і очікується його зростання до 2028 року.

Незважаючи на те, що методи отримання зшитих структур на основі желатину описані в багатьох наукових публікаціях все ще активно ведуться розробки нових ефективних методів його структурування синтетичними та природніми реагентами, що дозволяє створювати матеріали з керованими властивостями, включно з підвищеною стійкістю до механічного навантаження та/або можливістю контрольованого вивільнення лікарських препаратів. Крім того, актуальним є інтегрування желатинових гідрогелів з клітинними компонентами, що дозволяє створювати біоміметичні структури, які максимально імітують природну тканину.

Таким чином, розробка гідрогелевих желатинвмісних матеріалів залишається актуальним напрямом сучасної біоматеріалознавчої науки, що має великий потенціал для покращення медичних технологій та забезпечення ефективних рішень для лікування та відновлення пошкоджених тканин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема дисертаційної роботи відповідає науковому напрямку кафедри органічної хімії: «Розробка реакційноздатних і ініціюючих систем для функціоналізації (пероксидації) міжфазних поверхонь та формування на них спеціальних полімерних наношарів і конструювання наповнених композитів та біосумісних, біодеградабельних полімерних матеріалів, модифікації природних речовин».

Дисертація виконана в межах науково-дослідних робіт:

1) «Розробка гідрогелевих засобів надання невідкладної допомоги при проникних пораненнях черевної порожнини в межах створення центру досліджень нових полімерних матеріалів для медицини», конкурс 2023.05 «Дослідницькі інфраструктури для проведення передових наукових досліджень», № держреєстрації 0124U003832, НФДУ Договором 267/0015 від 01.08.2024 року;

2) «Створення засобів медичного призначення на основі нових полімергібридних гідрогелевих систем для лікування та реабілітації військовослужбовців з терапевтичною та хірургічною патологією» (2024-2026), № держреєстрації 0124U000727, ДБ/МПП;

3) «Створення гідрогелевих засобів для воєнно-польової медицини і медицини катастроф та технології їх виробництва» (2021-2022), № держреєстрації 0121U109521, ДБ/СОРБ;

4) «Синтез магніточутливих модифікованих дисперсій гідрогелів з частинками типу ядро-оболонка як носіїв для біомедичних застосувань» (2020), № держреєстрації 0120U103816;

5) «Синтез магніточутливих модифікованих дисперсій гідрогелів з частинками типу ядро-оболонка як носіїв для біомедичних застосувань» (2019), № держреєстрації 0119U101956;

6) «Функціональна мімікрія людської шкіри прищепленими до полімерної поверхні гібридними гідрогелями біополімерів для лікування її ушкоджень великої площі» (2018-2020), № держреєстрації 0118U000262, ДБ/Колаген;

Авторка дисертаційної роботи є однією з виконавиць вказаних науково-дослідних робіт.

Частина експериментального дослідження була проведена здобувачкою під час стажувань та за фінансової підтримки міжнародних програм:

– Січень-липень 2022 – академічна мобільність ERASMUS+ MIC KA 171 для проведення досліджень за тематикою дисертаційної роботи в Інституті молекул і матеріалів (IMMM) у м. Ле Ман (Франція), *6 місяців*

– Березень-листопад 2023 –грантова підтримка у рамках програми «Дії Марії-Склодовської Кюрі» (MSCA4Ukraine грант ID 232572) для роботи над дослідницьким проєктом «Gelatin-alginate hydrogels for hard-to-heal wounds», університет Ле Ману (Франція), *8 місяців*

– Березень-квітень 2024 – академічна мобільність ERASMUS+ MIC KA 171 для проведення досліджень за тематикою дисертаційної роботи в Інституті молекул і матеріалів (IMMM) у м. Ле Ман (Франція), *2 місяці*

– Липень-серпень 2024 – фінансування від Шведського Інституту (SI) за Програмою Балтійського сусідства (Baltic Sea Neighbourhood Programme) для проведення досліджень лігнінових гідрогелів в Уппсальському Університеті (Швеція), *2 місяці*

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи є розроблення методу та визначення параметрів синтезу желатинвмісних гідрогелевих матеріалів для біомедичних застосувань, які можуть бути одержані в одну стадію та не потребують застосування регуляторів водневого показника та додаткових ініціаторів і не містять у своєму складі низькомолекулярних структуруючих агентів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1) розробити методики одержання гідрогелевих матеріалів на основі желатину і його комплексу з альгінатом натрію при структуруванні водорозчинними структуруючими агентами на основі поліоксиетиленгліколю;

2) синтезувати діоксиранові похідні поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси та провести порівняльний аналіз для виявлення найбільш ефективного у процесах структурування желатину. Встановити закономірності гідролітичної стійкості водорозчинних діоксиранових похідних поліоксиетиленгліколю для оцінки можливості їх застосування як структуруючих агентів у водному середовищі при отриманні гідрогелів.

3) дослідити вплив на фізико–механічні та фізико–хімічні властивості одержуваних гідрогелевих матеріалів таких чинників як:

- молекулярна маса структуруючого агенту для отримання гідрогелів з заданим комплексом властивостей;

- співвідношення желатину та структуруючого агенту у матриці гідрогелю;

- співвідношення желатину та альгілату натрію для отримання водорозчинних поліелектролітних комплексів як полімерної основи для отримання гідрогелів;

- часових рамок проведення процесів структурування;

4) визначити залежності набрякання отриманих гідрогелевих матеріалів у воді, фізіологічному розчині та модельних середовищах, що характерні для ран залежно від структури та умов їх формування;

5) дослідити структуру та морфологію отриманих зразків гідрогелів;

6) дослідити здатність отриманих гідрогелів сорбувати біологічно активні субстанції та вивільняти їх у відповідне середовище; дослідити ступінь та кінетичні закономірності вивільнення у модельні середовища препаратів анальгетичної та антисептичної дії введених в матрицю гідрогелю;

7) дослідити цитосумісність вихідних речовин та одержаних зразків гідрогелів на живих клітинах;

8) дослідити бактерицидні властивості гідрогелів насичених антимікробними препаратами на штамах грампозитивних (*Staphylococcus aureus*) і грамнегативних (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерій та грибів (*Aspergillus niger*).

Об'єкт дослідження. Об'єктами дослідження є синтез гідрогелевих желатинвмісних матеріалів, вивчення закономірностей гідролітичної стійкості діоксиранових похідних, фізико-хімічні властивості отриманих матеріалів в контексті їх біомедичних застосувань.

Предмет дослідження. Предметом дослідження є гідрогелеві матеріали на основі желатину та діоксиранових похідних поліоксиетиленгліколів.

Методи дослідження. ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопія, ультрафіолетова спектрофотометрія (УФ, UV), інфрачервона спектроскопія (ІЧ, IR-FTIR), динамічне світлорозсіювання (DLS), ексклюзійна хроматографія (SEC), скануюча електронна мікроскопія (SEM), диференційна скануюча калориметрія (DSC), ротаційна віскозиметрія, реометрія динамічного зсуву.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в:

- Вперше розроблено методи формування гідрогелевих матеріалів підвищеної міцності на основі желатину, які передбачають його структурування у водному середовищі діоксирановими похідними поліоксиетиленгліколю без залучення регуляторів водневого показника чи інших додатків, що дало можливість проведення синтезу в одну стадію без етапу очищення від непрореагованих сполук;

- Вперше розроблено метод синтезу комбінованих гідрогелів, який базується на структуруванні діоксирановим похідним поліоксиетиленгліколю поліелектролітного комплексу желатину, який містить 10 % альгінату натрію з отриманням гідрогелів з покращеними механічними властивостями;

- Вперше, методом ЯМР встановлений механізм гідролітичної стійкості діоксиранових похідних поліоксиетиленгліколю у водному середовищі;

- Встановленні залежності комплексу фізико-хімічних та фізико-механічних властивостей желатинових та желатин-альгінатних гідрогелів від їх складу та умов синтезу;

- Вперше вивчено деградацію желатинових та желатин-альгінатних гідрогелів отриманих при структуруванні діоксирановими похідними поліоксиетиленгліколю під дією протеолітичного ензиму;

- Вивчено закономірності та встановлена можливість контрольованого вивільнення анальгетичних та бактерицидних препаратів зі складу синтезованих гідрогелів для більш ефективного процесу загоєння ран;

- Вперше отримано армований поліпропіленовою сіткою двошаровий желатин-поліакриламідний гідрогель;

- Вперше розроблено склад та умови отримання рН-чутливого гідрогелю на основі водорозчинного поліакриламідного структуруючого агенту та кополіестеретеру флуоресцеїну.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами встановлених закономірностей та розробленої методики синтезу отримано нові

комбіновані гідрогелеві матеріали, визначено раціональні склади желатинвмісних зразків гідрогелів із задовільними експлуатаційними характеристиками, які можуть бути використані для ефективної та спрямованої доставки лікарських препаратів. Використання поєднання природних та синтетичних полімерів/олігомерів дозволило підвищити здатність взаємодіяти з біологічними системами без викликання шкідливих реакцій, агенти структурування забезпечили стабільність отриманих гідрогелевих зразків у біологічних середовищах при фізіологічних температурах. Можливість використання отриманих матеріалів для знеболюючих та антибактеріальних гідрогелевих пов'язок, масок, патчів для лікування уражень шкіри. Отримано гідрогелевий матеріал для створення сенсорів.

Особистий внесок здобувача полягає в проведенні пошуку та аналізі наукових публікацій за тематикою дослідження, визначення та формулювання мети дисертаційної роботи, проведення експериментальних досліджень й синтезів гідрогелів на основі желатину, альгінату натрію та їх композицій, розробці методик експериментів та аналізів одержаних зразків гідрогелів та вихідних речовин.

Узагальнення результатів дослідження, аналіз та визначення напрямків застосування, формулювання висновків обговорювались з науковим керівником професором Варваренком Сергієм Миколайовичом.

Частина інструментальних досліджень проведена в Університеті Ле Ману (Франція) та в Уппсальському Університеті (Швеція). Біологічні дослідження проведені в Інституті біології тварин НААН в співпраці з д.с-г.н Остапівим Дмитром Дмитровичом.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати дисертаційної роботи доповідалися й обговорювалися на:

- факультеті фармації в Університеті Страсбургу (Франція) у літній школі «Materials for Health: from Biophysics to Biomedicine», Страсбург – 4-7 липня 2023 року;

- тренінгу організованому школою докторантів Університету Ле Ману (Франція) з переробки та сортування полімерів «Polymer recycling, what you know and what you should know» (ED3MG), Ле Ман – 24 жовтня 2023 року;
- публічному заході з популяризації науки «La Fête de la Science», місце проведення Abbaye de l'Erau, місто Ле Ман (Франція), 14-15 жовтня 2023;
- міжнародних та всеукраїнських конференціях: 1) XII International conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2024) Uzhhorod - 2024; 2) XII International Scientific-Technical Conference “Advance in Petroleum and Gas Industry and Petrochemistry” (APGIP-12), Lviv – 2024; 3) XI International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO-2023), Bukovel – 2023; 4) 13th International Conference “Nanomaterials: Applications & Properties (IEEE NAP-2023)”, Bratislava – 2023; 5) International Scientific Conference "Modern Achievements in Food, Organic and Polymer Chemistry", Lviv - 2023; 6) 65th International Conference For Students Of Physics And Natural Science "Open Readings 2022", Vilnius – 2022; 7) XI International Scientific-Technical Conference “Advance in Petroleum and Gas Industry and Petrochemistry” (APGIP-11), Lviv-2022; 8) I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Recent Trends in Science», Дніпро - 2022; 9) XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НААН, заслуженого діяча науки і техніки України Макара Івана Арсентійовича, Львів - 2022; 10) 10th jubilee International Conference "Nanotechnologies and Nanomaterials" (NANO-2022), Lviv - 2022; 11) IV Всеукраїнська наукова конференція «Теоретичні та експериментальні аспекти сучасної хімії та матеріалів ТАСХ-2020», Дніпро – 2020; 12) IV Всеукраїнська наукова конференція «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи», Житомир – 2020; 13) XII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання-2020" (ХКЧ'20), Харків – 2020; 14) XXI Міжнародна конференція студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії", Київ

– 2020; 15) X Ukrainian-Polish Scientific conference “Polymers of special applications”, Lviv – 2020; 16) Development of Education, Science and Business: Results 2020: abstracts of the International Scientific and Practical Internet Conference, Dnipro – 2020; 17) VI Всеукраїнська науково-практична конференція «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості», Херсон – 2019.

Публікації. Основні положення дисертації відображені у 34 друкованих працях, з них 6 статей у наукових фахових виданнях України, 4 статті у наукових періодичних виданнях іноземних держав та у виданнях України, що індексовані в міжнародних наукометричних базах даних (Scopus), 2 патенти України на винахід, 4 патенти України на корисну модель, 18 тез доповідей на міжнародних і всеукраїнських конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел літератури (270 найменувань). Загальний обсяг дисертації становить 204 сторінки, містить 27 таблиць та 51 рисунок.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

Гідрогелі - це тривимірні сітчасті гідрофільні матеріали, які на відміну від інших гелів, використовують воду як дисперсійне середовище, з агрегатним станом, який не є ані повністю твердим, ані повністю рідким [1, 2]. Зважаючи на ці характеристики гідрогелям притаманні механічні властивості твердого тіла і термодинамічні властивості рідини, а також чудова еластичність, пластичність та біосумісність. Вміст води в гідрогелях визначає їхні специфічні фізико-хімічні властивості: механічну міцність, здатність до набрякання, селективну проникність, клітинну адгезію, прозорість [3, 4, 5, 6].

Гідрогелі можуть мати багато фізичних форм: тверді форми (контактні лінзи), пресовані порошкові матриці (капсули для перорального прийому), мікрочастинки (біоструктуровані носії або засоби для обробки ран), покриття (у імплантатах, катетерах, капсулах, капілярному електрофорезі), мембрани або диски (гелі для електрофорезу), капсульований розчин (в осмотичних насосах) та рідини (гелеві форми, що нагріваються або охолоджуються) [6].

Гідрогелі широко застосовуються в харчовій промисловості, тканинній інженерії, матеріалах пролонгованої дії та біосенсорах завдяки використанню досягнень матеріалознавства, біологічної інженерії та хімічної інженерії, сприяючи зниженню витрат виробництва, підвищенню ефективності технологічних процесів і створенню інноваційних продуктів із високою комерційною цінністю [7]. Водночас, інженерія матеріалів, біологічна інженерія, хімічна інженерія та інші технічні досягнення також сприяють прогресу в технології приготування гідрогелів, розробці нових гідрогелів і розширенню їх функціональних можливостей. Властивості (наприклад, швидкість набрякання-колапсування, пружність, здатність до деградації, розмір частинок) гідрогелів можна регулювати, змінюючи співвідношення гідрофільних і гідрофобних компонентів, природу та концентрацію ініціаторів, полімерів або структуруючих агентів, а також умови реакції (час, температура, водневий показник тощо) [8].

Завдяки їхній біосумісності, варіативності методів виготовлення, можливості модифікації складу та бажаним фізичним характеристикам, гідрогелі самі по собі або в поєднанні з іншими засобами стають перспективними матеріалами в сфері біомедичних застосувань [9]. Вони можуть слугувати: каркасами, які забезпечують 3D структуру для тканинної інженерії; носіями для інкапсуляції клітин; виступати як клеї або бар'єри між тканинами і поверхнями матеріалів; діяти як клітинні шари для зворотного контролю прикріплення клітин; як матриці для доставки лікарських засобів; перев'язувальні ранові покриття.

Відомою проблемою гідрогелів, що часто і доволі суттєво обмежує можливості їхнього застосування, особливо при використанні в медичній галузі, є їх невисокі механічні властивості, покращенням яких науковці займаються від початку їх створення [10, 11, 12]. Можливо виділити дві основні стратегії підняття механічних властивостей гідрогелевих матеріалів. Перша це отримання мультимодифікованих матеріалів, що проходять кілька рівнів або видів модифікацій для покращення їхніх механічних властивостей. Це може включати: подвійні мережі (Double Network, DN) – структури, що складаються з двох хімічно або фізично зшитих полімерних мереж з різною жорсткістю, що забезпечує високу міцність і розтяг; подвійно структуровані (зшиті) мережі (Dually Crosslinked Networks) – гідрогелі, у яких існують два типи структурування (наприклад, ковалентне та іонне), що підвищує їхню стабільність та опірність деформаціям; взаємопроникаючі полімерні мережі (Interpenetrating Polymer Networks, IPN) – системи, в яких дві або більше полімерних мереж просторово переплетені без хімічного зв'язку між ними, що покращує їхню механічну стійкість і адаптивність. Загалом, така багаторівнева модифікація дозволяє комбінувати різні типи взаємодій у матеріалі, що робить його міцнішим, еластичнішим або більш зносостійким, залежно від необхідних властивостей. Друга – використання армувальних елементів (волокон, сіток, нетканих поліпропіленових матеріалів та ін.) [13,14,15]. Ця стратегія підвищення

механічних властивостей гідрогелевих матеріалів ґрунтується на введенні додаткових елементів у полімерну матрицю. Такі елементи виступають каркасом або зміцнювальними структурами, які зменшують крихкість гідрогелю, покращують його розривну міцність, еластичність і стійкість до деформацій.

В залежності від завдань – використовуються різні підходи до отримання гідрогелевих матеріалів, включно з вибором сировини, методів полімеризації та модифікації структури. Одним із перспективних біополімерів для створення гідрогелів є желатин, оскільки він має високу біосумісність, здатність до гелеутворення, а також містить амінокислотний склад, подібний до позаклітинного матриксу. Завдяки цим властивостям желатинові гідрогелі широко застосовуються в біомедичних матеріалах, тканинній інженерії та системах контрольованого вивільнення біоактивних речовин.

1.1. Класифікація гідрогелів

Гідрогелі можна класифікувати, враховуючи багато факторів (схема рис.1.1 [16]), таких як джерело вихідної сировини (натуральні або синтетичні полімери) [17]; методи отримання; структура мережі хімічно зшита (незворотна) і фізично зшита (зворотна, гідрогелі на основі водневих зв'язків); розміри (макрогелі, мікрогелі, наногелі); чутливість до стимулів (таких як фізичні, хімічні та біохімічні стимули); заряд полімерної мережі (неіонна, іонна, цвіттеріонна і амфотерна); фізична форма (мікро-/наночастинки, плівки, матриці, гелі тощо); конфігурація (аморфна та напівкристалічна); склад (гомополімерні, мультиполімерні або гетерополімерні, кополімерні та мережі взаємопроникаючих полімерів, гібриди, композити); здатність до розкладання (біодеградабельні – біоабсорбовані, біоеродовані та ті, що розкладаються контрольованим чином; і небіодеградабельні) [18, 19, 20, 21]. Загалом, гідрогелі містять полярні/заряджені функціональні групи, що надають їм гідрофільності, здатності до поглинання води, а відповідно й набрякання в певному середовищі, підвищення їхньої чутливості до стимулів тощо. Також гідрогелі можна класифікувати за ступенем рівноважного набрякання (CH): 1) гідрогелі з низьким

СН (20 – 50 %), середнім СН (50 – 90 %), високим СН (90 – 99.5 %) та суперабсорбуючі гідрогелі (> 99.5 %). Гідрогелі з високим СН демонструють хорошу проникність і біосумісність [22], тому їм віддають перевагу для використання в медичній галузі.

1.2. Природні полімери для виготовлення гідрогелів

Природні полімери – це складні органічні молекули, які виникають у природному середовищі та не піддавалися модифікації, в основному вони зустрічаються у різних організмах (ссавці, рослини, мікроорганізми та ін.) [23, 24]. Такі біополімери зазвичай отримують з відновлюваних джерел, які є в достатній кількості, порівняно не дорогі та легкодоступні. Вони мають низку переваг, зокрема відновлюваність, біодеградабельність і біосумісність, що робить їх широко застосовуваними в багатьох біомедичних галузях, зокрема в тканинній інженерії, відновленні пошкоджень, доставці лікарських препаратів і створенні імплантованих медичних пристроїв [25].

Основні переваги природних біомедичних полімерних матеріалів [26]:

- біосумісність: природні біомедичні полімерні матеріали не шкідливі для живих тканин і не викликають імунної відповіді, що є критично важливим для багатьох медичних застосувань, особливо для імплантатів та систем контрольованого вивільнення, які залишаються в організмі протягом тривалого часу. Крім того, вони зазвичай краще взаємодіють із навколишніми тканинами, інтегруючись із ними та сприяючи процесам загоєння та регенерації.

- біодеградабельність [27]: деградовані природні полімери розкладаються в організмі до простих метаболітів, які зазвичай є нетоксичними і виводяться природними шляхами. Натомість синтетичні матеріали можуть утворювати токсичні побічні продукти, що підвищує ризик негативного впливу на організм. У медицині часто потрібні тимчасові підтримувальні матеріали (ендопротези) або імплантати. Використання біодеградованих природних полімерів дозволяє уникнути повторних хірургічних втручань, оскільки такі

КЛАСИФІКАЦІЯ ГІДРОГЕЛІВ

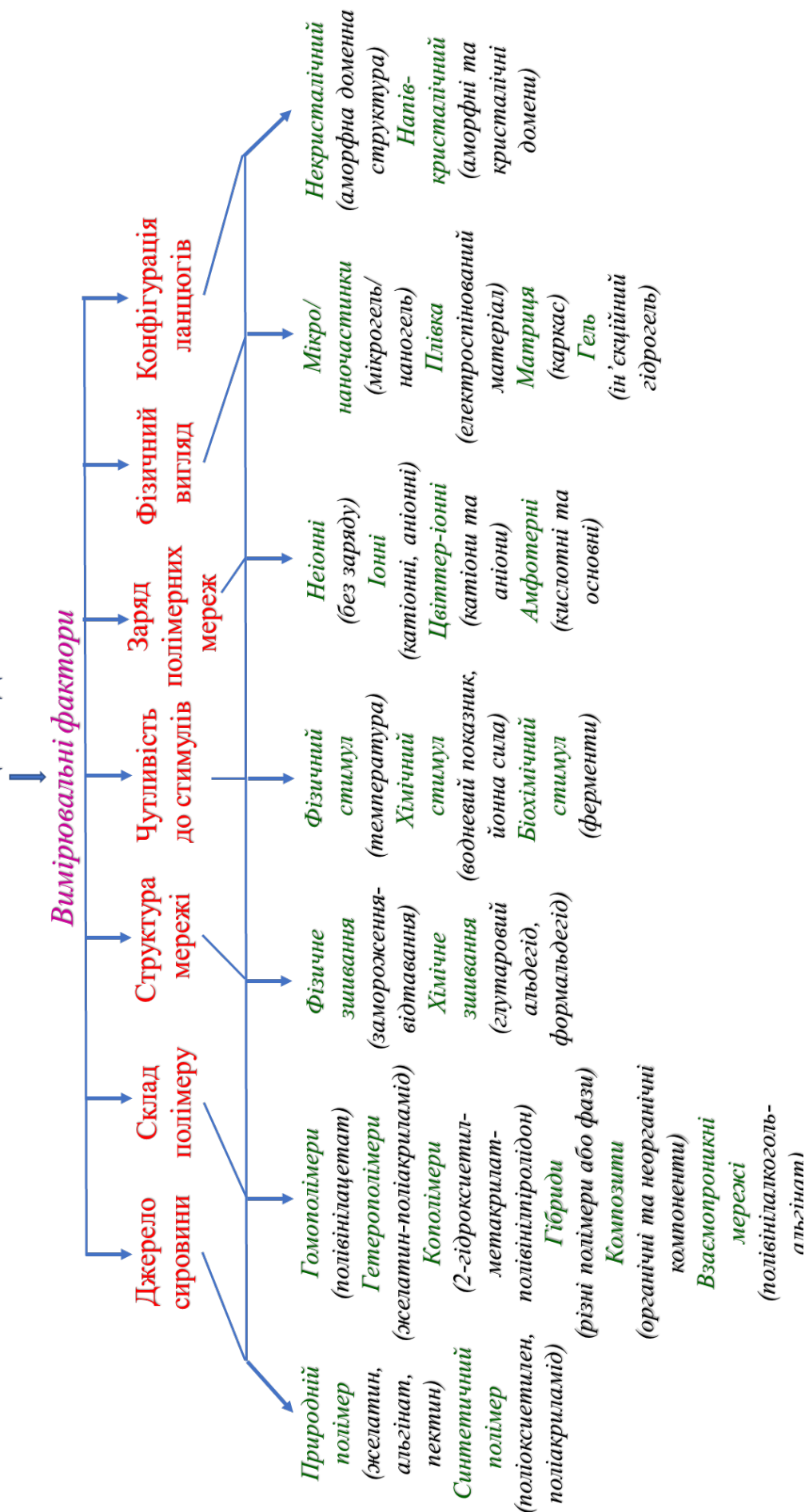


Рис. 1.1. Схема класифікації гідрогелів за різними визначальними факторами [16]

– матеріали поступово розкладаються після виконання своєї функції, усуваючи потребу в їх видаленні.

Деякі природні полімери можуть бути структурно модифіковані для контрольованого вивільнення лікарських засобів або біологічно активних молекул, що забезпечує їх вивільнення у потрібний момент і в потрібній дозі, що є особливо цінним для терапевтичних застосувань.

- універсальність: природні полімерні біоматеріали мають широке розмаїття, оскільки походять з різних організмів і біологічних процесів. Завдяки цьому вони мають великий потенціал для застосування в біомедичній сфері.

- доступність та екологічність: природні біомедичні полімерні матеріали часто отримують із відновлюваних ресурсів (наприклад, з рослин або тварин), що робить їх більш екологічною альтернативою синтетичним матеріалам.

- функціоналізація: природні полімерні біоматеріали легко модифікуються, що дозволяє вбудовувати специфічні функціональні групи, покращуючи їх біосумісність, механічні властивості та можливість цільової доставки лікарських засобів. Для підвищення їхньої придатності як перев'язувальних матеріалів для лікування ран, необхідно надати природним полімерам різні функції (гемостаз, антибактеріальна активність, васкуляризація, антиоксидантні властивості тощо). Активні групи ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) у молекулярному ланцюгу природних полімерів забезпечують реакційноздатність для їх функціональної модифікації [28].

Сьогодні природні полімери є більш привабливими для терапевтичного використання порівняно з синтетичними через їхню доступність, безпечність та відсутність токсичності. Крім того, вони можуть допомагати у боротьбі з бактеріальними інфекціями. Наприклад, деякі природні полімери мають антибактеріальні властивості, здатні інгібувати ріст бактерій або руйнувати їхні клітинні стінки [29]. Також вони можуть використовуватися як носії для доставки лікарських засобів, що підвищує ефективність лікування інфекцій. Це робить їх цінним інструментом у сучасній медицині.

Багато природних полімерів (рис. 1.2) вже знайшли застосування в лікуванні ран, наприклад, хітозан - впливає на функцію макрофагів, що прискорює процес загоєння ран [30, 31]; желатин, колаген через здатність утримувати велику кількість води та біомімікувати стимулює епітелізацію та вироблення грануляційної тканини [32, 33, 34, 35]; декстран - використовується в перев'язках хронічних ран [36], , гіалуронова кислота – має антибактеріальні антиадгезивні властивості [37, 38], альгірати – гемостатичні властивості [39, 40], натуральне шовкове волокно – кровоспинні властивості, низький рівень запалення, киснева проникність та проникність водяної пари [41], целюлоза біологічно розкладається, запобігає бактеріальній інфекції [42, 43].



Рисунок 1.2. Найпоширеніші біополімери для синтезу гідрогелів

Останнім часом спостерігається значний прогрес у дослідженні потенційних застосувань природних полімерів у біомедичній галузі, зокрема у створенні гідрогелів на основі цих матеріалів для лікування різних типів ран, таких як хронічні, діабетичні, виразкові та опікові, де процес регенерації шкірних тканин значно ускладнений. Серед таких полімерів особливу увагу приділяють желатину, колагену, хітозану та альгірату, а також їх комбінаціям [44]. Желатин, зокрема, відзначається низкою переваг: він має високу біосумісність, низьку імуногенність, здатність до біодеградації та стимулює клітинну адгезію та

проліферацію, що робить його ідеальним матеріалом для тканинної інженерії [45].

Гідрогелі на основі цих полімерів ефективно запобігають вторинним інфекціям у місці пошкоджень, створюючи захисний бар'єр, який блокує проникнення патогенних мікроорганізмів [46]. Крім того, вони виконують функцію носіїв для лікарських засобів, забезпечуючи контрольоване та тривале вивільнення активних речовин безпосередньо в місце рани. Це дозволяє підвищити ефективність терапії, забезпечуючи цілеспрямоване лікування та прискорюючи процес загоєння. Таким чином, гідрогелі на основі природних полімерів, зокрема желатину, відкривають нові перспективи для розвитку інноваційних підходів у регенеративній медицині та лікуванні складних ран [45, 47]. Загалом природні полімери мають низку переваг перед синтетичними і стали ключовим компонентом у розробці нових медичних та терапевтичних засобів.

1.3. Методи структурування гідрогелів

Властивості гідрогелів можуть контролюватися різними параметрами, такими як структура, тип структурування, щільність зшивки та синтез полімерів, умовами середовища (рН, температура, іонна сила тощо). Для створення полімерних мереж і збереження 3D-структур у водних середовищах використовуються різні підходи до структурування:

- 1) фізичне зшивання (досягається шляхом використання повторюваних циклів заморожування/відтавання, що призводить до утворення кріогелів) за допомогою іонних взаємодій, складної коацервації або водневих зв'язків;
- 2) хімічне зшивання або гомополімеризація, кополімеризація, хімічні перетворення (з використанням структуруючих агентів, таких як борати, гліюксаль, глутаровий альдегід тощо) [48];
- 3) структурування шляхом опромінення (електронним пучком або гамма-випромінюванням залежно від дози опромінення).

1.3.1 Фізичні методи структурування гідрогелів

Полімерні мережі повинні відповідати наступним умовам для утворення гідрогелів методами фізичного структурування: (а) сильні міжланцюгові взаємодії, щоб утворити стабільне з'єднання в макромолекулярній мережі, і (б) полімерна сітка повинна сприяти доступу і утриманню води всередині гідрогелю. Гідрогелі, які відповідають цим вимогам, можуть бути отримані нековалентними зв'язками, такими як електростатичні взаємодії, силами Ван дер Вальса, водневі зв'язки та гідрофобні асоціації між полімерними ланцюгами [49].

Нагрівання/охолодження полімерного розчину

Фізично структуровані гідрогелі утворюються при охолодженні гарячих розчинів полімерів природного походження: пектин [50], желатин [51], каррагенан [52], альгінат [53], агароза [54], хітозан [55], гіалуронова кислота [56], ксантанова камедь [57]. Желатин утворює фізично структуровані гідрогелі при охолодженні гарячих розчинів за рахунок відновлення потрійних спіралей колагену [51], гіалуронова кислота може утворювати гідрогелі при охолодженні гарячих розчинів, особливо у присутності інших полімерів або іонів [56], хітозан може утворювати гідрогелі при охолодженні гарячих розчинів у присутності певних добавок, таких як гліцерофосфат, які сприяють фізичному зшиванню [55].

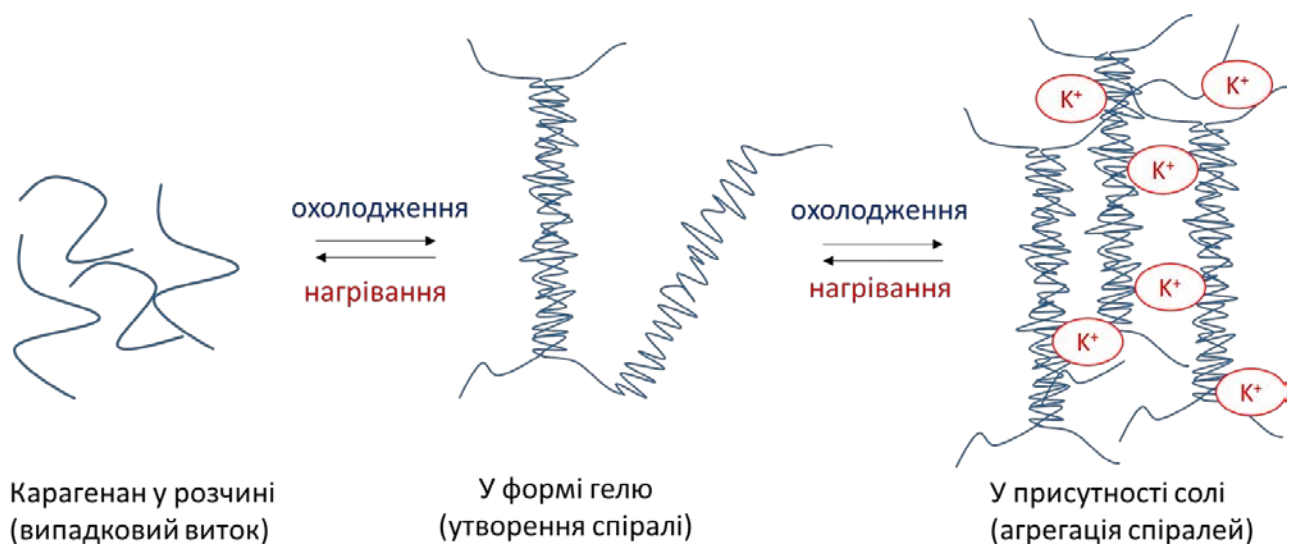


Рис. 1.3. Утворення гелю внаслідок агрегації спіралей під час охолодження гарячого розчину карагенану [58].

Утворення гідрогелю відбувається за рахунок утворення спіралі, асоціації спіралей та формування зон з'єднання (рис. 1.3). Наприклад, у гарячому розчині карагенан існує у вигляді випадкових клубків, але після охолодження утворює жорсткі спіральні стержні. Додаткове утворення подвійних спіралей і їх агрегація відбувається у присутності солей (Na^+ , K^+ , тощо) через електростатичну взаємодію із сульфонатними групами [58, 59].

Іонна взаємодія

Гідрогелі, приготовані через взаємодію між іонами, можна поділити на два типи. Перший тип – це фізичні гідрогелі, які утворюються через електростатичну взаємодію між поліелектролітами та протилежно зарядженими багато валентними іонами; другий тип – це гідрогелі, які утворюються через електростатичну взаємодію між двома протилежно зарядженими поліелектролітами [60]. Наприклад, альгінат структурується за допомогою іонів кальцію при кімнатній температурі та фізіологічному рівні pH [61]. Такі гелі можуть бути використані для інкапсуляції живих клітин або як матриця для вивільнення білків [62]. Гелеутворення також відбувається при взаємодії поліелектролітів з багатозарядними іонами, наприклад, формування гідрогелю відбувається при взаємодії альгілату натрію (Na^+ -альгінат $^-$) із двовалентними іонами кальцію (Ca^{2+}) [63]. Комбінуючи іонне та ковалентне зшивання, отримують іонно-ковалентні гідрогелі на основі хітозану [64].

Водневі зв'язки

Водневі зв'язки є однією з найпоширеніших нековалентних взаємодій при побудові фізичних гідрогелів. Водневі зв'язки зазвичай є зв'язками типу А-Н...В, які утворюються між атомами водню та атомами з високою електронегативністю (N, O, F тощо). Тут група А-Н є донором водневого зв'язку, а В – рецептором водневого зв'язку. Поширеними функційними групами у гідрогелях, що можуть бути структуровані, є карбоксильні групи, аміногрупи, гідроксильні групи тощо. Багато природних полімерних матеріалів (альгінат натрію, хітозан, крохмаль, целюлоза тощо) містять велику кількість карбоксильних або аміногруп, тому

існує багато літературних джерел, що описують гідрогелі на основі природних полімерів, зшиті водневими зв'язками. Окрім природних полімерів, деякі синтетичні полімерні матеріали (полівініловий спирт, поліетиленгліколь, тощо) також використовуються для приготування зшитих водневими зв'язками гідрогелів завдяки наявності великої кількості гідроксильних груп. Водневі зв'язки утворюються, також, наприклад, між поліметакриловою кислотою або поліакриловою кислотою та поліетиленгліколем [65]. Є повідомлення про метод приготування гідрогелів за допомогою етанолу для модулювання водневих зв'язків між полівініловим спиртом та таніновою кислотою. У дослідженні показано, що гідрогель, зшитий водневими зв'язками, демонструє надзвичайно високу міцність на розтяг (більше 10 МПа), стабільність об'єму при набряканні та хорошу здатність до розділення олії та води [66]. Крім того, особливість водневих зв'язків, які можуть руйнуватися та відновлюватися за певних умов, має унікальні переваги при виготовленні самовідновлювальних матеріалів. Прикладом може бути гідрогель один із шарів якого утворений желатином, інший – полі(N-гідроксиетилакриламідом), що демонстрував швидке самовідновлення при кімнатній температурі та високі механічні властивості [67].

Гідрогелі, що утворюються завдяки цим взаємодіям, є фізичними гелями та характеризуються високою чутливістю до води та термооборотністю. Такі гідрогелі у фізіологічних середовищах мають короткий термін існування, який становить від кількох днів до максимум місяця. У результаті фізичні гідрогелі використовуються там, де потрібне короткострокове вивільнення ліків.

1.3.2 Хімічні методи структурування гідрогелів

Хімічні методи структурування гідрогелів є ключовим інструментом у створенні матеріалів для біомедичних застосувань, таких як доставка ліків, тканинна інженерія та регенеративна медицина. Зазвичай, під дією світла, тепла, високоенергетичного випромінювання або за допомогою біфункціональних агентів структурування макромолекулярні ланцюги можуть з'єднуватися хімічними зв'язками, утворюючи гідрогелі.

Вільнорадикальна полімеризація

Гідрогелі на основі полімерів, отримані шляхом вільнорадикальної кополімеризації, є найпоширенішим методом синтезу хімічно структурованих гідрогелів. У цьому методі мономері зазвичай представлені невеликими водорозчинними молекулами (акрилова кислота, акриламід, вінілпіролідон тощо), що містять подвійний зв'язок, здатний до полімеризації. Обов'язковою є присутність структуруючого агенту який містить щонайменше два подвійні зв'язки, які також можуть вступати в реакцію полімеризації (наприклад, N,N-метиленбісакриламід [68], акрилат етиленгліколю [69] тощо). Деякі функціональні або природні макромолекули, модифіковані подвійними зв'язками, також можуть утворювати гідрогелі шляхом радикальної полімеризації [70]. Гідрогелі полі(метакрилової кислоти)/желатину були синтезовані методом вільнорадикальної полімеризації при ініціюванні температурою без додавання будь-якого хімічного структуруючого агенту, оскільки додавання желатину збільшило утворення гідрофобних доменів у структурі гідрогелів, які діяли як постійні центри структурування [71].

Основними методами отримання гідрогелів за допомогою радикальної полімеризації є полімеризація у водному розчині та обернена суспензійна/емульсійна полімеризація [72].

Радіаційна полімеризація

Радіаційна полімеризація – це реакція, ініційована первинними активними вільними радикалами, що утворюються під впливом високоенергетичних променів, таких як гамма-випромінювання, ультрафіолетове випромінювання та електронні прискорювачі [73, 74].

Водорозчинні полімери, які не містять подвійних зв'язків, також можуть зшиватися під дією випромінювання з утворенням гідрогелів. Під час опромінення водного розчину полімеру полімерні ланцюги можуть утворювати вільні радикали внаслідок гемолізу C–H зв'язку. Вільні радикали на різних полімерних ланцюгах рекомбінуючи, утворюють ковалентно структуровану

мережу. У порівнянні з ініційованою хімічними ініціаторами полімеризацією мономерів, радіаційна технологія має певні переваги: м'які умови реакції, відсутність ініціаторів, висока чистота продукту, простота процесу.

Однак у всіх методах, що передбачають використання мономерів слід враховувати проблеми пов'язані з видаленням їх залишків через токсичність деяких з них (наприклад, акрилової кислоти, акриламиду). Крім мономерів, реагентами можуть бути деякі полімери, в тому числі природнього походження: полісахариди, пептиди, протеїни [73, 75].

Використання структуруючих агентів

Структуруючі агенти синтетичного та натурального походження, такі як глутаровий альдегід, епіхлоргідрин, формальдегід, поліепоксида, 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід, геніпін, лимонна кислота тощо, широко використовуються для отримання зшитого гідрогелевої мережі з синтетичних і натуральних полімерів [76]. Ця технологія передбачає введення нових молекул між полімерними ланцюгами для утворення тривимірної структури. Одним із прикладів є гідрогель, отриманий шляхом структурування хітину та полівінілового спирту за допомогою епіхлоргідрину [77]. Отримані комбіновані гідрогелі виявили високу біосумісність та безпеку при тестуванні на клітинних культурах, що підтверджує їх перспективність для використання в тканинній інженерії. Ланцюги метилцелюлози також можуть бути структуровані шляхом введення лимонної кислоти як агента структурування та сорбіту як пластифікатора, що дозволяє отримати гідрогель, придатний для контрольованого вивільнення речовин [78]. Ще одним прикладом є гідрогелеві плівки на основі альгінатів та карбоксиметилцелюлози структуровані епіхлоргідрином, з властивостями такими як біосумісність, низька токсичність, неімуногенність, гемостатична активність та здатність поглинати велику кількість води, які дозволяють використовувати їх як потенційні системи доставки ліків [79].

Альтернативно, можна структурувати полімери з аміногрупами за м'яких умов, використовуючи альдегіди, з утворенням при цьому основи Шиффа. Крохмаль функціоналізований численними альдегідними групами (ДАК) є макромолекулярним структуруючим агентом, який може реагувати з аміногрупами желатину [80]. Структурування желатинового гідрогелю ДАК покращує його термічну стабільність. Хоча структура гідрогелю, структурованого діальдегідним крохмалем, є більш жорсткою, спостерігалось збільшення здатності до набрякання матеріалів, що містять ДАК, що може бути зумовлено наявністю численних гідроксильних груп та гідрофільною природою структури ДАК [81].

У роботі [82] досліджено властивості желатинових гідрогелів, структурованих глутаральдегідом і гліцеральдегідом: останній був запропонований як біосумісна альтернатива широко дослідженим, але потенційно токсичним діальдегідам (формальдегіду, глутаральдегіду). Автори підсумували і окреслили умови, в яких гліцеральдегід може бути використаний для зшивання желатинових гідрогелів, таким чином представляючи цінну альтернативу глутаральдегіду для застосувань, в яких його токсичність може викликати певні занепокоєння (харчова, біомедична, косметична промисловість і т.д.). Змінюючи кількість структуруючого і склад розчинника під час реакції, можна регулювати найважливіші властивості гідрогелю з точки зору залишкових вільних амінних груп, поведінки розчинення, морфології, нанорозмірної структури та механічних властивостей. Ці результати є корисними для отримання гідрогелів з індивідуальними властивостями, придатними для конкретного застосування.

Також спостерігається використання олігомерних структуруючих на основі модифікованого поліетилєнглїколю (ПЕГ, PEG). Поліетилєнглїколь – це полімер, який широко використовується в біомедичних матеріалах і належить до групи синтетичних амфїфільних полієфірів. Як комерційний продукт, ця сполука доступна в декількох варіантах, що відрізняються за молекулярною масою.

Поліетиленгліколь розчинний як у воді, так і в органічних розчинниках, характеризується нетоксичністю, біосумісністю, обмеженою імуногенністю та неантигенністю. Крім того, існує можливість швидкого виведення ПЕГ з організму, коли молекулярна маса сполуки не перевищує 1000 [83]. Модифікуючи поліетиленгліколь різними реакційноздатними групами отримують функціоналізовані полімери, які можна використовувати для синтезу гідрогелів. Поліетиленгліколь дигліцидиловий етер (PEGDE) є прикладом похідного ПЕГ який може виступати структуруючим агентом з гнучким полімерним ланцюгом, який є біосумісним і нетоксичним. Катанзано та співавтори [84] описали хімічно структурований хітозан з використанням дигліцидилового етеру поліетилегліколю. Автори спостерігали, що модуль Юнга отриманого матеріалу значно зменшувався зі збільшенням концентрації PEGDE і наближався до значення модуля людської шкіри. У даному дослідженні були виготовлені ранові пов'язки на основі хітозану з додаванням екстракту опунції фікусу, використання яких передбачало прискорення загоєння ушкоджень шкіри.

Хімічні методи структурування гідрогелів мають значні переваги, такі як висока точність у формуванні мережі та можливість регулювання властивостей, що надає їм необхідної механічної міцності. Однак у хімічно структурованих зразках можуть спостерігатися певні негативні явища: утворення малих кільцевих структур на одному полімерному ланцюзі; неповна полімеризація структуруючого агента, що призводить до наявності ненасичених функціональних груп на бічних ланцюгах полімеру, які не сприяють формуванню зшитої полімерної мережі й належать до неефективного зшивання [85]. Також до недоліків цих методів відносять потенційну токсичність деяких низькомолекулярних агентів структурування – глутаральдегід, формальдегід, карбодііміди, діізоціанати, діакрилати – можуть викликати токсичність через утворення нестабільних зв'язків і залишкову присутність в матеріалах [86, 87, 88, 89]. Проте, незважаючи на це, подальший розвиток хімічних методів і

впровадження нових біосумісних матеріалів дозволяють мінімізувати такі явища, роблячи хімічно структуровані гідрогелі перспективними для використання в клінічній практиці.

1.3.3. Гідрогелі з подвійною мережею

Гідрогелі з подвійною мережею (Double Network Hydrogels, DN-гідрогелі) — це інноваційний клас матеріалів, які складаються з двох взаємопроникних полімерних мереж, що забезпечують унікальну комбінацію високої міцності, гнучкості та здатності поглинати воду. Вони були вперше розроблені японськими вченими [90] і з того часу знайшли широке застосування в біомедицині, інженерії та промисловості. Подвійна мережа зазвичай складається з жорсткої та щільно зшитої мережі та другої м'якої та гнучкої, що дозволяє досягти високої механічної стійкості при збереженні гідрофільних властивостей. Обидві мережі переплітаються між собою завдяки фізичному або хімічному зшиванню. Під дією зовнішньої сили ці два шари взаємодіють, поглинаючи та розсіюючи зовнішнє навантаження, що сприяє підвищенню міцності гідрогелю [91].

Типові DN-гідрогелі синтезуються за допомогою двоетапної послідовної радикальної полімеризації. На першому етапі полімеризації формується жорстка та крихка мережа поліелектроліту з відносно високою концентрацією структуруючого агента, що призводить до утворення щільної мережевої структури. Цей крихкий поліелектролітний гідрогель повністю набрякає у водному розчині з високою концентрацією нейтрального мономеру, що містить відносно низьку концентрацію структуруючого агента, після чого другий мономер полімеризується, утворюючи гнучку мережу всередині першої мережі гідрогелю. Для надзвичайно високої міцності DN-гідрогелю дві полімерні мережі повинні мати сильний контраст у структурі: (1) перша мережа повинна бути жорсткою та крихкою, наприклад, поліелектроліт, а друга мережа — м'якою та пластичною, наприклад, нейтральний полімер; (2) перша мережа повинна бути щільно структурованою, тоді як друга мережа — слабоструктурованою; (3)

кінцева молярна концентрація другої мережі повинна бути у 20–30 разів вищою, ніж у першій мережі [92]. Іншими словами, DN-гідрогель має дуже специфічну структуру взаємопроникної мережі (IPN), і для отримання надзвичайно міцного DN-гідрогелю необхідний точний баланс між крихкою першою мережею та пластичною другою мережею.

За складом композитні гідрогелі з подвійною мережевою структурою можна розділити на дві основні категорії: органічно-неорганічні та органічно-органічні.

Органічно-неорганічні гідрогелі з подвійною мережею

Неорганічні компоненти неорганічно-органічних гідрогелів з подвійною мережею переважно включають оксид графену та природні мінерали тощо. Більшість дослідників досягають утворення неорганічно-органічних композитних мереж різних структур за допомогою двоетапного або одноразового методу. Спочатку готують специфічний полімерний розчин, наприклад, альгінат натрію, гідроксипропілцелюлозу, поліакрилову кислоту тощо. Потім оксид графену диспергують у деіонізованій воді та обробляють гідротермальним відновленням або відновниками для отримання мережі оксиду графену. Таким чином, у процесі самозбирання оксид графену формує одну мережу, яка співіснує з іншою мережею, утворюючи гідрогель з подвійною мережею. У роботі [93] використовували триетилентетрамін як структуруючий агент і нагрівали гідрогелі з одинарною мережею графен/альгінат при високій температурі для отримання аміно-функціоналізованих гідрогелів з подвійною мережею. Висока температура сприяла випадковому утворенню шарів графену, що призводило до формування мережі відновленого графен оксиду. Порівняно з гідрогелями з одинарною мережею, аміно-функціоналізовані гідрогелі з подвійною мережею демонструють покращені механічні властивості та термічну стабільність.

Органічно-органічні гідрогелі з подвійною мережею

Існують дослідження гідрогелів з подвійною мережею, заснованих на багатьох видах природних полімерних матеріалів як однієї з мереж гідрогелю,

таких як альгінат, хітозан, желатин, целюлоза, каррагенан, агароза, джут, пектин тощо [94, 95, 96, 97, 98].

У дослідженні [99] створено серію ін'єкційних гідрогелів з альдегідного метакрилат-модифікованого альгінату натрію та амінованого желатину (AMSA/AG) за допомогою двоетапного процесу. Альгінат натрію модифікували окислювачем для утворення альдегідних груп у макроланцюгах альгінату натрію (ASA), після чого в основний ланцюг ASA були додані метакрилатні групи. Желатин модифікували етилендіаміном для введення додаткових аміногруп. При змішуванні водних розчинів AMSA та AG швидко відбувалася реакція Шиффа, що призводило до утворення первинної мережі між альдегідними групами в AMSA та аміногрупами в AG. Потім дією ультрафіолетового світла ініціювали радикальні реакції метакрилатних груп у AMSA, що призводило до утворення вторинної мережі. Коефіцієнт набрякання підтвердив щільність зшитих мереж, а механічні властивості показали, що гідрогелі з подвійною зшитою мережею, ініційовані УФ-виромінюванням, мають покращені механічні характеристики порівняно з гідрогелями з одинарною мережею, утвореною тільки реакцією Шиффа. Результати показали, що фото-зшиті гідрогелі з подвійною мережею мають покращені механічні властивості, добру біосумісність і контрольовану швидкість деградації. Таким чином, ці гідрогелі можуть бути використані у регенеративній медицині як терапевтичні матеріали.

У роботі [96] автори розробили та синтезували гідрогелі з подвійною мережею желатин/поліакриламід, поєднуючи термооборотний та фізично зшитий желатин як першу мережу та ковалентно зшитий поліакриламід як другу мережу. Найцікавіше те, що гідрогелі желатин/поліакриламід з подвійною мережею без будь-яких хімічних структуруючих агентів у другій мережі дозволили досягти як високої механічної міцності, так і швидких самовідновлювальних властивостей. Шляхом регулювання температури нагрівання та часу відновлення відновлені гідрогелі желатин/поліакриламід могли досягати 53 % ефективності відновлення в фізіологічному діапазоні

температур, що значно розширює їх використання для біомедичних застосувань. Поєднання високої міцності, здатності до самовідновлення та самозагоєння робить гідрогелі желатин/поліакриламід перспективними кандидатами для подальшого розвитку та використання як термочутливих біоматеріалів у фізіологічних умовах.

До основних переваг гідрогелів з подвійною мережею можна віднести їх надзвичайну міцність, здатність до самовідновлення і здатність ефективно розсіювати енергію під час деформації. Однак існує ряд недоліків, такі як складність та, відповідно, висока вартість синтезу, також деякі компоненти можуть бути токсичними, а контроль деградації часто ускладнений. Це обмежує їх застосування в довгострокових імплантатах та вимагає додаткових досліджень для оптимізації. Незважаючи на недоліки, гідрогелів з подвійною мережею залишаються перспективними матеріалами для біомедицини, екології та інженерії. Подальші дослідження спрямовані на розробку нових біосумісних та біодеградуючих матеріалів, оптимізацію методів синтезу та розширення їх застосувань.

1.4. Вимоги, що висуваються до гідрогелів медичного призначення

Щоб ефективно виконувати свою терапевтичну функцію як основи для ранової пов'язки чи матриці для вивільнення медпрепаратів гідрогелі повинні відповідати ряду визначених вимог. Необхідно враховувати наступні критичні моменти, щоб максимізувати здатність гідрогелевих матеріалів до загоєння уражених шкірних покривів:

- 1) зменшувати поширення інфекції [100], оскільки під час інфікування бактерії потрапляють у рану і виділяють речовини, які заважають імунним клітинам і затримують процес загоєння;
- 2) забезпечувати або підтримувати вологе середовище, оскільки вологе середовище покращує процес загоєння, запобігаючи зневодненню та сприяючи ангіогенезу і синтезу колагену, а також повинен мати здатність поглинати раневий ексудат [101];

- 3) зупиняти кровотечу [102] якомога раніше, так, щоб втрата крові була мінімальною;
- 4) бути біосумісним [103];
- 5) не викликати алергії [104], оскільки це призведе до переривання процесу загоєння;
- 6) нетоксичний [105], щоб уникнути побічних ефектів;
- 7) володіти антимікробними властивостями [106], працювати на клітинному рівні, щоб зупинити ріст мікроорганізмів;
- 8) посилювати синтез сполучної тканини, підтримувати відповідну температуру тканини для посилення кровообігу в ділянці ураження [107],
- 9) забезпечувати газообмін між ушкодженою тканиною і навколишнім середовищем [108], оскільки загоєння ран потребує кисню. Кисень бере активну участь у проліферації клітин, ангіогенезі та синтезі білків,
- 10) мати високу механічну стабільність [109],
- 11) допускати можливість стерилізації [110];
- 12) легке нанесення і видалення з рани [111], не повинен прилипати до місця поранення, щоб уникнути травмування при видаленні.
- 13) біологічно розкладатися [112];

При тому, що практично не існує гідрогелів які би відповідали всім переліченим вимогам в одному матеріалі тематика продовжує розвиватися. Створюються все нові варіанти гідрогелевих систем акцент у яких все більше зміщується в область використання полімерів природнього походження. Желатин, альгінат натрію, хітозан, колаген, шовк, гіалуронова кислота та інші, все частіше фігурують як компоненти для створення гідрогелевих систем медичного призначення, через їх відповідність основним з вище перелічених вимог [113, 114, 115, 116].

1.5. Застосування гідрогелів як ранових покриттів.

Рана – це пошкодження або погіршення стану нормальної шкіри чи тканин, спричинене різними стресовими факторами. Загалом рани класифікують на три

категорії: (1) механічні травми, що виникають унаслідок зовнішніх впливів, таких як бойові поранення, дорожньо-транспортні пригоди та хірургічні розрізи; (2) термічні та хімічні травми, спричинені впливом температури або хімічних речовин, наприклад, опіки та обмороження; (3) хронічні виразкові рани.

Через високу частоту та поширеність травматичних ушкоджень у суспільстві регенерація шкірних ран завжди була важливою складовою лікування [117]. Завдяки досягненням сучасної медицини методи загоєння ран стали більш різноманітними, адаптованими до конкретних обставин та умов [118]. З'явилася велика кількість нових пристроїв [119], клінічних препаратів і біологічних матеріалів, зокрема методи точного хірургічного очищення ран [120], терапія негативним тиском, використання факторів росту [121], біоінженерні замінники шкіри [122] і різноманітних функціональних біомедичних матеріалів [123].

Серед цих підходів особливо важливу роль відіграють біоматеріали, оскільки вони сприяють загоєнню ран [124]. Тому багато досліджень зосереджені на розробці нових матеріалів для відновлення пошкоджених тканин, таких як гідрогелеві пов'язки, желатинові губки тощо.

Всі типи ран (гострі і хронічні) вимагають якісного клінічного догляду, щоб запобігти уповільненому процесу загоєння, який може бути спричинений мікробними інфекціями та іншими негативними факторами. На ринку представлено понад 300 видів засобів для перев'язування ран, проте, одна і та ж пов'язка не може бути застосована для лікування ран всіх типів [125]. Обсяг світового ринку лікування хронічних ран у 2021 році оцінювався в 11,61 мільярда доларів США. Очікується, що ринок зросте з 12,36 мільярда доларів США у 2022 році до 19,52 мільярда доларів США до 2029 року, демонструючи сукупний середньорічний темп зростання 6,7 % протягом прогнозованого періоду [126].

Актуальним є створення нових лікарських форм з пролонгованим і контрольованим вивільненням лікарських речовин, які, окрім того, є зручними для синтезу та використання. Широкого розвитку набуває розроблення нових

лікарських форм з іммобілізованими препаратами. Гідрогелі стали перспективними кандидатами для ранових пов'язок завдяки їхній здатності підтримувати вологе середовище, полегшувати газообмін і сприяти регенерації тканин [127, 128, 129].

Завдяки тому, що структури гідрогелів подібні до позаклітинного матриксу багатьох тканин, можливо, не наносячи додаткових ушкоджень, заповнювати рани, сорбувати виділення і доставляти туди лікарські речовини, сприяючи прискореній регенерації тканин [130, 131, 132].

Ще одною перевагою є можливість конструювання гідрогелів із високою біодоступністю та відсутністю імунної відповіді. Біоміметична природа гідрогелів, їх здатність до підтримання вологого середовища при загоєнні ран і регенерації шкіри є надзвичайно корисною для отримання позитивних результатів лікування особливо у випадку опікових ран [133,134]. Включення до складу гідрогелів протимікробних речовин та різних біологічно активних сполук дає можливість використовувати їх у формі пов'язок для ефективного лікування хронічних/інфікованих ран [135,136]. Розробка ідеальних перев'язувальних матеріалів з бажаними антибактеріальними і високими ранозагоювальними властивостями все ще залишається основною проблемою, що впливає на регенерацію бактеріально інфікованих ранових тканин [137].

Недоліки гідрогелевих матеріалів відомі, – вони зазвичай характеризуються недостатньою міцністю та мають обмежені можливості щодо вивільнення гідрофобних молекул, але їх здатність до модифікації може суттєво розширити потенційне застосування таких матеріалів. Як зазначено у [138], включення гідрофобної складової надає гідрогелям унікальних амфіфільних властивостей, здатності реагувати на зовнішні чинники відкриваючи нові можливості для доставки ліків і створення смарт-матеріалів. Показано можливість модифікування гідрогелів циклодекстрину для доставки гідрофобного бейкалейну, що може мати потенціал для біомедичних застосувань, зокрема таких як контрольована система доставки гідрофобних препаратів [139].

Раніше в [140] запропоновано одержання біорозкладних ферментно зшитих желатин-альгінатних напів-IPN гідрогелевих пов'язок з куркуміном, також у [141] описано метод одержання при структуруванні в 5 % розчині CaCl_2 желатин-альгінатного гідрогелю з включеними жировими стовбуровими клітинами для регенерації шкіри. Проте ці методи мають певні недоліки та досить часозатратні за рахунок багатостадійності отримання гідрогелевого матеріалу.

В останні роки гідрогелі на основі природних полімерів, таких як желатин, пектин, хітозан і альгінат натрію, привернули значну увагу в догляді за ранами. Желатин, отриманий з колагену, має відмінну біосумісність і здатність до біологічного розкладання, що робить його придатним для використання в медицині [142, 143]. Альгінат натрію, отриманий з морських водоростей, має унікальні гелеутворювальні властивості та широко досліджувався на ранозагоювальний потенціал [144, 145]. Для ефективного лікування ран гідрогелі на основі біополімерів розглядаються як сучасні матеріали, які можуть створити сприятливе середовище для загоєння, одночасно захищаючи рану від зовнішніх подразників і забруднень [131].

Підсумки до розділу I

Останніми роками було досягнуто певних успіхів у розвитку в області гідрогелевих матеріалів. Однак потрібне подальше розуміння раціональної регуляції структури та властивостей гідрогелів, щоб відповідати різноманітним вимогам у повсякденному житті.

Гідрогелі виявляють певні обмеження, такі як недостатня механічна міцність при тривалому навантаженні, зміна властивостей в різних умовах середовища, передчасна деградація, складність стерилізації, обмежена доставка гідрофобних препаратів. Простежується залежність цих обмежень від їхньої природи, хімічного складу та топології мережі гідрогелів. Ці недоліки можна усунути, до прикладу, створюючи подвійно зшиті мережі та тонко оптимізуючи процеси виготовлення і використання.

Гідрогелі з унікальними властивостями, насамперед, будуть відповідними кандидатами для електроніки, сенсорики, візуалізації клітин, доставки ліків і тканинної інженерії. Слід зазначити, що подальші застосування гідрогелів можуть бути розширені для створення штучної шкіри, м'якої робототехніки, генерації тканин, 3D-друку, засобів догляду за ранами у концепції персоналізованої медицини тощо.

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

ВИХІДНІ РЕЧОВИНИ, МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ СИНТЕЗІВ ТА АНАЛІЗІВ

2.1. Вихідні речовини та їх характеристики

Желатин bloom 180 (Gelatin, E441), номер CAS: 9000-70-8, природний біополімер з молярною масою 100 – 500 кДа (Сфера Сім). Основа – колаген, містить: білки, жири, вуглеводи, крохмаль, мікро та макроеlementи, вітамін РР, 18 амінокислотних залишків. Сипучий твердий продукт, від світло-жовтого до темно-жовтого кольору, без запаху. Розчинний в диметилсульфоксиді, набрякає у воді з утворенням драглів, 10 % драглі желатини плавляться при температурі вище 30 °С. Використовували без додаткової очистки, перед використання перевіряли вміст вологи і враховували перед завантаженням. Молекулярну масу визначали методом ексклюзійної хроматографії (SEC).

Альгінат натрію (Alginic acid sodium salt), номер CAS: 9005-38-3, полісахарид, що складається із залишків D-маннуринової і L-гулуринової кислот. Ланки гулуринової і маннуринової кислот, зв'язані в основному глікозидними зв'язками, з невеликими розгалуженнями. У карбоксильних групах водень заміщений натрієм. Смаку і запаху не має, здатність утворювати драглі у нього у 4 рази вища ніж у желатину, при тривалому кип'ятінні своїх властивостей не змінює. При розчиненні у воді утворює колоїдний розчин, але не розчинний у спирті (і водно-спиртових розчинах із вмістом спирту більше ніж 30 %), органічних розчинниках, кислих середовищах із водневим показником $\text{pH} < 3$. Застосовували товарну форму у вигляді білого порошку без додаткової очистки. Молекулярну масу визначали методом ексклюзійної хроматографії (SEC).

Полі(оксиетилен) (Поліетиленгліколь, PEG), номер CAS: 25322-68-3, молярної маси 200, 400, 600, 1000, 1500 Да (Aldrich). В залежності від середньої молярної маси полімери – 300-1000 Да в'язкі рідини, 1500-2000 Да – пастоподібні або тверді речовини. Змішуються з водою. Розчинні в багатьох

органічних розчинниках: бензені, тетрахлорметані, хлороформі, N,N-диметилформаміді, ацетонітрилі. Для очищення від домішок води до відповідного поліетиленгліколю (PEG) додавали бензен та відганяли азеотропну суміш бензен-вода (68.8 °C), далі відганяли бензен (80 °C). Залишки бензену із зразка PEG видаляли у вакуумі до постійної маси.

Полі(оксиетилен) дигліцидил етер (PEG diglycidyl ether, PEGDE 500, poly(ethylene glycol) diglycidyl ether) виробництва Sigma-Aldrich, номер CAS: 26403-72-5, молярна маса 500 г/моль, епоксид поліетиленгліколю-400, безбарвна рідина, розчинна у воді, етанолі, метанолі, ацетоні. Використовували як структуруючий агент для синтезу гідрогелів без додаткової очистки.

3-хлор-1,2-пропіленоксид (Епіхлоргідрин, (Chloromethyl)oxirane), номер CAS: 106-89-8, хлорорганічна сполука та епоксид, молярна маса 92.52 г/моль, безбарвна рідина, має гострий, часниковий запах. Помірно розчинний у воді (7 % при 20 °C), змішується з більшістю полярних органічних розчинників, щільність $\rho = 1.181 \text{ г/см}^3$, показник заломлення $n_d^{20} = 1.438$. Використовували для синтезу структуруючих агентів на основі поліетиленгліколів різної молекулярної маси. Перед застосування переганяли ($T_{\text{кип}} = 117.9 \text{ °C}$) для очищення від домішок.

Вода бідистилят, номер CAS: 7732-18-5, щільність $\rho = 0.998 \text{ г/см}^3$ (20 °C), показник заломлення $n_d^{20} 1.333$, питома електропровідність менше 5 мкСм/см.

Буферний розчин pH 5,2 (Sodium acetate buffer solution (pH 5.2±0.1 (25 °C), для молекулярної біології, 3 М, фільтрований через мембрану 0.2 мкм), номер CAS: 126-96-5 (Sigma-Aldrich - S7899).

Буферний розчин pH 7 (di-sodium hydrogen phosphate/potassium dihydrogen phosphate, pH 7.00), виробник Supelco.

Кальцій хлорид (Calcium chloride, кальцій хлористий), номер CAS: 10043-52-4, кальцієва сіль хлоридної кислоти з молекулярною формулою CaCl_2 , зовнішній вигляд – білі кристали, щільність – 2.15 г/см^3 , молярна маса – 110.98

г/моль, температура плавлення $T_{пл} = 772\text{ }^{\circ}\text{C}$. Дуже гігроскопічний, поглинає вологу з навколишнього середовища з утворенням кристалогідратів.

Натрій хлорид (Sodium chloride, кухонна сіль), номер CAS: 7647-14-5, неорганічна сполука з хімічною формулою NaCl, солоний на смак, зовнішній вигляд – прозорі білі кристали, щільність – 2.16 г/см^3 , молярна маса – 58.44 г/моль , температура плавлення – $801\text{ }^{\circ}\text{C}$, температура кипіння – $1413\text{ }^{\circ}\text{C}$, показник заломлення $n_d^{20} 1.5442$ (589 нм). Розчиняється у воді, аміаку, етанолі, метанолі, формаїді, пропіленгліколі, гліцерині, мурашиній кислоті, не розчиняється в водні розчині повністю дисоціює на хлорид-аніони та катіони натрію. Застосовували для приготування модельного ексудату без додаткової очистки.

2-аміно-2-гідроксиметил-пропан-1,3-діол (TPIC), номер CAS: 115-69-5, хімічна формула $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, широко застосовується в молекулярній біології та біохімії для приготування буферних водних систем та розчинення нуклеїнових кислот. Молярна маса – 121.14 г/моль , температура плавлення – $175\text{ }^{\circ}\text{C}$, температура кипіння – $219\text{ }^{\circ}\text{C}$. Застосовували для приготування модельного ексудату без додаткової очистки.

Бичачий альбумін (Bovine Serum Albumin, BSA), ліофілізований порошок, $\geq 96\%$ (агарозний гель-електрофорез), номер CAS: 9048-46-8 (Sigma-Aldrich - A2153). Застосовували для приготування модельного ексудату без додаткової очистки.

Модельний ексудат – розчин з $\text{pH} = 7.4 - 7.5$, що моделює ексудат, готували відповідно до наступної методики: в мірну колбу на 100 мл вносили 0.222 г CaCl_2 , 2.338 г – NaCl, 0.968 г - TPIC і $2\text{ г} - 5\%$ водного розчину альбуміну (BSA). Розчиняли солі при перемішуванні і доводили дистильованою водою до мітки. Отриманий розчин при зберіганні при $2 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, придатний для використання упродовж 7 діб. Використовували в дослідах набрякання зразків гідрогелів і вивільнення активних речовин.

Проп-2-енамід (Акриламід, Acrylamide), номер CAS: 79-06-1, органічна сполука, амід акрилової кислоти, молярна маса 71.08 г/моль. За звичайних умов біла, кристалічна речовина. Розчиняється у воді – 2155 г/л (20 °C), бензені – 3,46 г/л (30 °C), хлороформі – 26.6 г/л (30 °C), щільність $\rho = 1.122$ г/см³ (30 °C), температура плавлення – 84.5 °C, температура кипіння – 192.6 °C. Проявляє сильні нейротоксичні властивості. Використовували при синтезі поліакриламідів різної молекулярної маси.

Моногідрохлорид 2,6-діаміногексанової кислоти (Лізин гідрохлорид, Lys, (S)-2,6-Diaminohexanoic acid monohydrochloride, E642), номер CAS: 657-27-2, товарна форма незамінної аліфатичної амінокислоти лізину, випускається у вигляді білого порошку з вмістом основної речовини ≥ 98 %, розчинний у воді – 60 г/100 мл (20 °C), щільність $\rho = 0.65-0.7$ г/см³, молярна маса 182.65 г/моль, (Sigma Aldrich). Використовували без додаткової очистки.

Гідроген хлорид (Хлоридна кислота, Соляна кислота, Hydrochloric acid), номер CAS: 7647-01-0, розчин хлороводню у воді з хімічною формулою HCl, молярна маса – 36.46 г/моль. Концентрована соляна кислота містить 37 % HCl, щільність $\rho = 1.19$ г/см³, азеотропна суміш, що містить 20.2 % HCl кипить при температурі 109.7 °C. Речовина з різким запахом, на повітрі димить через виділення газоподібного хлороводню. Використовували розчини з різною молярною концентрацією для регулювання водневого показника реакційних сумішей.

Натрій гідроксид (каустична сода, їдкий натр, Sodium Hydroxide), номер CAS: 1310-73-2, гідроксид з хімічною формулою NaOH, найчастіше у вигляді білих непрозорих кристалів, дуже гігроскопічний, молярна маса 39.997 г/моль, щільність 2.13 г/см³, температура плавлення – 323 °C, температура кипіння – 1388 °C, добре розчинний у воді.

Дихлорометан (Метилен хлористий, Dichloromethane), номер CAS: 75-09-2, прозора легкокорухома і легколетка рідина з характерним для галогенпохідних солодкуватим запахом, молярна маса 84.93 г/моль, хімічна формула CH₂Cl₂.

Змішується з метанолом і діетиловим етером, розчиняється в тетрахлорометані, щільність $\rho = 1.33 \text{ г/см}^3$ (20 °C), показник заломлення $n_d^{20} 1.4242$, температура плавлення – -96.7 °C, температура кипіння – 40 °C. Для очищення від домішок промивали концентрованою сірчаною кислотою, водою, і нейтралізували розчином 5 % лугу. Промивали водою до pH = 7, сушили над безводним сульфатом магнію і переганяли.

Диметилсульфоксид (DMCO, DMSO, Dimethyl sulfoxide), номер CAS: 67-68-5, органосірчана сполука, емпірична формула $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, безбарвна висококипляча рідина, молярна маса 78.13 г/моль, щільність $\rho = 1.1 \text{ г/см}^3$, показник заломлення $n_d^{20} 1.4793$, температура плавлення – 18 °C, температура кипіння – 189 °C. Апротонний сильнополярний розчинник, розчинний у воді та інших органічних розчинниках – етанолі, ацетоні, етилацетаті, тетрахлорометані.

Етанол (етилловий спирт, EtOH), номер CAS: 64-17-5, органічна сполука з хімічною формулою $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, безбарвна легкозаймиста рідина з характерним спиртовим запахом, молярна маса 46.068 г/моль, щільність $\rho = 0.7893 \text{ г/см}^3$, показник заломлення $n_d^{20} 1.3611$, температура плавлення – -114.14 °C, температура кипіння – 78.29 °C, добре змішується з водою. Перед використанням переганяли і перевіряли показник заломлення.

Метанол (метилловий спирт, Methanol), номер CAS: 67-56-1, спирт з хімічною формулою CH_3OH , летка, безбарвна, легкозаймиста рідина за звичайних умов, молярна маса 32.04 г/моль, щільність $\rho = 0.7918 \text{ г/см}^3$, показник заломлення $n_d^{20} 1.329$, температура плавлення – -98 °C, температура кипіння – 64.7 °C, добре змішується з водою. Перед використанням переганяли і перевіряли показник заломлення.

Пропан-2-ол (ізопропіловий спирт), номер CAS: 67-63-0, органічний розчинник з хімічною формулою $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$, безбарвна легкозаймиста рідина за нормальних умов, молярна маса 60.1 г/моль, щільність $\rho = 0.786 \text{ г/см}^3$, показник заломлення $n_d^{20} 1.3772$, температура плавлення – -98.5 °C, температура кипіння – 82.4 °C. Нерозчинний в сольових розчинах, добре змішується з водою,

бенzenом, хлороформом, етанолом, етером, гліцеринoм. Перед використанням переганяли і перевіряли показник заломлення.

Магній сульфат (Magnesium sulfate) безводний, номер CAS: 7487-88-9, хімічна формула MgSO_4 , порошок або гранули білого кольору, молярна маса 120.366 г/моль, щільність $\rho = 2.66 \text{ г/см}^3$ (ангідрид), показник заломлення n_d^{20} 1.523 (моногідрат), температура плавлення (розкладу) – $-1124 \text{ }^\circ\text{C}$ (ангідрид), нерозчинний в ацетоні, слабoрозчинний в етанолі та гліцеролі, добре розчинний у воді. Використовували для осушення органічних розчинників.

Полі(імінокарбонімідоіліміно-1,6-гександіол) гідрохлорид (Полігексаметиленгуанідин гідрохлорид, ПГМГ), номер CAS: 57028-96-3, чистота $\geq 96 \%$, хімічна формула $(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_3)_n \cdot \text{HCl}$, добре розчиняється у воді. Водний розчин з концентрацією 0.02 % використовували як бактерицид під час приготування гідрогелевої композиції.

2-(діетиламіно)-N-(2,6-диметилфеніл)ацетамід гідрохлорид (Лідокаїн гідрохлорид, Lidocaine), номер CAS: 6108-05-0, чистота $\geq 98 \%$ (Aldrich), порошок білого кольору, хімічна формула $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$, молярна маса: 288.81 г/моль. Застосовували у вигляді водного розчину для насичення зразків гідрогелів.

2-(діетиламіно)етил 4-амінобензоат гідрохлорид (Новокаїн, Novocaine, procaine (hydrochloride)), номер CAS: 51-05-8, вміст основної речовини $\geq 98 \%$ виробництва Cayman Chemical Co., хімічна формула $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$, молярна маса: 272.8 г/моль. Застосовували у вигляді водного розчину для насичення зразків гідрогелів.

Натрієва сіль 2-[(2,6-дихлорфеніл)аміно]бензоїтової кислоти (Диклофенаку натрієва сіль, Diclofenac sodium salt), номер CAS: 15307-79-6, виробництва Aldrich, хімічна формула $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NNaO}_2$, молярна маса: 318.13 г/моль. Застосовували у вигляді водного розчину для насичення зразків гідрогелів.

Розчин хлоргексидину біглюконату (Chlorhexidine digluconate solution), номер CAS: 18472-51-0, 20 - 25 % у воді (Aldrich), використовували без додаткового очищення, перед використанням перевіряли вміст сухої речовини.

Фізіологічний розчин (Saline), номер CAS: 7647-14-5, 0.9 % розчин натрію хлориду у воді (Aldrich), використовували як модельну рідину для дослідження набрякання зразків гідрогелів.

Фосфатний буферний сольовий розчин (Phosphate buffered saline (PBS)) виробництва Aldrich, порошок, використовували для приготування водного розчину з $\text{pH} = 7.4$. Водний розчин застосовували як модельну рідину для дослідження набрякання зразків гідрогелів.

Розчин Рінгера (Ringer solution). Для приготування розчину Рінгера використовували таблетки Ringer виробництва компанії Sigma Aldrich. Водний розчин застосовували як модельну рідину для дослідження набрякання зразків гідрогелів.

2.2. Методики синтезів та експериментів

2.2.1. Синтез структуруючих на основі поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси

Натрій гідроксид у гранулах розтирають у порошок у металевій ступці. Зважують розраховану кількість гідроксиду натрію (0,3 моль) і завантажують в тригорлий реактор об'ємом 250 мл. Додають поліетиленгліколь (0,1 моль) та 1-1,5 мл води.

Реактор поміщають у водяну баню, під'єднують зворотній холодильник і механічну мішалку, інтенсивно перемішують, температуру в бані підтримують на рівні 25-30 °C. Епіхлоргідрин (1 моль) повільно прикапують через крапельну лійку при постійному перемішуванні. Після того, як додано всю порцію ЕХГ, температуру в бані піднімають до 40 °C і витримують 2,5 год при постійному перемішуванні. Далі після остигання в реактор вносять 100 мл метилену хлористого, перемішують, одержаний розчин фільтрують від непрореагованого луку і натрій хлориду через фільтрувальний папір. Отриманий фільтрат

засипають прожареним магній сульфатом, перемішують і залишають на 12 год. Потім знову фільтрують від осушувача. Розчин продукту переносять у круглодонну колбу, під'єднують холодильник Лібіха і відганяють метилен хлористий. Далі температуру в бані піднімають до 110 - 120 °С і упарюють у вакуумі масляного насоса залишки непрореагованого ЕХГ до постійної маси продукту. Одержаний продукт зберігають у щільно закритій тарі при температурі +4 °С.

2.2.2. Визначення вмісту епоксидних груп

У три круглодонні колби зважують точні наважки продукту ($0,1 \pm 0,05$ г) і розчиняють у 15 мл пропанону. За допомогою бюретки до розчинів вносять по 3 мл 0,5 N соляної кислоти і кип'ятять із зворотнім холодильником на водяній бані упродовж 1 год. Одночасно ставлять холостий (контрольний) дослід без наважки. Після повного остигання всі проби потенціометрично титрують 0,4 N розчином натрій гідроксиду. За допомогою програми Origin диференціюють отриману криву та визначають еквівалентний об'єм лугу, який пішов на титрування кожної проби і за наведеною нижче формулою визначають вміст епоксидних груп у продукті:

$$\frac{(V_x - V_T) \cdot N_{NaOH} \cdot k_{NaOH} \cdot M_{\text{прод.}}}{1000 \cdot 2 \cdot m_{\text{прод.}}} \cdot 100 \% \quad (2.1)$$

Де

V_x – об'єм лугу, який пішов на титрування кислоти у контрольній пробі, мл;

V_T – об'єм лугу, який пішов на титрування кислоти у дослідному зразку, мл;

N_{NaOH} – нормальність лугу;

k_{NaOH} – поправочний коефіцієнт лугу;

$M_{\text{прод.}}$ – молекулярна маса продукту, г/моль;

$m_{\text{прод.}}$ – маса наважки взятої на титрування, г;

2 – число «2» використовується в тому випадку, якщо передбачається, що у продукті ланка заміщена по обох кінцях на епоксидні групи.

2.2.3. Гідроліз диіліцидирових етерів поліетиленгліколів різної молекулярної маси

Визначення проводили за допомогою ^1H ЯМР спектроскопії у дейтерованій воді безпосередньо у пробірці для ЯМР спектроскопії. Пробірки із зразками прогрівали задані проміжки часу (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 год) при температурах 70, 80 та 90 °C. Після кожного періоду зразок миттєво охолоджували і знімали ПМР-спектр.

2.2.4. Синтез желатинових гідрогелів структурованих диіліцидировими етерами поліетиленгліколів

Для отримання гідрогелю використовували желатин тип А, структуруючі агенти різної молекулярної маси PEGDE 300, 500, 700, 1100, і дистильовану воду. Готували водний розчин желатину концентрацією 20.0 %, який перемішували на водяній бані при 40 °C впродовж 30 хв. PEGDE, розчин желатину та воду зважували в підготовлені контейнери. Синтез гідрогелю проводили за різного вмісту зшивача PEGDE, але сумарний вміст полімерів у кожному зразку гідрогелю був сталим і становив 18.0 %, решту 82.0 % – дистильована вода. Після гомогенізування суміші контейнери герметизували і нагрівали їх при 80 °C впродовж 4 годин.

2.2.5. Синтез желатинових гідрогелів з хлоргексидином

Для досліджень вивільнення хлоргексидину та антисептичних властивостей гідрогелів синтезували зразки аналогічно методиці 2.2.3 описаній вище, вносячи в реакційну суміш розчин хлоргексидину біглюконату на стадії синтезу на заміну відповідної частки дистильованої води. Відсоткові завантаження показані в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Зразки желатинових гідрогелів з різним вмістом хлоргексидину біглюконату

Номер зразка	Масове співвідношення		Вміст PEGDE 500, %	Вміст желатину, %	Вміст ХГ, %
	PEGDE 500	Желатин			
1	1	5	3.00	15.00	0.10

2					0.25
3					1.00
4					0.00

2.2.6. Синтез желатин-альгінатних гідрогелів структурованих діоксирановими похідними поліоксиетиленгліколів

Для отримання гідрогелю використовували желатин тип А, альгінат натрію, структуруючий агент PEGDE 500 та дистильовану воду. Готували водний розчин желатину концентрацією 20.0 %, водний розчин альгінату натрію – 4.0 %, кожен з розчинів перемішували на водяній бані при 40 °С до повного розчинення. Розчини желатину й альгінату змішували у пропорції 10 до 1, відповідно, в перерахунку на суху речовину, та додавали необхідну кількість PEGDE 500 і дистильованої води. Суміш гомогенізували і зважували у підготовлені контейнери, герметизували їх і нагрівали при температурі $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 2-12 годин.

2.2.7. Дослідження вивільнення медикаментів із зразків гідрогелів

Зразки желатин-альгінатних гідрогелів спочатку методом вичерпного набрякання насичували розчинами медикаментів в заданих кількостях (на грам зразка): лідокаїн гідрохлорид – 55 - 60 мг/г; новокаїн – 4 - 5 мг/г; диклофенак натрію – 20-25 мг/г; хлоргексидину біглюконату – 15-20 мг/г.

Вивільнення лідокаїну, новокаїну, диклофенаку, хлоргексидину із зразків гідрогелів (діаметр ~ 15 мм, висота ~ 4.0 мм, маса ~ 1 г) проводились у модельні середовища: фосфатно-сольовий буфер (PBS), а також в 0.001 % розчин протеази у PBS. Для дослідження використовували вертикальну комірку Франца (PermeGear, Німеччина) з площею дифузії 3.53 cm^2 і об'ємом акцепторного відділення – 5 мл; зразок гідрогелю і середовища вивільнення розділявся високопористою мембраною (Sartorius Stedim Biotech, Німеччина) з регенованої целюлози товщиною $200\text{ }\mu\text{m}$ з розміром пор $0.45\text{ }\mu\text{m}$ та загальною пористістю 80-85 %, яка забезпечувала безперешкодний контакт з рецепторним середовищем. Експерименти проводили в трьох повторах при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ і перемішуванні 480 об/хв протягом 24 годин.

Через задані проміжки часу (2, 4, 6, 24 год) відбирали по 0.2 – 0.4 мл проби кожного зразка з акцепторного відсіку і додавали аналогічний об'єм водного середовища, щоб підтримувати умови поглинання в системі шляхом підтримки постійного початкового об'єму. Вимірювали концентрацію препаратів у відібраних пробах методом УФ-спектрофотометрії на приладі UV3100PC; використовували кварцеві кювети товщиною 10 мм (Malvern, Велика Британія) з тефлоновим корком типу PCS8501. Заміри проводили при довжині хвилі $\lambda = 262.8$ nm для лідокаїну; $\lambda = 291$ nm – новокаїну; $\lambda = 276.4$ – диклофенаку; $\lambda = 255.5$ – хлоргексидину. Концентрацію (C, %) препаратів в розчині визначали за рівняннями калібрувальних графіків $C = (Abs + 0,0063)/16,0$ для лідокаїну; $C = (Abs + 0,0041)/653,0$ – новокаїну; $C = (Abs + 0,001)/310,0$ – диклофенаку; $C = (Abs + 0,0304)/297,0$ – хлоргексидину. Ступінь вивільнення (R_d ; [%]) визначали за формулою:

$$R_d = \frac{m_{dss} \times C \times m_{ss}}{m_s \times m_{ch}} \quad (2.2)$$

де m_{dss} – маса розведеного розчину зразка; [г]

C – концентрація препарату у досліджуваному розчині, визначена на УФ-спектрофотометрі за допомогою калібрувального графіку; [%]

m_{ss} – маса вихідного розчину; [г]

m_s – маса зразка; [г]

m_{ch} – маса препарату у зразку; [г].

2.2.8. Визначення молекулярної маси прищеплених кополімерів желатину методом ексклюзійної хроматографії (SEC)

Вимірювання SEC проводили при кімнатній температурі, використовуючи хроматографічну систему, що складається з насоса PU-980 та УФ-детектора UV-975 (Jasco Corp., Японія), а також мультикутового лазерного світлорозсіювача Dawn DSP MALS (Wyatt Technology Corp., США). Для детектування концентрації вимірювали абсорбцію при 660.6 нм. Коефіцієнт поглинання становив 1.331. Для хроматографічних розділень використовували колонку

Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Німеччина) зі швидкістю потоку елюенту 0.8 мл/хв.

Підготовка зразків

Для підготовки зразків 50 мг сухого желатину набрякали протягом 1 години в 10 мл буферного розчину при 10 °С, після чого розчиняли при 60 °С. Теплий розчин фільтрували через ацетатцелюлозний мембранний фільтр з порами 0,2 мкм. Загалом 20 мкл фільтрованого розчину вводили в систему.

Оцінка даних

Дані збирали та аналізували за допомогою програмного забезпечення ASTRA SEC (Wyatt Technology Corp., США). Обчислення середньої маси (M_w) та середнього радіуса гірації ($\langle s^2 \rangle^{1/2}$) проводили згідно з рівняннями 1 та 2 для кожного розділеного сектора розсіювальної хроматограми, будуючи графік Kc/R_θ проти $\sin^2(\theta/2)$ (графіки Цімма).

$$R_\theta = \frac{(I_{\theta(P)} - I_{\theta(S)})r_D^2}{I_0 V_0} \quad (2.3)$$

де R_θ – це співвідношення Релея при куті θ , I_θ – інтенсивність розсіювання полімерного розчину (P) і розчинника (S) при куті θ , I_0 – інтенсивність падаючого випромінювання, r_D – відстань між детектором і об'ємом розсіювання, V_0 – об'єм розсіювання.

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle s^2 \rangle z^{1/2} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \right) + 2 A_2 c \quad (2.4)$$

де K – це оптична константа, M_w – середня маса молекули, c – концентрація полімеру в розчині, λ – довжина хвилі лазерного світла, $\langle s^2 \rangle z^{1/2}$ – середній радіус гірації, A_2 – другий віральний коефіцієнт, і

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (2.5)$$

де рефракційний індекс розчинника n_0 , довжина хвилі світла у вакуумі λ_0 , постійна Авогадро N_A , і $(\partial n / \partial c)$ – інкремент рефракційного індексу.

Значення підганяли за допомогою полінома першого порядку. Поліноми вищого порядку давали гірші результати підгонки. Екстраполяція до $c \rightarrow 0$ не

була потрібна, оскільки концентрація в кожному секторі була дуже низькою ($150 \text{ mAU} \approx 10 \text{ мкг/мл}$), тому вплив другого віріального коефіцієнта можна було ігнорувати. $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ обчислювали зі нахилу ліній для молекул достатнього розміру в діапазоні $2\langle s^2 \rangle^{1/2} > \lambda/20$ ($M_w \approx 100\,000 \text{ г/моль}$).

Значення інкременту рефракційного індексу $\delta n/\delta c$ вимірювали за допомогою диференціального рефрактометра Optilab T-rEX (Wyatt Technology Corp., США) з лазером ($\lambda = 633 \text{ нм}$). Для желатину $\delta n/\delta c$ становило $0.190 \text{ см}^3/\text{г}$ ($\pm 1.25 \%$) при 20°C . Це значення добре узгоджується з іншими значеннями для різних видів желатину, які коливаються в діапазоні від 0.185 до $0.195 \text{ см}^3/\text{г}$.

2.2.9. Реологічні характеристики розчинів полімерів

Показники в'язкості розчинів біополімерів та їх сумішей вивчали за допомогою ротаційного віскозиметра Rheotest 2. Готували ряд розчинів при різних співвідношеннях желатину та альгілату натрію (від 1:1 до 15:1 відповідно) з сумарною концентрацією біополімерів 1% у дистильованій воді. Динамічну в'язкість розраховували за формулою:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2.6)$$

де:

η - динамічна в'язкість, $[\text{сР}]$;

τ - зсувна напруга, $[\text{Па}]$;

$\dot{\gamma}$ - швидкість зсуву, $[\text{с}^{-1}]$.

2.2.10. Реологічні характеристики зразків гідрогелів

Наномеханічні випробування (наноіндентування)

Гідрогелі інкубували протягом 2 год у фосфатному буферному розчині (PBS, pH 7.44) при 20°C і 37°C . Буфер готували розведенням $10\times$ концентрату (Fisher Scientific) у деіонізованій воді Milli-Q (клас чистоти 1). Наномеханічну характеристику гідрогелів виконували на приладі Ravone Nanoindenter (Optics11 Life) з використанням зонда жорсткістю 0.48 Н/м та радіусом вістря 9 нм . Вимірювання проводили у 6-луночних планшетах Sarstedt у вказаному буфері при 20°C та 37°C . Для кожної формули вимірювали 3 окремі зразки гідрогелю.

Модуль Юнга розраховували за отриманими силово-деформаційними кривими з використанням програмного забезпечення Optics11 Life. Усі етапи експерименту виконували у стерильних умовах. Калібрування зонда проводили перед кожною серією вимірювань. Статистичний аналіз проводили за допомогою ANOVA ($p < 0.05$ вважали статистично значущим).

Визначення деформації (амплітуди)

Зразок гідрогелю перед вимірюванням інкубували 2 години при 20 °C і 37 °C. Дослідження деформації проводили за допомогою модульного компактного динамічно ротаційного реометра Anton Paar MCR302 з використанням паралельного пластинчастого датчика (діаметр пластини 9.975 мм) при відповідних температурах (20 °C і 37 °C).

Потім проводили деформаційне сканування від 0,1 до 100 % деформації зсуву (логарифмічне сканування) при постійній кутовій частоті $\omega = 10 \text{ рад} \times \text{с}^{-1}$. Кожен зразок вимірювали в трьох екземплярах, а результати усереднювали для кожної вимірюваної точки. Отримані криві використовували для визначення лінійної в'язкопружної області (LVR) для подальшої частотної характеристики.

Частотна характеристика

Зразок гідрогелю перед вимірюванням інкубували 2 години при 20 °C і 37 °C. Частотну характеристику вимірювали на модульному компактному ротаційному реометрі Anton Paar MCR302 з використанням паралельного пластинчастого датчика (діаметр пластини 9.975 мм) при відповідних температурах (20 °C і 37 °C). Коливання частоти проводили, змінюючи кутову частоту від 1 до 150 $\text{рад} \times \text{с}^{-1}$ при 1 % деформації, що відповідає раніше визначеному значенню LVR.

Дослідження при зміні температури

Зразок гідрогелю перед вимірюванням інкубували протягом 2 годин при 6°C. Температурну зміну проводили за допомогою модульного компактного ротаційного реометра Anton Paar MCR302 з паралельним пластинчастим зондом (діаметр пластини 9,975 мм). Температуру варіювали від 6 °C до 50 °C.

2.2.11. Набрякання зразків гідрогелів

Рідинну абсорбційну здатність гідрогелевих зразків (ГЗ) вимірювали традиційним гравіметричним методом у дистильованій воді, фізіологічному розчині та модельному ексудаті. рН рідин становило 6,5, 7,0 та 7,5 відповідно. Зразки діаметром 1 см і висотою 0,5 см зважували і поміщали в 50 мл дистильованої води/фізіологічного розчину/ексудату при 20 °С і 37 °С.

Після відповідного часу інкубації (1, 2, 4, 8, 12, 24 год) надлишок води/фізіологічного розчину/ексудату видаляли, зважували і поміщали в 50 мл дистильованої води/фізіологічного розчину/ексудату при 20 °С і 37 °С. Вміст рідини в зразках визначали як відношення ваги набряклого зразка ($W_W - W_P$) до ваги (W_P) сухих полімерів. Кожне значення було усереднене за трьома паралельними вимірюваннями. Здатність до набрякання розраховували за наступним рівнянням:

$$S_A = (W_W - W_P)/W_P, \quad (2.7)$$

де W_W і W_P позначають масу набряклого зразка і сухого полімеру, відповідно.

2.2.12. Гель-фракція зразків гідрогелів

Гель-фракцію визначали методом екстракції із зразків гідрогелів розчинного компонента. Зразки масою $m \sim 2,5$ г зважували з точністю 0.0002 г для визначення початкової маси полімерів (W_1) у гідрогелі:

$$W_1 = W_s \times 18 / 100, \quad (2.8)$$

де W_s – вихідна маса зразка, 18 – вміст полімерів в гідрогелі (%).

Екстракцію проводили в дистильованій воді при 50 °С впродовж 24 год при співвідношенні 100 г води на 1 г зразка гідрогелю. Воду міняли тричі. Отриману нерозчинну фракцію висушували до постійної маси в сушильній шафі при 100 °С. Гель-фракцію (G_f , %) розраховували за рівнянням:

$$G_f = W_2 / W_1 \times 100 \%, \quad (2.9)$$

де W_1 – вихідна маса полімерів,

W_2 – маса полімерів після екстракції.

2.2.13. Механічна міцність зразків гідрогелів

Визначення механічних властивостей проводили для зразків гідрогелів діаметром ~ 11 мм і висотою ~ 5,5 мм за допомогою ступінчастого одновісного стискаючого навантаження з кроком 500 мкм при площі контакту 0.95 см² з реєстрацією зусилля та враховували час релаксації зразка гідрогелю (t = 300 с). Вимірювання зразка гідрогелю проводили до досягнення напруження руйнування і будували залежність зусилля деформації від відносної деформації. Модуль Юнга розраховували за наступним рівнянням:

$$E = (F/S)/(\Delta l/l) = (F \times l)/(S \times \Delta l), \quad (2.10)$$

де F – осьова сила; [Н]

S – площа поверхні, по якій розподілена дія сили; [см²]

l – довжина, що деформується; [см]

Δl – модуль зміни довжини в результаті пружної деформації. [см]

2.2.14. Ферментативна деградація

Ферментативну деградацію зразків гідрогелю проводили в розчині PBS (pH = 7.4) з додаванням протеази (ORBAproteo P1200 ORBA Biokimya, Турція). Гідрогелі масою 1-1.2 г зважували з точністю 0,0002 г та переносили в 10 мл розчину протеази на субстраті 2,5 мг/мл в PBS і далі інкубували при 20 °C в термостатичному боксі протягом заданих проміжків часу (3, 6, 16, 24 год). Після цього їх висушували і зважували для визначення вмісту залишкового полімеру. Відсоток деградації (D) розраховували за наступним рівнянням:

$$D (\%) = (W_d - W_t) / W_d \cdot 100 \%, \quad (2.11)$$

де W_d – початкова маса полімеру; [г]

W_t – маса полімеру, що залишився після інкубації в момент часу t; [г].

2.2.15. Антимікробна активність

Дослідження ефективності дії бактерицидного препарату - хлоргексидину зі зразків гідрогелю проводили з урахуванням вказівок [146]. Культивували золотистий стафілокок (*S. aureus*), синьогнійну (*Pseudomonas aeruginosa*) і

кишкову палички (*Escherichia coli*) та аспергіл чорний (*Aspergillus niger*) в твердому середовищі (глюкоза – 4 %, МПБ – 1 % і агар - 2 % до 100 мл H₂O).

Для культивування, в чашках Петрі (діаметер 90 мм) наливали 20 мл середовища, у яке додавали 2 мл інокуляту (температура середовища не перевищувала 40 °С). Для приготування інокуляту петлею переносили мікроорганізми у пробірки з 10 мл рідкого поживного середовища та інкубували впродовж 24 год за температури 32 ± 2 °С.

Для вивчення дії хлоргексидину на ріст мікроорганізмів на поверхню поживного середовища з мікроорганізмами в чашках Петрі встановлювали диски гідрогелю з препаратом. Хлоргексидин вносили на стадії синтезу (желатинові гідрогелі) або методом вичерпного набрякання (желатинові та желатин-альгінатні гідрогелі). Фіксували зону інгібування росту мікроорганізмів кожні 24 год. Площу інгібування росту мікроорганізмів (см²) визначали з використанням програмного забезпечення TotalLab TL120.

2.2.16. Цитологічні дослідження

Цитотоксичність гідрогелю досліджували через культивування спермії бугаїв у прямому контакті зі зразками гідрогелів, вимірювали час виживання (год) і порівнювали з контролем. Окремо проводили дослідження цитотоксичності структуруючого агенту (дигліцидилового етеру поліоксиетилену-400 PEGDE 500), який використовується при отриманні гідрогелів. Для досліджень відбирали еякуляти сперми бугая з фізіологічними характеристиками: об'єм 3-4 мл, концентрація сперміїв $0.6-1.1 \times 10^9$ клітин/мл, число живих статевих клітин 80-85 %. Зразки сперміїв ділили на частини: контрольну – розріджену фосфатно-сольовим буфером (PBS) складу: NaCl – 0.8 г, KCl – 0.02 г, Na₂HPO₄ – 0.11 г, KH₂PO₄ – 0.02 г, MgCl₂ – 0.01 г, вода дистильована – до 100 мл) та дослідні. У дослідні зразки додавали подрібнений гідрогель дозами: 10, 20 і 50 мг на 1 мл зразка розріджених сперміїв бугаїв.

2.2.17. Статистичний аналіз

Експерименти проводили щонайменше в трьох повтореннях, середнє значення $\pm$ середнє квадратичне відхилення (SD). Середні значення порівнювали за допомогою t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. Статистично значущими вважалися значення рівня помилки (P) менше 0.05.

2.3. Методики проведення аналізів

2.3.1. ЯМР-спектроскопія

^1H і ^{13}C ЯМР спектри вихідних речовин, модифікованих олігомерів та синтезованих на їх основі зразків гідрогелів отримували у розчинниках: дейтерохлороформі, дейтеродиметилсульфоксиді, дейтерованій воді на приладі Bruker Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer при частоті 200 МГц і 400 МГц в автоматичному режимі сканування. Аналіз спектрів проводили за допомогою прогнозних спектрів у програмних забезпеченнях ACD/Labs, MasterNova, ChemDraw.

2.3.2. DLS – динамічне світлорозсіювання

Розмір частинок у зразках на різних стадіях структурування досліджували методом динамічного світлорозсіювання на приладі Zetasizer Nano ZS за допомогою програмного забезпечення Zetasizer Software version 7.11. Зразки розбавляли дистильованою водою до необхідної концентрації, фільтрували через фільтри Seringues Nylon 0.45 μm , діаметр 13 мм (Solidpro), для вимірювань використовували кварцеві кювети з тефлоновим корком типу PCS8501, товщиною 10 мм (Malvern, Великабританія)

2.3.3. SEM – скануюча електронна мікроскопія

Зразки гідрогелів поміщали в мікропробірки Eppendorf 2 мл, заморожували в рідкому азоті ($T = -195.75\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом 15 хв, далі переносили в грушеподібну колбу, яку під'єднували до сублімаційної сушарки Liofilizator Alpha 1-2 LD plus (CHRIST, Мюнхен, Німеччина) обладнаної двоступінчатою масляною помпою RZ 2.5 (VACUUMBRAND), тиск 0,1 mbar (10 Pa), температура $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Висушені зразки напилювали золотом в атмосфері азоту (Pump/Gold JEOL JFC-1300), фотографії структури знімали на скануючому мікроскопі JEOL, JSM 6510 LV.

2.3.4. Термогравіметричний аналіз (TGA)

Всі дослідження проводилися на апараті TGA2 METTLER TOLEDO. Для обробки ТГА використовували програмне забезпечення STARe. Втрату маси зразків гідрогелів та вихідних речовин вимірювали в атмосфері азоту (N₂, витрата азоту 20 - 50 мл/хв) з початковою масою близько 10 мг. Зразки для термогравіметричного аналізу поступово нагрівали від 25 °C до 500 °C зі швидкістю нагрівання 1-10 °C за хвилину.

2.3.5. Диференційна скануюча калориметрія (DSC)

Всі вимірювання були протестовані на диференційному скануючому калориметрі DSC25 (TA Instruments, США). Для обробки ДСК використовували програмне забезпечення TRIOS.

У процедурі досліджували вихідну сировину та гідрогелі, висушені на повітрі до постійної маси: рівновага при 15.00 °C; підвищення температури зі швидкістю 10.00 °C/хв до 180.00 °C. Вихідні зразки гідрогелів досліджували за такою процедурою: рівновага при температурі 0.00 °C; підвищення температури зі швидкістю 1.00 °C/хв до 100.00 °C.

2.3.6. Інфрачервона спектроскопія (IR)

ІЧ-спектри з перетворенням Фур'є (FTIR) вихідних речовин і зневоднених продуктів синтезу отримували на приладі Brucker FT-IR spectrometer Vertex 70V за допомогою програмного забезпечення OPUS, вимірювання проводили в діапазоні хвильових чисел від 4000 см⁻¹ до 400 см⁻¹ в режимі відбиття (ATR), роздільна здатність 2 см⁻¹, кількість сканів - 256.

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРУВАННЯ ЖЕЛАТИНВМІСНИХ ГІДРОГЕЛІВ ПОХІДНИМИ ПОЛІОКСИЕТИЛЕНІВ

Оксиранові похідні олігомерів (епоксиди) відомі вже давно. Традиційно це епоксидні смоли які на сьогодні доволі широко використовуються як реакційно здатні компоненти клеїв, композитів, покриттів що мають високі фізико-механічні та інші цільові характеристики. Більшість цих сполук є гідрофобними, однак існують також гідрофільні представники цього класу, здатні розчинятися у воді. До них, зокрема, належать дигліцидилові етери поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси, які використовуються для модифікації та/або структурування різних полімерів, як синтетичних, так і біополімерів [147, 148].

Залежно від умов синтезу, такі сполуки можуть взаємодіяти з гідроксильними, карбоксильними та аміногрупами. Найбільш легко реакція проходить з аміногрупами, що містяться у природних полімерних сполуках, таких як хітозан, колаген, желатин, еластин та інші білкові матеріали [149, 150].

Поліоксиетиленгліколі з молекулярною масою 400 і більше вважаються безпечними за класифікацією FDA (управління з контролю за продуктами і ліками США) і можуть застосовуватися у медичних, косметичних та харчових продуктах. В літературі описані дослідження цитотоксичності їх діоксиранових похідних і в цілому показано що вони не проявляють шкідливої дії на живий організм [151,152]

3.1. Синтез та дослідження властивостей структуруючих на основі поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси.

Дигліцидиловий етер поліоксиетиленгліколю (PEGDE) синтезували шляхом реакції відповідного PEG з епіхлоргідрином (ЕХГ) у присутності NaOH (схема зображена на рис 3.1.), згідно до методики 2.2.1. описаної в попередньому розділі. Мольні співвідношення між гідроксильними групами, ЕХГ та NaOH становило 1:6:6 у синтезах на основі поліоксиетиленгліколів молекулярної маси

200 і 400 (PEGDE 300 та PEGDE 500), а для гомологів вищої ММ – 1:8:8 (PEGDE 700, PEGDE 1100 та PEGDE 2100).

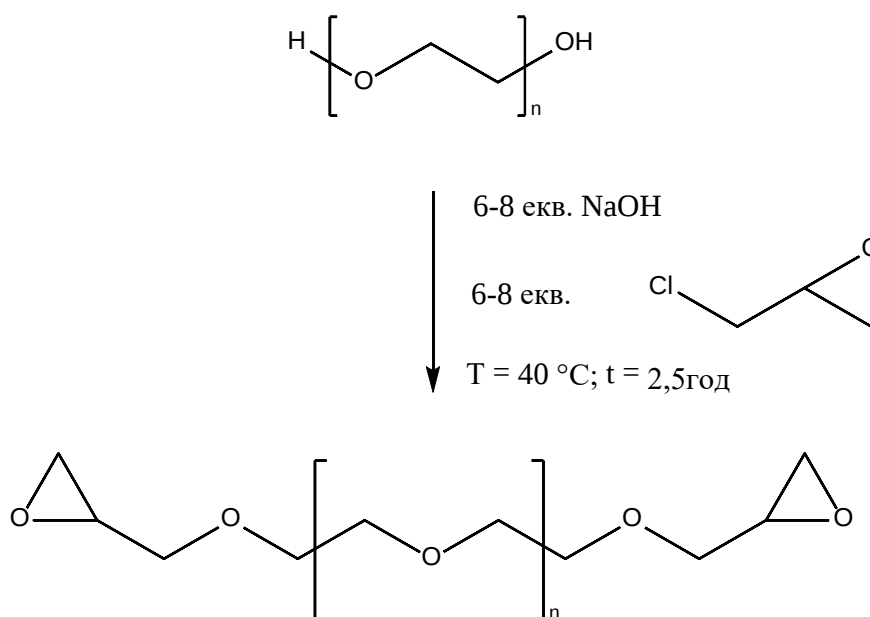


Рис. 3.1. Схема синтезу дигліцидилового етеру поліоксиетиленгліколю (PEGDE): $n = 3$ для PEGDE 300; $n = 7-8$ – PEGDE 500; $n = 11-12$ – PEGDE 700; $n = 21-22$ – PEGDE 1100; $n = 43-44$ – PEGDE 2100.

За такої схеми синтезу вихід продуктів складав 80-90%, при тому PEGDE 500, PEGDE 700 були отримані зразу з високим вмістом епоксидних груп. За зовнішнім виглядом при кімнатній температурі ($T = 20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) PEGDE 300 і PEGDE 500 – в'язкі прозорі рідини; PEGDE 700 – пастоподібна речовина білого кольору; а PEGDE 1100 і PEGDE 2100 – тверді білі речовини. В таблиці 3.1 приведені характеристики отриманих похідних поліоксиетиленгліколів (структуруючих агентів).

Таблиця 3.1

Характеристики синтезованих структуруючих агентів на основі поліоксиетиленгліколів з різною молекулярною масою

№ п/п	Молекулярна маса ПЕГ використана для синтезу	Назва структуруючого агенту	ММ, г/моль	$W_{\text{еп.груп}}, \%$	Вихід, %
1.	PEG-200	PEGDE 300	300	72-76	80-83
2.	PEG-400	PEGDE 500	500	98-99	85-89
3.	PEG-600	PEGDE 700	700	96-98	84-87
4.	PEG-1000	PEGDE1100	1100	70-74	81-84
5.	PEG-2000	PEGDE 2100	2100	72-75	80-82

На рис. 3.2 представлено ATR FTIR спектри вихідних речовин (епіхлоргідрин і поліоксиетиленгліколь PEG-400) та отриманого продукту реакції - дигліцидилового етеру поліоксиетиленгліколю PEGDE 500.

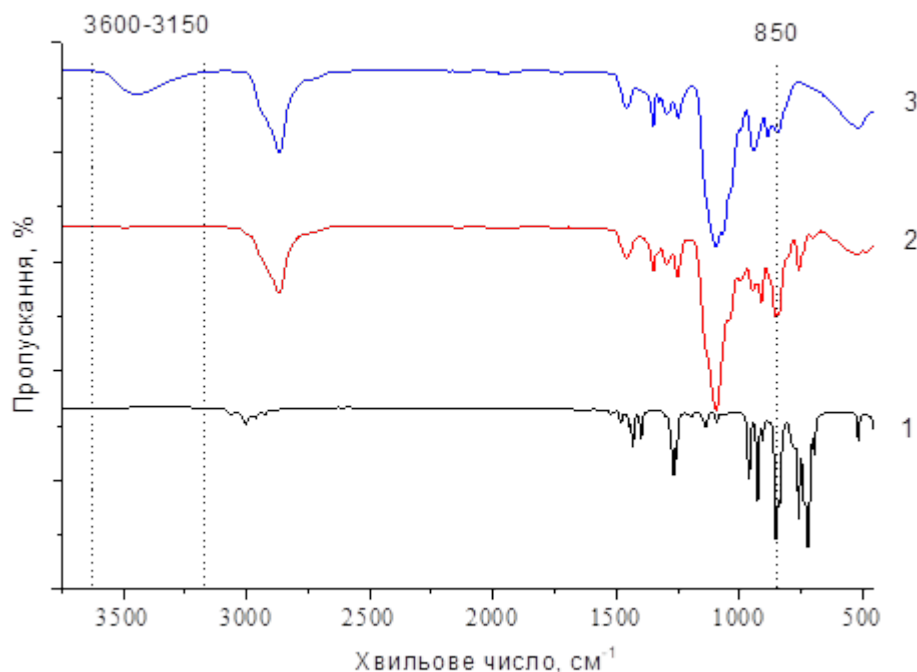


Рис. 3.2. ІЧ спектри вихідних сполук та PEGDE 500 (1 - епіхлоргідрин, 2 – PEGDE 500; 3- PEG - 400)

Як видно, у спектрі продукту реакції PEGDE 500 зберігаються характерні піки вихідних сполук, (спостерігається поява піку поглинання епоксидного кільця при 850 cm^{-1}), і разом з тим відсутня смуга поглинання гідроксильних (-OH) -груп PEG-400 при 3480 cm^{-1} . Відсутність поглинання в цій області, також, свідчить про те, що під час синтезу та зберігання не відбувалося гідролітичного перетворення оксиранових фрагментів. Крім того, негативна проба Бельштейна на наявність атомів галогену (хлору) підтверджує чистоту отриманого продукту, та вказує на відсутність залишків непрореагованого епіхлоргідрину.

Отриманий продукт (PEGDE 500) був охарактеризований також ^1H NMR спектроскопією. Олігомерний характер отриманої сполуки не дозволяє чітко охарактеризувати форму піків через накладання і перекривання сигналів від

протонів одного типу, проте для розміщених в різних молекулярних конфігураціях певний аналіз провести можна.

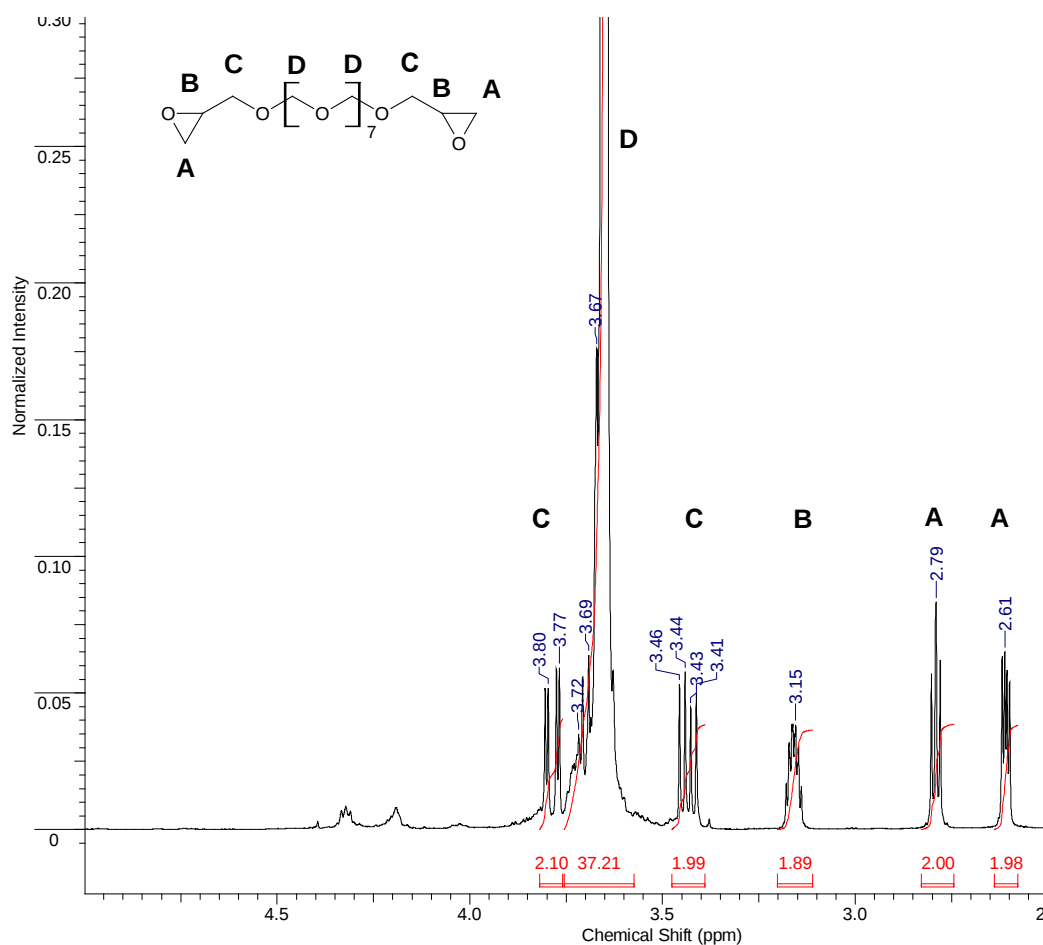
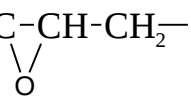
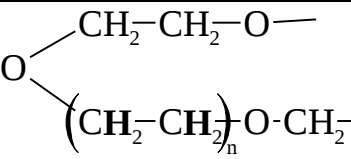


Рис. 3.3. ^1H ЯМР-спектр дигліцидилового етеру поліоксиетиленгліколю PEG-400 (PEGD E500).

В таблиці 3.2 зведено результати віднесення та інтегрування сигналів в ^1H ЯМР-спектрах діоксиранового похідного PEGDE500. Відсутність невіднесених сигналів та добре співпадіння значень інтегралів сигналів відповідних протонів отриманих за розрахунком та зі спектру синтезованого продукту свідчить про його високу чистоту та відповідність наведеній структурі. При інших рівних умовах, структуруючі іншої молекулярної маси не давали додаткових переваг, ні у синтезі, ні у властивостях гідрогелів. Значно менші виходи при їх синтезі, необхідність додаткових стадій для розділення моно та дизаміщених продуктів та на порядок вищі ціни (якщо орієнтуватись промислові продукти) зумовили причини відмови від подальшого їх використання.

Таблиця 3.2.

Віднесення сигналів протонів діоксиранового похідного PEGDE500 на основі поліоксиетиленгліколю 400.

Позначення	Зсув, ppm	*Форма сигналу	Віднесення	Фрагмент	к-сть протонів	Інтеграл	
						За розрахунком	Експериментально
A	2,66 2,84	Дублет	$\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ 	Оксиран	4	4,00	3,98
B	3,15	Пентет	$\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ 		2	2	1,89
C	3,44 3,79	Дублет	$\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ 		4	4	4,09
D	3,59	Триплет		PEG-400	36	34-38	37,21

*- в більшості випадків сигнали проявляються як мультиплети через накладання

З ряду діоксиранових похідних поліетиленгліколю найбільш привабливим для синтезу гідрогелів на основі желатину було обрано PEGDE500 синтезований на основі поліоксиетиленгліколю ПЕГ400, або також товарний продукт від фірми Sigma-Aldrich, номер CAS: 26403-72-5. За даними FTIR (Рис.3.2) та ПМР (Рис3.3) спектроскопії ці продукти були ідентичними.

3.2. Особливості перебігу реакції структурування у водному середовищі з використанням діоксирану PEGDE 500

Згідно розробленої методики (розділ 2, п.2.2.4) синтез гідрогелів проводиться у водному середовищі без додавання будь яких інших компонентів, окрім желатину, PEGDE 500 і води. Разом з тим відомо, що в залежності від структури молекули та властивостей реакційного середовища оксиранове кільце, а це напружений тричленний цикл, має доволі різну здатність до реакцій

нуклеофільного приєднання. За наявності в оксирановому кільці алкільного або арильного замісника атака нуклеофільного агента направляється переважно по незаміщеному, просторово більш доступному атомом вуглецю. Механізм гідролізу та алкоголізу оксиранів може повністю змінитися при проведенні реакції у кислому середовищі або у присутності електрофільного каталізатора. У швидкій та оборотній першій стадії відбувається протонування оксирану по атому кисню з утворенням оксонієвого катіону. У другій повільній стадії протонувана форма піддається нуклеофільній атаці аміном, водою, спиртом або галогенід-іоном. Протонування оксирану прискорює розкриття кільця під час взаємодії з нуклеофільними агентами.

Проведення реакції взаємодії оксиранів у водному середовищі (слабого нуклеофілу) має свої особливості. З одного боку гідрофобні, погано розчинні у воді оксиранові сполуки практично не проявляють здатності до взаємодій у водному середовищі. З іншого боку сполуки з оксирановою групою, які добре розчинні у воді мають високу реакційну здатність, але разом з тим схильні до нуклеофільної взаємодії, також, і з молекулами води, тобто, схильні до гідролізу [153, 154]. Тому першочергово вивчалась саме можливість використання діоксиранових похідних поліоксиетиленгліколів у водному середовищі, тобто їх стійкість у воді щоб оцінити можливі неефективні втрати структуруючого агента за умов реакції структурування.

Визначення проводили за допомогою ^1H ЯМР спектроскопії у дейтерованій воді безпосередньо у пробірці для ЯМР спектроскопії згідно методики наведеної в розділі 2. На рис. 3.3 наведено ПМР спектр вихідної речовини PEGDE500. Не дивлячись на олігомерний характер сполуки на спектрі смуги протонів добре розділені, що дозволяє проводити інтегрування та розрахунки. Методом порівняння з розрахунковим спектром та оцінкою типу щеплення всі смуги поглинання було віднесено до відповідних протонів молекули PEGDE 500 (Табл. 3.2). Гідроліз проводився при дотриманні однакової початкової концентрації

PEGDE500, що дозволяє проводити кількісні розрахунки і зводити баланс інтегралів протонів до і після гідролізу простим відношенням між ними.

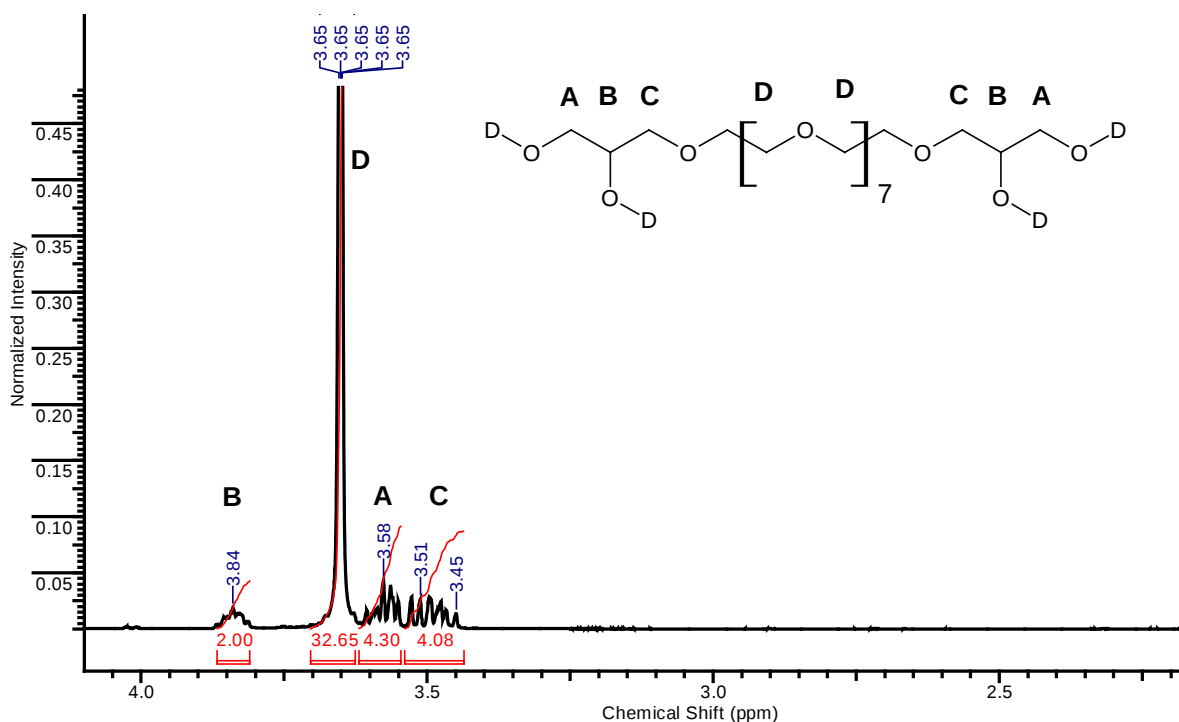


Рис. 3.4. ^1H ЯМР спектр продукту повного гідролізу діоксиранового похідного PEGDE500 поліоксиетиленгліколю ПЕГ400 при 80°C в дейтерованій воді, 12 год

Методика розрахунку побудована на тому, що протони біля карбонів оксиранового кільця до та після взаємодії з D_2O (гідролізу) проявляються в суттєво різних ділянках спектру. Зокрема до гідролізу двом протонам метенової групи в оксирановому кільці належать дві групи сигналів (**A**) зі зміщенням 2,66 ppm і 2,84 ppm, які по суті є результатом накладення дублетів. Наступна смуга поглинання (**B**) проявлена зі зміщенням 3,15 ppm і складається з накладених з невеликим зсувом між собою двох пентетів. Наступний сигнал (**C**) від протонів $-\text{CH}_2-$ розміщених поряд з оксирановим кільцем проявляється двома групами дублетів з зсувом 3,44 ppm і 3,79 ppm. Смуга поглинання від переважаючої кількості протонів оксиетиленового ланцюга (**D**) проявляється з зсувом 3,59 ppm. Важливо зауважити, що сума інтегралів від протонів у складі двох оксиранових груп у молекулі відповідає кількості протонів оксиетиленового ланцюга при середній ММ сполуки 500 (7 ланок оксиетилену). Зрозуміло, що цього типу олігомери це не індивідуальні сполуки тому чітких піків очікувати не доводиться

і зведення балансу інтегралів протонів сходиться в межах відхилення 5 %, що можна вважати достатньо добрим співпадінням.

У випадку взаємодії оксиранового циклу з водою відбувається його розкриття з приєднанням (структурна формула зображена на рис.3.4). При цьому положення сигналів від протонів у нерозкритому оксирановому циклі (А, В) залишається без змін, а сигнали цих же протонів біля гідроксильної групи, яка утворилась в результаті (в даному випадку $-\text{CH}_2\text{-OD}$ оскільки реакція проводилась у дейтерованій воді) зазнають суттєвого зміщення в сторону слабого поля і проявляються зі зсувом 3,84 ppm. Тому у продукті повного гідролізу (через 12 год при 80 °C) у діапазоні хімічного зсуву 2,5-3,0 ppm сигнали взагалі відсутні (Рис. 3.4). Враховуючи те, що сумарна кількість протонів, які проявляються смугами поглинання у сполучі не змінюється то відношення інтегралу протонів (А, В) до та після гідролізу дозволяє проводити розрахунок ступеню перетворення епоксидних груп. Таким чином було проведено кількісний розрахунок вмісту оксиранових фрагментів у процесі їх гідролізу і побудована кінетична крива витрати епоксидних груп у перерахунку на ступінь гідролізу (Рис. 3.5 а).

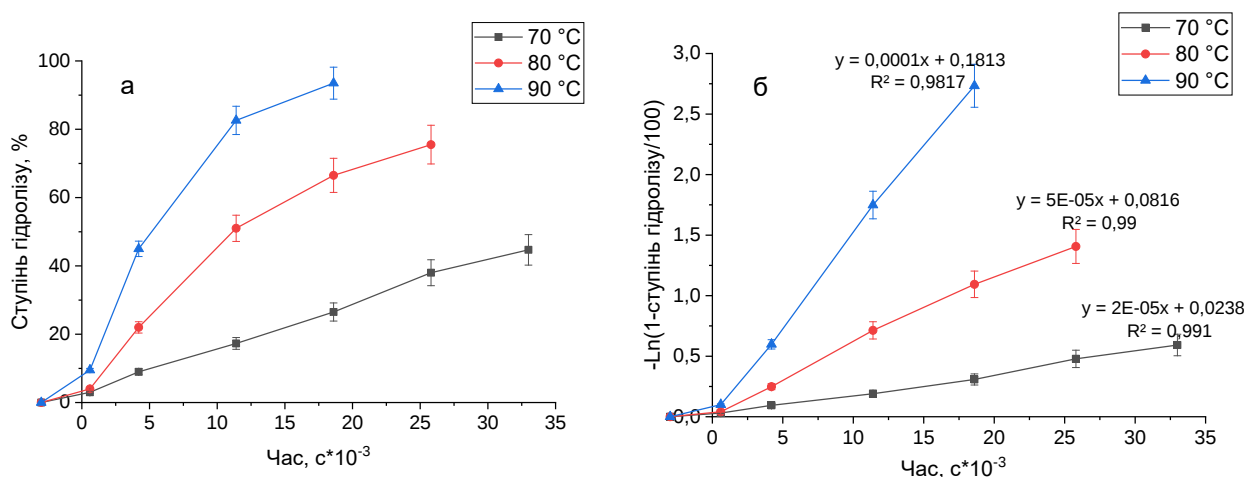


Рис.3.5. Кінетичні криві гідролізу PEGDE500 у дейтерованій воді (pH=6,8) при різних температурах 70°C, 80°C і 90°C (а) і їхні спрямлення в координатах реакції першого порядку (б).

У випадку перебігу реакції, який передбачає великий надлишок одного з реагентів (в даному випадку D_2O) для бімолекулярної реакції гідролізу

спостерігаються кінетичні залежності реакцій першого порядку. Швидкість реакції залежить лише від концентрації оксиранових фрагментів тому, що при великому надлишку дейтероводи, яка одночасно є середовищем, її концентрація істотно не змінюється. У такому випадку залежність конверсії (X) від часу (t) повинна описуватися рівнянням:

$$X=1-e^{-kt} \quad (3.1)$$

де:

- k — константа швидкості реакції
- t час (с).

Для побудови графіка в напівлогарифмічних координатах ($\ln(1 - X)$ від t) рівняння перетворюється до лінійної форми:

$$\ln(1-X)=-kt \quad (3.2)$$

Рівняння 3.2 описує пряму лінію з кутовим коефіцієнтом -k. Спрямлення кінетичних кривих при побудові графіків в координатах $\ln(1 - X)$ від t, підтверджує псевдоперший порядок реакції (швидкість бімолекулярної реакції залежить тільки від концентрації одного з реагентів) і дає можливість за нахилом прямої визначити константу швидкості гідролізу k (Рис. 3.5 (б), Табл.3.3). Як видно з отриманих даних за відсутності каталізаторів та/або інших функціональних груп нуклеофільного характеру гідроліз епоксидного кільця у водному середовищі відбувається доволі повільно. Зокрема, наприклад при температурі 70 °C конверсія епоксидних груп на 12 год складає лише 42 %. За тих же умов при 80 °C сигналів протонів А (Рис.3.4) оксиранового кільця у ПМР спектрі продуктів гідролізу виявлено не було, що свідчить про практично повне перетворення оксирану.

Отримані експериментальні дані гідролізу PEGDE500 дозволяють визначити енергію активації (E), що відображає ступінь впливу температури на константу швидкості реакції. Залежність між енергією активації та константою швидкості описується рівнянням Арреніуса:

$$k = A \cdot e^{-E/(RT)} \quad (3.3)$$

де:

A – передекспоненційний множник (частотний фактор);

E – енергія активації, Дж/моль;

R – універсальна газова стала, Дж/моль·К;

T – температура, К;

k – константа швидкості при температурі T .

Енергію активації реакції гідролізу визначали за графічним методом (Рис. 3.6, дані для розрахунків наведені у таблиці 3.3)

Таблиця 3.3.

Умови реакції гідролізу та кінетичні дані для розрахунку енергії активації графічним методом

№ п/п	T , К	$1000/T$, K^{-1}	k , s^{-1}	$\ln k$
1	363	2,7548	$1,28 \cdot 10^{-4}$	-8,9635
2	353	2,8329	$5,04 \cdot 10^{-5}$	-9,8955
3	343	2,9255	$2,18 \cdot 10^{-5}$	-10,7336

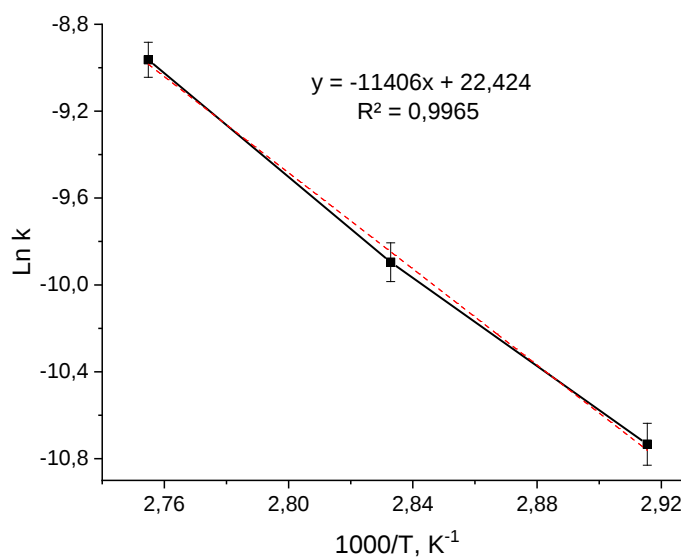


Рис.3.6. Залежність логарифма константи швидкості гідролізу PEGDE 500 від оберненої температури

Знайдене за методом найменших квадратів числове значення коефіцієнту нахилу прямої – 11406 відповідає $-E_a/R$ [155]. Провівши нескладні математичні перетворення отримано значення енергії активації $E_a \approx 95,0$ кДж·моль $^{-1}$.

Знайдена величина добре узгоджується з літературним даними, щодо некаталітичного гідролізу епоксидної групи у водному середовищі [156,157].

Необхідно зазначити, що енергія активації для модельних систем епоксид-амін (фенілгліцидиловий ефір та модельні аміни: анілін, п-нітроанілін, п-анізидин (або п-метоксианілін та діамінодифенілсульфон) становить 8,9-13,9 ккал/моль ($37.2 - 58.2 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$) [158] (реакція дигліцидилового ефіру бісфенолу А з м-фенілендіаміном $E = 50,7 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ [159]), і є значно меншою за отриману при дослідженні гідролізу епоксидної групи структуруючого агенту PEGDE 500. Це дозволяє вважати, що повільна реакція гідролізу (за участі молекул води як слабкого нуклеофілу та відсутності каталізаторів) не матиме суттєвого впливу на перебіг реакції структурування полімерів, що містять вільні аміногрупи за використання PEGDE 500 у водному середовищі і як буде показано в наступних розділах з найвищою ефективністю це можна здійснити при температурі 80 °C.

3.3. Механізм утворення гідрогелю желатину при структуруванні PEGDE 500.

Хімічна модифікація або перехресне зшивання природних полімерів і зокрема желатину є ефективним способом формування міцних ковалентних зв'язків між макромолекулами для отримання модифікованих систем, у яких реалізується вища ступінь контролю за хімічними і фізичними властивостями у порівнянні з немодифікованими природними полімерами [160].

Функційний склад желатину, який хоча і не вважається повноцінним білком тим не менше представлений цілим переліком реакційноздатних груп з числа відповідних амінокислот, - карбоксильних (глутамінова і аспарагінова кислоти), гідроксильних (серин, треонін, тирозин, гідроксилізин) та амінних (лізин, гідроксилізин). Структурування желатину тим не менше в основному відбувається через взаємодії з аміногрупами. Для цього використовують альдегіди (формальдегід, глутаровий альдегід, гліцеральдегід, диальдегідний

крохмаль), а також альдегідні похідні інших полімерів та епоксидні сполуки [161, 76].

Одним з перспективних реагентів для структурування можна вважати водорозчинні діоксиранові похідні поліетиленгліколів. Завдяки наявності поліоксиетиленового ланцюга забезпечується їх здатність до розчинення у воді, а оксиранові фрагменти є доволі активними у реакціях нуклеофільного заміщення і здатні забезпечити структурування макромолекул желатину.

Відомо, що в залежності від рН середовища реакція взаємодії оксирану з нуклеофільними реагентами різних типів може відбуватися по-різному. Якщо за відсутності активніших нуклеофілів у водному середовищі відбувається тільки гідроліз епоксиду (розглянутий у попередньому розділі), то у випадку присутності інших функційних груп та відповідних умов (рН середовища, температура) в нуклеофільній атаці можуть брати участь функціональні групи різних типів (аміногрупи, гідроксильні та карбоксильні групи). При високих значеннях рН (≥ 13) реакція відбувається з утворенням етерних зв'язків, оскільки рН, є наближеним до рК_a гідроксильних груп, вони є більш нуклеофільними порівняно з депротонованими карбоксильними групами [151, 162, 163]. За цих умов, без сумніву, реагують також аміногрупи з утворенням вторинних і третинних амінів [164].

У випадку проведення реакції в умовах кислого середовища при рН 2 - 4,5 депротонування гідроксильних груп не відбувається і переважає недисоційована карбоксильна група, що сприяє утворенню естерного зв'язку [165]. Аміногрупа за цих умов знаходиться в сольовій формі і практично участі у реакції не бере. Однак при проведенні реакцій в умовах середовища близького до нейтрального при рН від 4.7 до 8, хоча і може відбуватися взаємодія з утворенням етерних зв'язків [166], більш імовірною є реакція з непротонованими аміногрупами, які є активнішими нуклеофілами [167]. Вода в цьому випадку виступає як розчинник і може сприяти реакції, стабілізуючи перехідний стан [168].

Таким чином в умовах синтезу гідрогелю желатину найбільш імовірним є перебіг реакції діоксиранових похідних з залишками аміновмісних (Рис. 3.7.) амінокислот зі складу желатину таких як лізин (Lys, ϵ -NH₂ група), гідроксилізін, а також кінцевими аміногрупами макроланцюгів. Імідазольна група гістидину (His), частково заряджена і є менш активною, так само як і гуанідинове угруповання у аргініні. Тому ці амінокислоти значно рідше розглядаються як такі, що здатні до нуклеофільних взаємодій.

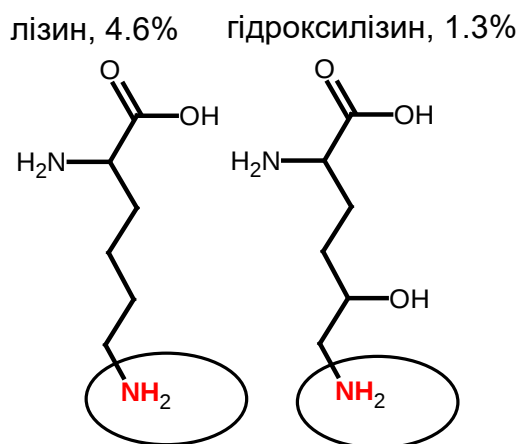


Рис. 3.7. Аміновмісні амінокислоти в молекулі желатину.

Не можна також виключати взаємодії з гідроксильними групами, які в макромолекулах желатину містяться в гідроксилізині та гідроксипроліні, а разом з тим утворюються як наслідок розкриття оксиранового циклу при приєднанні нуклеофілу. Зважаючи на те, що в макромолекулах желатину вміст залишків лізину є доволі високий (понад 4 %), то можна вважати, що ϵ -аміногрупа (-NH_2) є основною реакційно-здатною групою, для нуклеофільної атаки епоксидної групи полі(етилєнглїколь) диглїцидилового етеру (PEGDE).

Оксиранове кільце є високо реакційноздатним, через напружений тричленний цикл та електрофільним, оскільки атом оксигену стягує електронну густину від сусідніх атомів карбону. Аміногрупа (-NH_2) атакує один із карбонів оксирану, що приводить до розкриття циклу, і зв'язування з -NH_2 з виділенням H_2O . Як правило реакція приєднання відбувається по менш заміщеному α -карбону на якому локалізується заряд, і який крім того є більш доступним якщо брати до уваги стеричні перешкоди. При цьому утворюється β -гідроксиамін

(гідроксильна група з'являється на другому карбоні епоксиду) [169]. Такі реакції часто використовують у фармацевтиці (для модифікації ферментів, пептидів, антитіл) [170]. Епоксидовані форми ПЕГ також застосовуються для структурування різних природних полімерів для синтезу гідрогелів, зокрема поліетиленгліколь дигліцидиловий етер (PEGDE), був використаний для зшивання хітозану з метою створення гідрогелів з покращеними механічними та біомедичними властивостями [171]. У цьому дослідженні продемонстровано, що зшивання хітозану з PEGDGE призводить до зменшення кількості вільних аміногруп, зниження кристалічності та покращення біосумісності матеріалу, який розроблявся для застосування в біомедичних технологіях, зокрема в регенерації кісткової тканини.

Дві епоксидні групи у молекулі PEGDE дають можливість взаємодіяти з двома різними макромолекулами желатину, які містять реакційноздатну нуклеофільну групу. Така міжмолекулярна взаємодія створює просторову полімерну сітку у водному середовищі - гідрогель. Разом з тим первинна аміногрупа здатна до приєднання двох оксиранових фрагментів з утворенням третинного аміну. Це розширює можливості просторового зв'язування макоромолекул у полімерному каркасі гідрогелю (рис.3.8).

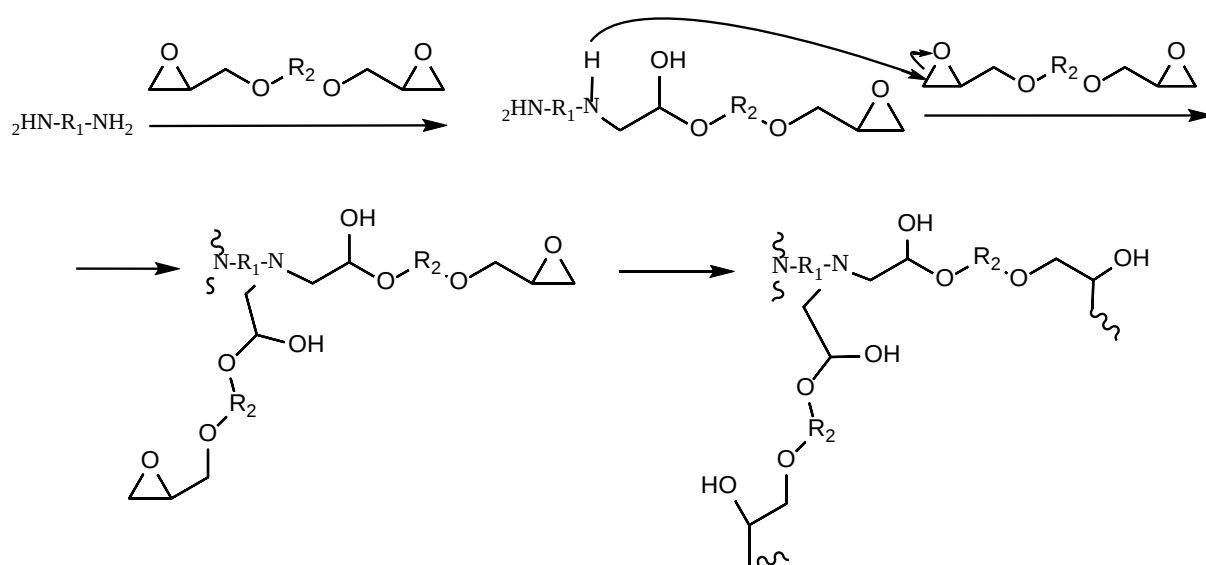


Рис.3.8. Схематичне зображення реакції між первинним аміном і діоксирановим похідним PEGDE

Ковалентна взаємодія між епоксидними групами PEGDE і нуклеофільними групами амінокислот у желатині (переважно ϵ -аміногрупами лізину) приводить до отримання желатинового гідрогелю, який на відміну від неструктурованого желатину менше реагує на підвищення температури та лише обмежено набрякає у водному середовищі.

При тому відомо, що приєднання фрагментів поліоксиетиленгліколів до молекул білків (PEGylation) покращує їх розчинність і стабільність, зменшує імуногенність [172]. Цей факт дозволяє нехтувати деякою кількістю непродуктивного вичерпування структуруючого агента, у випадку, коли взаємодія з желатином відбулася лише за однією оксирановою групою, а інша зазнала гідролізу.

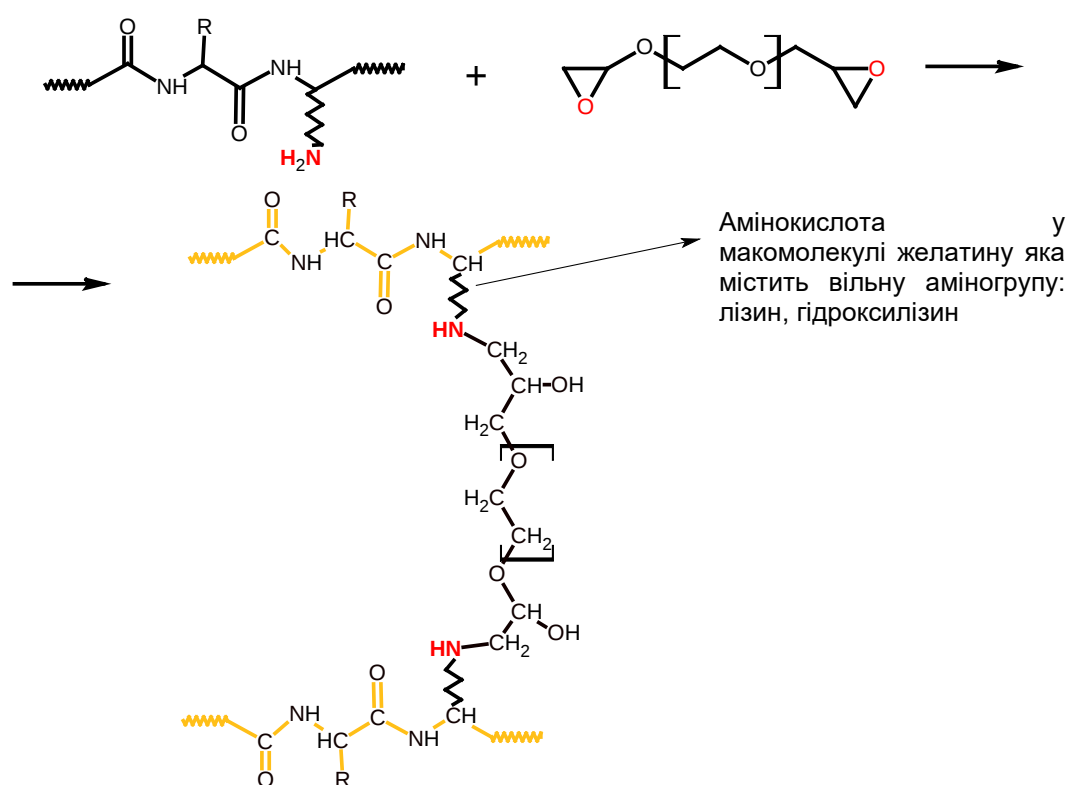


Рис.3.9. Схема структурування макромолекул желатину діоксирановим структуруючим агентом PEGDE 500

Отже утворення тривимірної сітки гідрогелю відбувається при взаємодії з вільними аміногрупами у складі желатину (в першу чергу це вільна аміногрупа лізину) як високонуклеофільного субстрату за схемою наведеною на рис. 3.9 причому ця реакція як буде показано в наступних розділах відбувається у

водному середовищі при рН 5.5-6.5 і при цьому не вводяться додаткові каталізатори чи регулятори водневого показника середовища, що має важливе практичне значення для синтезу гідрогелів медичного спрямування.

3.4. Порівняння ефективності структурування желатину одержаними дигліцидиловими естерами різної молекулярної маси

Для порівняння ефективності структуруючих агентів різної молекулярної маси були проведені модельні синтези гідрогелів желатину при співвідношенні структуруючий агент : желатин як 1 до 3. Встановлено, що при використанні структуруючих агентів з PEGDE 300, PEGDE 1100 утворюються гідрогелі з низькими механічними характеристиками. Це підтверджується наведеними на рис. 3.10 результатами досліджень вмісту гелю фракції та даними по набряканню гідрогелевих матеріалів.

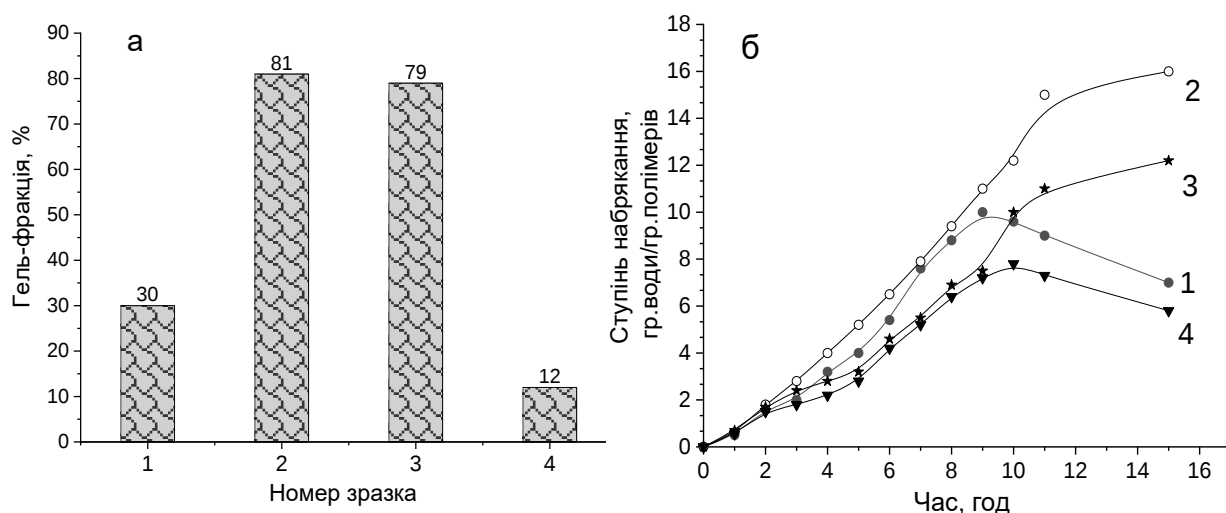


Рис.3.10 а- гель фракція та б – ступінь набрякання* зразків гідрогелів у воді синтезованих на структуруючих агентах із різною молекулярною масою: 1– PEGDE 300, 2 – PEGDE 500, 3 – PEGDE 700, 4 – PEGDE 1100 (*набрякання вивчали за температури 37 °С, що зумовлено умовами подальшого використання даних матеріалів).

При аналізі результатів вивчення властивостей гідрогелів видно, що вміст гелю-фракції у синтезованих гідрогелях для зразків з PEGDE 300 і PEGDE 1100 є невисоким 25-30 % та 5-10 %, відповідно. Задовільні результати, що підтверджують максимальне залучення структуруючого в мережу гідрогелю, отримані для зразків синтезованих з використанням структуруючих PEGDE 500

і PEGDE 700, вміст гель-фракції 75-85 % для обох агентів структурування. Ще одним підтвердженням, є дослідження процесу набрякання синтезованих зразків. Згідно отриманих результатів, що корелюють з гель-фракцією, набрякання отриманих гідрогелів показує, що зразки отримані за використання як структуруючого агенту PEGDE 300 та PEGDE 1100 зазнають руйнування уже після 9 годин набрякання у воді. Тобто при синтезі гідрогелів при досліджуваних співвідношеннях, використовувати структуруючі PEGDE 300, PEGDE 1100 та PEGDE 2100 недоцільно. Крім того, можна зазначити наступне, синтез структуруючих на основі PEG-1000 і вище є набагато складнішим, а промислові аналоги або недоступні або високовартісні. До прикладу, вартість 500 г дигліциділового етеру поліоксиетиленгліколю з ММ = 500 г/моль – 213 євро, а 5 грам з ММ = 2000 г/моль – 241 євро.

Таблиця 3.4

Параметри синтезу та властивості отриманих желатинових гідрогелів

№ п/п	Співвідношення реагентів		Концентрація PEGDE500, %	Концентрація желатину, %	Гель фракція, %	Максимальне набрякання, Г води/Г полімерів	Максимальне навантаження*, кПа	
	PEGDE500	Желатин					20 °C	37 °C
1.	1	1	9.0	9.0	55.9	59.5	27	1.6
2.	1	2	6.0	12.0	64.9	57.2	30	3.2
3.	1	3	4.5	13.5	78.2	38.5	42	7.7
4.	1	4	3.6	14.4	81.5	35.1	45	8.5
5.	1	5	3.0	15.0	79.7	28.0	60	10.9
6.	0	1	0.0	18.0	0.0	0.0	11	-

* - зразки гідрогелів товщиною 5.5 мм не руйнувались при максимальній деформації (5.5 мм)

Для подальших досліджень був обраний як структуруючий агент PEGDE 500 (отриманий за використання поліетиленгліколю ПЕГ-400), який забезпечував за досліджуваних умов найвищу гель-фракцію (81 %). В таблиці 3.4 наведено параметри синтезу та властивості отриманих гідрогелів при різних співвідношеннях PEGDE 500 : желатин. Більше досліджень отриманих желатинових гідрогелевих матеріалів описано у наступному розділі.

3.5. Дослідження структурування гідрогелів на основі желатину

Найбільш чутливим параметром, який різко (на декілька порядків) змінюється в ході утворення полімеру є в'язкість, і залежить вона від його молекулярної маси, концентрації реакційного розчину і температури. Особливо стрімко змінюються реологічні параметри розчинів полімерів у випадку утворення просторових структурованих архітектур макромолекул. При цьому відбувається процес (гелювання) при якому рідина (або розчин) перетворюється на гідрогель (у випадку коли розчинник вода), і це супроводжується різким зростанням в'язкості. Час початку гелеутворення відповідає моменту часу, коли в'язкість починає різко збільшуватися.

Оскільки при утворенні розгалужених і структурованих продуктів не завжди відомі кінетичні закономірності відповідних реакцій і досить важко встановити відповідність між реологічними властивостями і молекулярними характеристиками полімерів, повний реокінетичний аналіз у цих випадках виявляється не завжди можливим, і вимушеним обмеженням є розгляд узагальненої емпіричної картини.

За допомогою ротаційної віскозиметрії було проведено дослідження зміни параметрів в'язкості від часу при різних температурах (70, 75 і 80 °C) і для різних співвідношень структуруючого агенту PEGDE500 до желатину (1:3; 1:4 і 1:5). Було побудовано залежності зміни в'язкості (η , сП) від часу (Т, хв) для усіх досліджуваних температур і складів гелеутворюючої композиції (рис 3.11). Для отриманих залежностей визначали такі параметри як нахил (константа швидкості) та коефіцієнт регресії R^2 . Абсцису точки перетину дотичних проведених до прямолінійних участків залежності до і після різкого зростання в'язкості вважали часом початку гелеутворення.

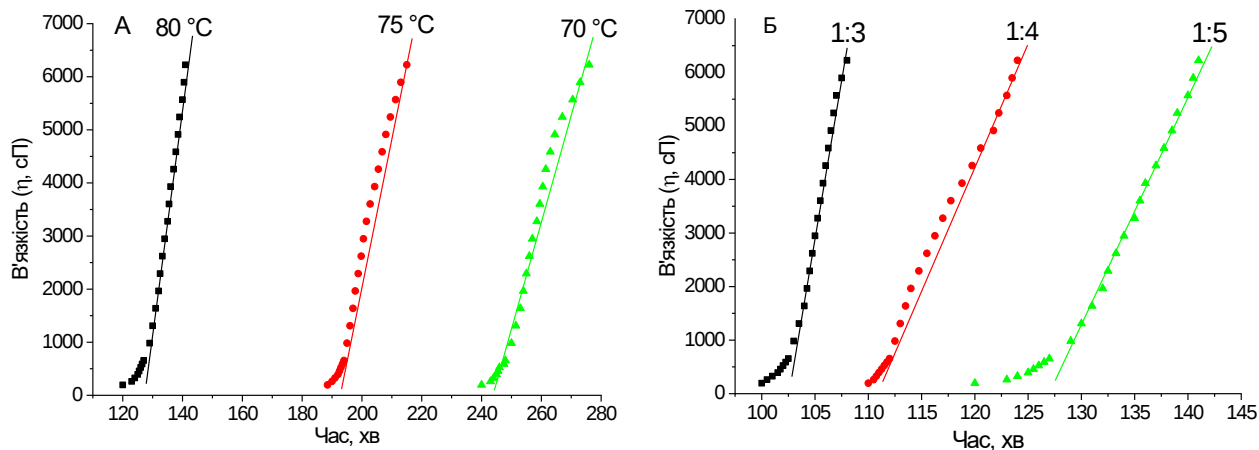


Рис.3.11 Кінетика зміни в'язкості гелеутворюючої композиції в залежності від температури структурування при співвідношенні 1:5 (А) і від співвідношення реагентів при температурі 80 °С (Б).

З отриманих даних видно, що початок гелеутворення закономірно зменшується при підвищенні температури на кожні 5 °С приблизно на 1 год. Крім того, спостерігається залежність часу початку гелеутворення, від співвідношення реагентів, із зменшенням кількості структуруючого агенту PEGDE 500 (у ряді 9 %; 6%; 4,5%; 3,6 %; 3 %), і, відповідно, збільшенням желатину, початок гелеутворення відтермінується на 10-25 хв.

Отримані основні закономірності можуть бути корисними для подальшої оптимізації процесу гелеутворення.

Таблиця 3.5.

Залежність часу гелювання від температури і складу гелеутворюючої композиції

№ п/п	PEGDE 500: желатин	T, °C	Час гелювання, хв	Тангенс кута нахилу	R ²
1.	1:3	80	102	853.4 ± 46.8	0.9351
2.	1:4	80	112	436.4 ± 6.7	0.9946
3.	1:5	70	248	203.5 ± 7.5	0.9694
4.		75	194	264.2 ± 6.8	0.9849
5.		80	128	321.9 ± 17.3	0.9378

Процеси гелеутворення досліджували також методом динамічного світлорозсіювання (DLS). Аналіз проводився в різні моменти часу, але тільки до моменту перед повним структуруванням, поки реакційна суміш ще зберігала здатність розбавлятися водою і була можливість отримати 0,1 % водні розчини для проведення DLS-аналізу. При співвідношенні PEGDE 500-желатин як 1 до 5 цей період складав до 2 год включно.

Для розуміння процесів, які відбуваються при структуруванні розчинів желатину варто мати уявлення про особливості поведінки макромолекул желатину у водних розчинах. Желатин (продукт денатурації білка фібрилярного колагену) є одним з природних поверхнево-активних речовин, і знайшов доволі широке використання як в харчових технологіях так і в промисловості, завдяки своїй мультифункціональності і унікальності властивостей. Уявлення про ліофільні дисперсні системи дозволяють розглядати поліпептидні ланцюги желатину в розведених водних розчинах як наночастинки термодинамічно стійких колоїдних систем з малим міжфазним натягом на границі желатин-розчинник. Такі системи часто класифікуються як золі - вільнодисперсні наносистеми, які за певних умов можуть перетворюватися у зв'язнодисперсні наносистеми - гелі. Характерне для желатину гелеутворення тобто золь-гель перехід відбувається самовільно. Сітка гелю на основі желатину формується при температурі нижче 35 °C і залежить від концентрації полімеру (ККГ - критичної концентрації гелеутворення). Як правило, значення ККГ лежать у межах 0.4-1.0 %, і, суттєво залежать від молекулярної маси желатину, рН середовища і температури [173].

За даними різних авторів для чистого желатину на першому етапі при охолодженні розчину до температури нижче 35 °C [174] відбувається нуклеація ділянок колагеноподібних спіралей в результаті обмеженого конформаційного переходу клубок - колагенова спіраль. Цей процес часто називають ренатурацією. На другому етапі гелеутворення формуються агрегати, сполучені колагеноподібними спіралями, які є по суті є мікрогелями. На третьому етапі з

цих агрегатів завдяки великій кількості фізичних взаємодій різної природи (водневі, ван-дер-Ваальсові, гідрофобні) утворюється просторова сітка гідрогелю, причому значною мірою вузлами сітки стають ділянки колагеноподібних спіралей.

Потрійна колагенова спіраль стабілізується у воді в результаті ван-дер-ваальсових взаємодій між піролідиновими кільцями проліну та оксипроліну та водневих зв'язків між воднем груп NH гліцину, OH оксипроліну та киснем груп CO [175, 176].

Але треба брати також до уваги, що внаслідок великої кількості здатних до іонізації бокових груп вздовж полімерного ланцюга як кислотної так і основної природи желатин відноситься до класу поліамфолітів. Для таких макромолекули у водному розчині існує певна концентрація водневих іонів, (ізоелектрична точка - ІЕТ), при якій кількість іонізованих основних груп дорівнює кількості іонізованих кислотних груп і в ізоелектричному стані молекулу желатину можна вважати загалом нейтральною, хоча вона має ще групи здатні до іонізації. Оскільки в ізоелектричній точці кількість взаємодіючих іонізованих основних і кислотних груп в молекулі однакове, то гнучка макромолекула в цьому стані прийме конформацію клубка. Враховуючи, що для желатину типу А, ІЕТ складає 7.4, а реакційна суміш при синтезі гідрогелю має рН 6.5, то можна вважати, що взаємодія діоксиранових структуруючих відбувається в умовах наближених до ізоелектричної точки желатину. Це накладає певні особливості на перебіг процесу структурування, а також дозволяє пояснити окремі властивості матриці гідрогелю, який при цьому утворюється [177].

Метод динамічного світлорозсіювання (DLS), використаний згідно з методикою (розділ 2, п. 2.3.2), дозволив простежити зміну розмірів частинок під час синтезу гідрогелю. DLS-аналіз початкової проби виявив переважну наявність частинок розміром ~25 нм у реакційному середовищі (рис. 3.12).

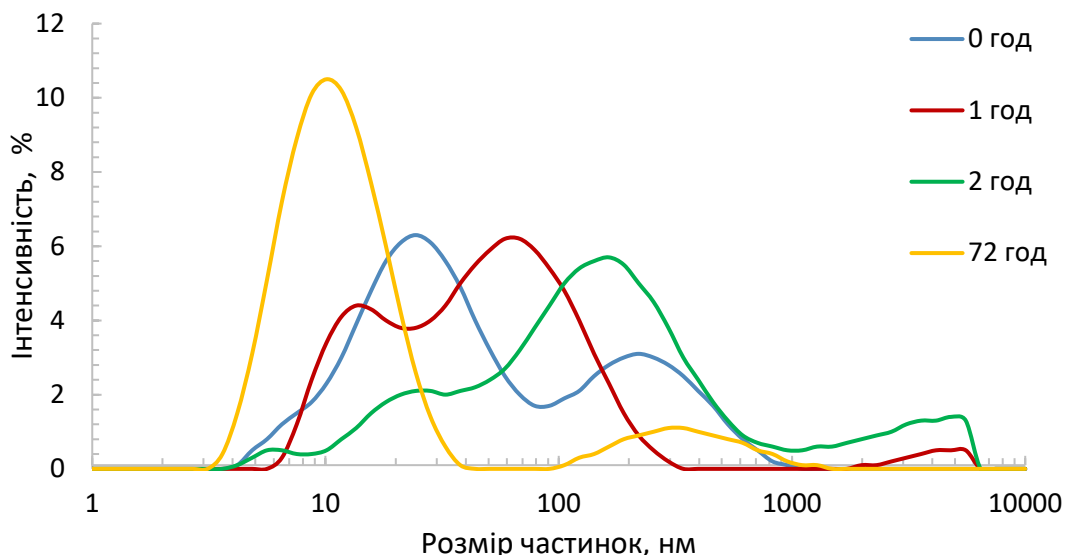


Рис.3.12. Інтенсивність зміни розмірів частинок в залежності від часу прогріву гелеутворюючої композиції зі співвідношенням PEGDE 500:желатин як 1:3 при $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Якщо уявити таку частинку, з врахуванням амінокислотного складу желатину, у водному середовищі, то можна вважати, що певна частина гідрофільних функційних груп зосереджена на її поверхні. Олігомерні молекули діоксирану PEGDE 500 розчинені у дисперсійному середовищі здатні вступати у взаємодію з цими групами зв'язуючи сусідні частинки, що відображається зростанням розмірів наночастинок. Уже через 1 годину перебігу реакції відбувається зростання їх розмірів до 68 нм, а на 2 год нагрівання їх розміри ще практично потроюються і в розподілі переважають частинки з діаметром 190 нм.

Це момент у якому настає гелеутворення і в'язкість реакційної суміші зростає настільки, що ротаційною віскозиметрією заміри проводити неможливо – оскільки утворюється суцільна полімерна сітка. Виходячи з цих фактів можна запропонувати схему гелеутворення в системі розчин желатину – PEGDE, яка передбачає структурування початково дисперсного середовища - колоїдного розчину частинок желатину, яке відбувається через ковалентне зв'язування зовнішніх доступних на поверхні наночастинок аміногруп взаємодією з діоксирановим структуруючим агентом, який розчинений в дисперсійному середовищі.

Таким чином можна запропонувати наступну узагальнену схему гелеутворення у розчині желатину при структуруванні діоксирановими похідними ПЕГ-400.

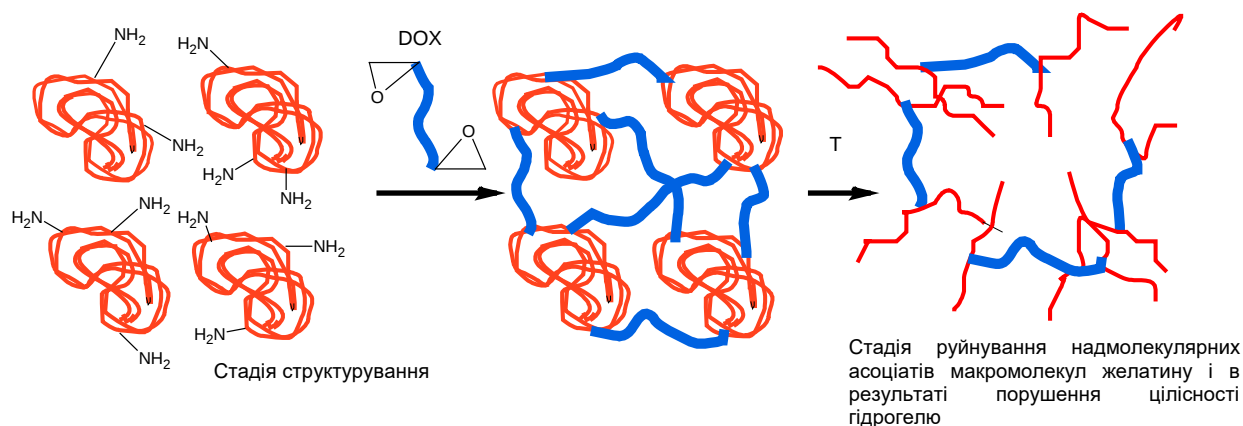


Рис. 3.13. Узагальнена схема структурування желатину у водному розчині в присутності діоксиранового структуруючого агента

Як підтвердження наведеної схеми структурування і утворення гідрогелю можна навести результати DLS-аналізу розчину, що отримується при тривалому нагріванні гідрогелю при 80 °C (співвідношення структуруючий агент:желатин як 1:3). За даними DLS в цей момент в розчині існують частинки, які за розмірами дещо менші за ті, які були у реакційному середовищі до структурування (Рис.3.12). Тобто, за цей час, відбувається повне деградування тривимірної структури і утворення розчину полімеру, який не здатний гелезуватися при охолодженні.

Враховуючи попередньо викладене, можна припустити, що при тривалому нагріванні відбулась остаточна гідратація і перехід у розчин макромолекул фрагментів колагеноподібних структур, які були первинними частинками до гелеутворення. По-друге, відбулось модифікування макромолекул желатину через приєднання структуруючого агенту у вигляді ПЕГівських залишків, яке перешкоджає зворотньому формуванню колагеноподібних надмолекулярних утворень, що забезпечують утворення фізичних гелів желатину при пониженні температури. В цьому випадку, характерного для розчинів желатину золь-гель переходу не відбувається і розчин не гелезується.

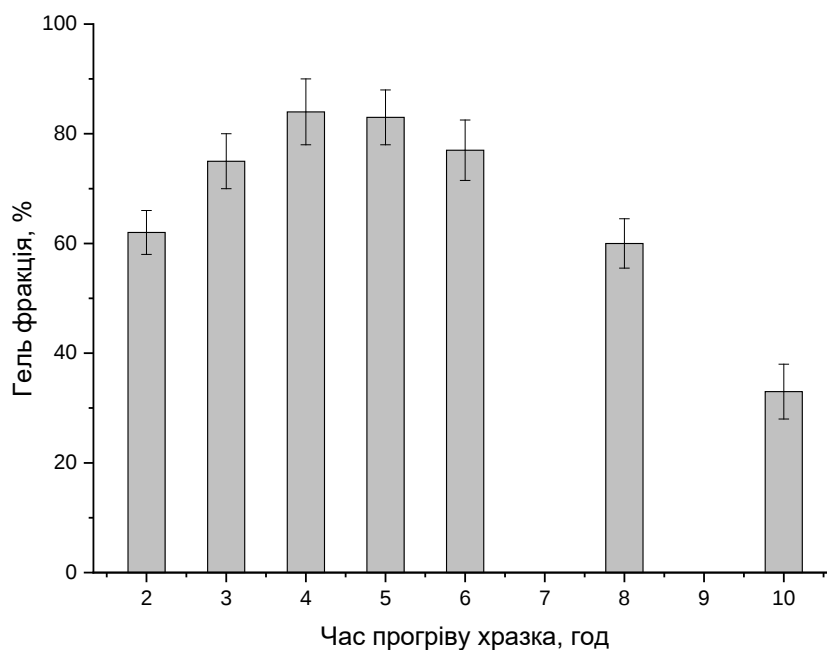


Рис. 3.14. Залежність гель-фракції (%) від тривалості синтезу (год) для гідрогелів на основі PEGDE 500 та желатину при їх співвідношенні як 1:3.

Неочевидне, але цілком вірогідне підтвердження цьому було отримано при встановленні оптимальної тривалості синтезу гідрогелів на основі желатину та структуруючого агенту PEGDE 500. Для цього було проведено аналіз гель-фракції зразків, синтезованих при різній тривалості структурування при 80 °C та співвідношенні 1:3. За цих умов початок утворення суцільної тривимірної сітки зафіксовано методом ротаційної віскозиметрії складає 103 хв. Тому початкове визначення гель-фракції було здійснено через 2 год проведення реакції структурування (до цього моменту гель-фракція не могла бути визначена). На рисунку 3.14. представлено залежність величини гель-фракції від часу впродовж якого відбувалося нагрівання реакційної суміші та синтез зразків гідрогелів.

Видно, що залежність має добре виражений екстремальний характер з максимальним значенням гель-фракції при 4-5 годинах прогріву. Менші значення гель-фракція, при меншій тривалості прогріву, є зрозумілі і пов'язані з недостатньо сформованою просторовою сіткою полімерного каркасу гідрогелю. Тоді як подовження синтезу понад 5 години не те що не призводить до зростання гель-фракції, а навпаки, після 6 годин синтезу відбувається статистично значиме зменшення гель-фракції. Цей ефект можна пояснити тим, що при тривалому

нагріванні внаслідок гідратації порушуються міжмолекулярні водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії, які стабілізують вторинну структуру білкових ланцюгів (яка характерна для колагену і частково зберігається у желатині). Якщо припустити що такі частинки виступають вузлами просторової полімерної сітки гідрогелю стає зрозуміло що порушення їх цілісності призводить до дестабілізації структури гідрогелю.

Таким чином, за підсумками реологічних та DLS досліджень, а також визначення гель-фракції, підтверджується припущення про те, що структурування у даній системі відбувається через формування ковалентних зв'язків між агрегатами макромолекул желатину, а не між окремими макромолекулами.

Крім того згідно отриманих даних тривалість процесу структурування у водному розчині желатину за використання діоксиранового структуруючого агенту PEGDE 500 в заданих умовах процесу (80 °C, загальна концентрація компонентів – 18 %) повинна бути наближеною до 4 годин. При цьому досягається найвищий ступінь структурування полімерної матриці гідрогелю і саме ці умови були визнані оптимальними і використовувались у всіх подальших дослідженнях.

РОЗДІЛ 4

СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЖЕЛАТИНОВИХ ГІДРОГЕЛІВ

Природні полімери дуже поширені при створенні сучасних матеріалів для фармації і медицини, оскільки вони, як правило, отримуються з живих організмів або рослин, нетоксичні, біосумісні і не викликають запальних реакцій організму [178, 179, 180]. Зокрема, желатин – це суміш поліпептидів різної молекулярної маси, які отримуються шляхом хімічного гідролізу колагену [181]. У водному середовищі желатин утворює гідроколоїди, які завдяки своїм унікальним функціональним можливостям, таким як загущення, текстурування, зв'язування води, стабілізація, емульгування, освітлення, плівкоутворення, адгезія, піноутворення та гелеутворення дозволяє його використовувати в найрізноманітніших сферах життєдіяльності [182, 183, 184].

Як показано на рисунку 4.1, полімерний ланцюг желатину складається з різних послідовностей амінокислот і, завдяки цьому складу, він не утворює небезпечних продуктів розпаду під час ферментативної деградації, що робить його ідеальним варіантом для терапевтичних пов'язок для загоєння ран. Він є природною реплікою позаклітинного матриксу (ПКМ), який знаходиться в тканинах і органах людського тіла, тому часто застосовується в галузі тканинної інженерії [185, 186, 187, 188]. Багато дослідників біомедичної сфери звертають увагу на желатин для створення нових біоматеріалів через його легку доступність, низьку вартість, високу біосумісність, неімуногенність, неканцерогенність, здатність до біодеградації, легкість формування [189, 190].

Амінокислоти пролін, гліцин і гідроксипролін є складовими желатину. Завдяки вмісту амінокислоти гліцину, клітини можуть прикріплюватися до поверхонь. Проте, він має низьку температуру плавлення і складається з рандомізованих макромолекулярних та гетерогенних структур. Желатин може метаболізуватися тканинами людини, що є ключовим фактором, який спричиняє

неослабний інтерес у спробах все ширшого його використання у фармацевтичній промисловості.

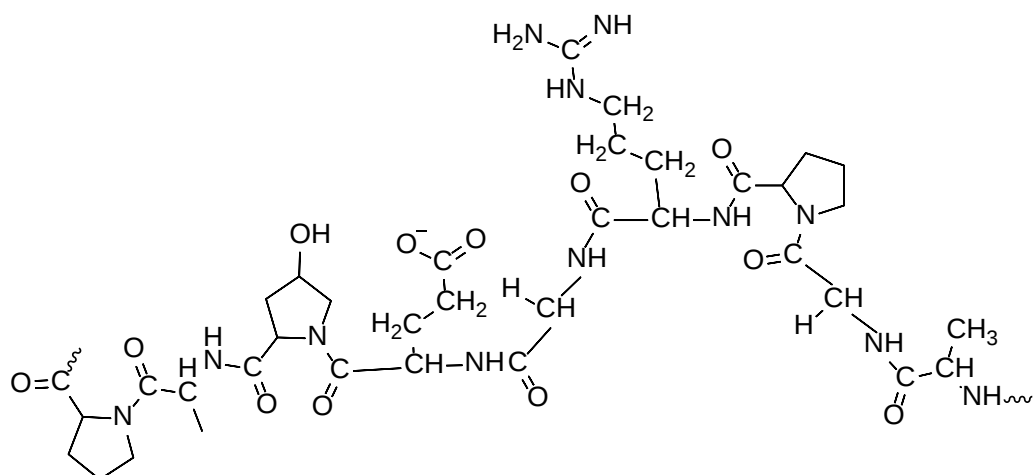


Рис.4.1. Фрагмент структурної формули желатину

Низька антигенність желатину робить його дуже популярним біополімером для використання в різних біологічних застосуваннях. Желатин, однак, є гідрофільним білком, який набрякає і розчиняється у воді, і для покращення механічних характеристик та довговічності, зазвичай надають перевагу його структуруванню, щоб забезпечити стабільність матеріалу в біологічних середовищах при температурі тіла.

Пов'язки на основі желатину володіють пористою структурою, що сприяє міграції клітин, надаючи структурну та механічну підтримку для регенерації тканин, а також можливість вбирати ранові екsudати та зберігати вологу в рані, сприяючи її загоєнню. Желатин містить амінокислотні послідовності аргінін-гліцин-аспарагін, які сприяють адгезії, диференціації та проліферації клітин. У процесі загоєння гідрогелеві желатинові матриці стимулюють епітелізацію та утворення грануляційної тканини [191].

Коли йдеться про полімери в біомедицині, питання стимуляції імунної відповіді є особливо важливим. Такі полімери не повинні викликати імунну реакцію в тканинах організму і вважається, що желатин, якщо і проявляє імуногенність, то дуже незначну, і тільки в окремих випадках.

Для утворення гідрогелів на основі желатину використовують хімічні та фізичні методи структурування. На сьогоднішній день хімічні є

найпоширенішими методами структурування желатину в незворотні та стабільні гідрогелі. Ковалентне зшивання желатину передбачає введення функціональних хімічних речовин у структуру желатинової сітки, зазвичай шляхом з'єднання вільних аміногруп лізину або незв'язаних груп глутамінової та аспарагінової кислот. Альдегіди (включаючи формальдегід, гліцеральдегід і глутаровий альдегід, ізоціанати, поліепоксида та природні сполуки, такі як геніпін, усі вони використовуються як структуруючі реагенти для даного типу взаємодії [142]. Структуруючі агенти, у більшості випадків, є токсичними хімічними речовинами та вимагають використання супутніх реагентів — каталізаторів, ініціаторів полімеризації або регуляторів рН. Залишкова присутність цих компонентів обмежує біосумісність гідрогелів та потребує трудомісткої очистки, що суттєво збільшує вартість і час виробництва [192].

Таким чином, цікавість на сьогодні мають гідрогелі, які можуть бути отримані без використання потенційно токсичних додатків і які не потребують виконання затратних стадій очистки.

4.1. Синтез желатинових гідрогелів.

В попередньому розділі було запропоновано і розглянуто метод отримання желатинового гідрогелю із застосуванням як структуруючого агенту водорозчинних діоксиранових похідних поліоксидиетиленгліколю. Внаслідок проведених досліджень встановлено що гідрогелі з оптимальними властивостями отримуються при використанні діоксиранових похідних отриманих на основі ПЕГ-400 і ПЕГ-600. Серед цих двох сполук діоксиранове похідне ПЕГ-400 виявився поширеним комерційно доступним продуктом тому саме він був обраний як базовий для подальших досліджень.

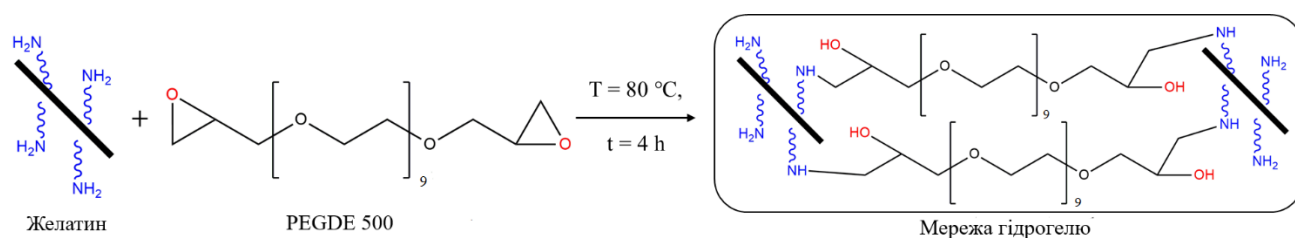


Рис.4.2. Схема утворення желатинового гідрогелю

Як буде показано в наступних викладеннях такий обраний підхід має декілька визначальних переваг: гідрогелі утворюються в одну стадію без контролю водневого показника; не потрібна стадія очищення від непрореагованого структуруючого; а також є можливість регулювання ступеня зашивки, набрякання, механічних характеристик, морфології, варіюючи вміст структуруючого агента і желатину у вихідній композиції.

Основою було використано желатин тваринного походження типу А. За відсутності регуляторів водневий показник реакційної суміші був в межах 6,0-6,5. За цих умов гідроксильні та карбоксильні групи найбільш імовірно в реакцію не вступають, а структурування відбувається через взаємодію з вільними аміногрупами, які не задіяні в утворенні пептидних зав'язків, зокрема лізіну.

Таблиця 4.1.

Співвідношення преполімерів (желатин, PEGDE 500) для синтезу гідрогелів

Номер зразка	Масове співвідношення		Вміст PEGDE 500, %	Вміст желатину, %
	PEGDE 500	Желатин		
1	1	0.8	10.00	8.00
2	1	1	9.00	9.00
3	1	2	6.00	12.00
4	1	3	4.50	13.50
5	1	4	3.60	14.40
6	1	5	3.00	15.00
7	1	6	2.57	15.43
8	1	7	2.25	15.75
9	1	8	2.00	16.00
10	1	10	1.64	16.36
11	1	15	1.13	16.87
12	1	25	0.69	17.31
13	0	1	0.00	18.00

Згідно методики 2.2.3 описаної в експериментальній частині при нагріванні водного розчину желатину за температури 70-80 °С, при різних співвідношеннях структуруючий агент : желатин в межах від 1÷0,8 до 1÷25 (табл. 4.2), відповідно, були отримані формостійкі зразки желатинових гідрогелів (зразки № 1 – 12) і

зразок неструктурованого желатину (№ 13) та проведено порівняльні дослідження їх властивостей.

4.2. Визначення ефективності структурування желатину за використання PEGDE 500.

Для підтвердження утворення просторової мережі з структурованих макромолекул желатину і структуруючого агенту проводили визначення гелі-фракції гідрогелів різного складу, які відрізнялися співвідношенням желатину до структуруючого агенту. Отримані результати вказують на те, що існує певний оптимум. Максимальна кількість актів поперечних зшивок, що відображається у максимальному вмісті гелі-фракції, реалізується за співвідношень у межах від 1:2 до 1:6 з утворенням зразків формостійкого при нагріванні гідрогелю, що у воді набрякає, але не розчиняється, на відміну від зразка неструктурованого желатину рис. 4.3.

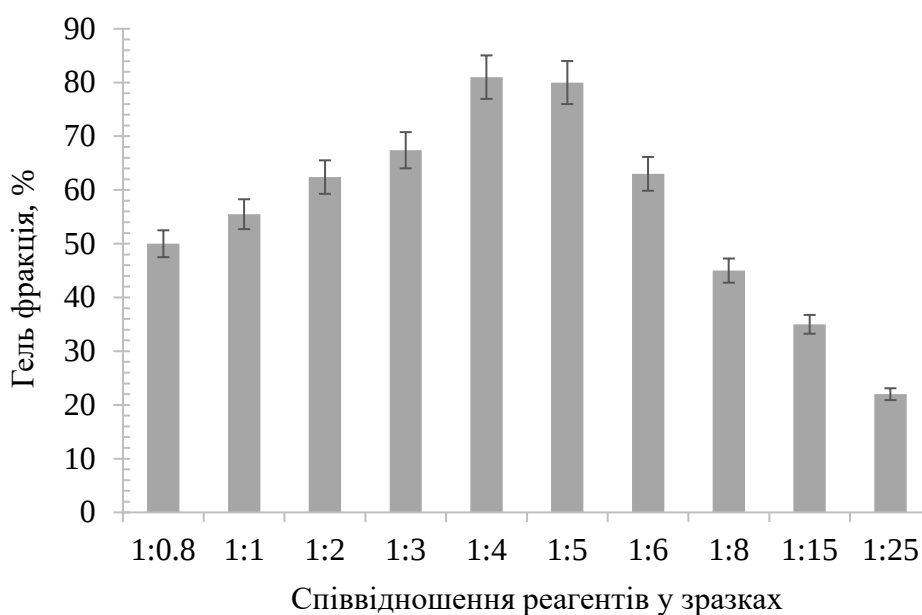


Рис.4.3. Гелі-фракція зразків гідрогелю отриманого при різному масовому співвідношенні структуруючого PEGDE 500 до желатину bloom 180

Опираючись на ці дані, для подальших досліджень були обрані умови синтезу, що забезпечували максимальне залучення реагентів у тривимірну полімерну сітку.

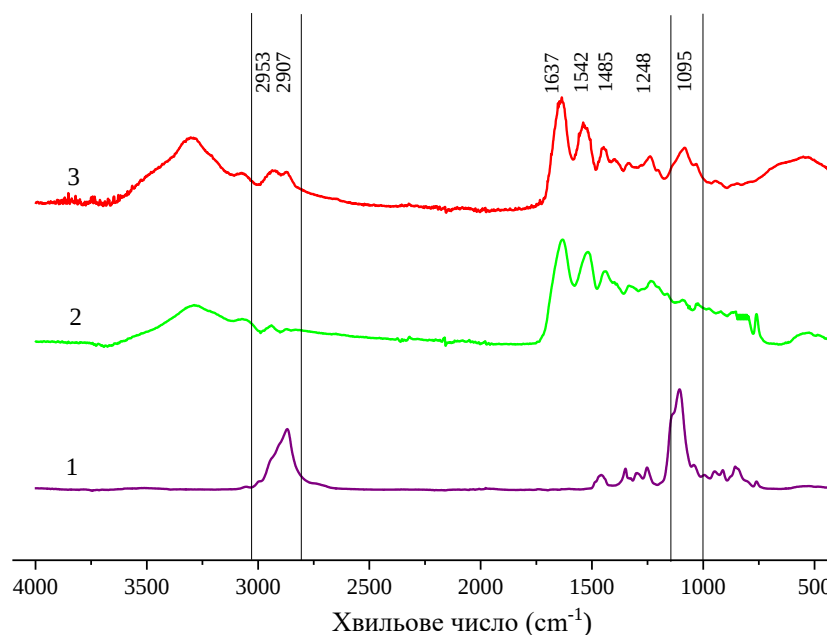


Рис. 4.4. ІЧ-спектри структуруючого PEGDE 500 (1), желатину (2) та гель- фракції (3) продукту реакції, виділеної після структурування желатину.

Присутність фрагментів як агента структурування так і желатину в структурованій полімерній сітці підтверджено IR-FTIR спектроскопією (рис. 4.4). В продукті, що є гелюфракцією з гідрогелю отриманого при співвідношенні PEGDE 500 до желатину 1 до 2, після видалення всіх водорозчинних компонентів чітко проявляються смуги поглинання, що належать до обидвох складових полімерного каркасу гідрогелю. В спектрі структурованого желатину не спостерігаються смуги, що можна віднести до оксиранового фрагменту PEGDE, але смуги валентних коливань простих етерних фрагментів ПЕГ в області 1100-1200 cm^{-1} спостерігаються; так само добре видно збільшення інтенсивності смуги поглинання 2907 і 2953 cm^{-1} , що відносяться до валентних коливань $>\text{CH}_2$ груп зі складу цього ж фрагмента. Смуги, які характерні для валентних коливань карбонілу ($\text{C}=\text{O}$) амідної групи желатину 1637 cm^{-1} (Амід I), деформаційні коливання групи $-\text{N}-\text{H}$ при 1542 cm^{-1} (Амід II) і валентні коливання групи $\text{C}-\text{N}$ при 1248 cm^{-1} (Амід III) залишились присутніми у спектрі тільки дещо змінилися співвідношення функційних груп у порівнянні з вихідним желатином, який вступив в реакцію.

4.3. Дослідження механічних властивостей зразків желатинових гідрогелів

У багатьох дослідженнях показано, що фізико-механічні властивості гідрогелів мають значний вплив на поведінку клітин, зокрема їх проліферацію, клітинну морфологію та утворення нових тканин [193, 194, 195]. Гідрогель незшитого желатину характеризується відносно низькою температурою плавлення, що призводить до утворення термооборотних гідрогелів, які втрачають формостійкість уже при температурі наближеній до температури тіла людини [196]. Зрозуміло, що індивідуально його неможливо використати як раневу пов'язку.

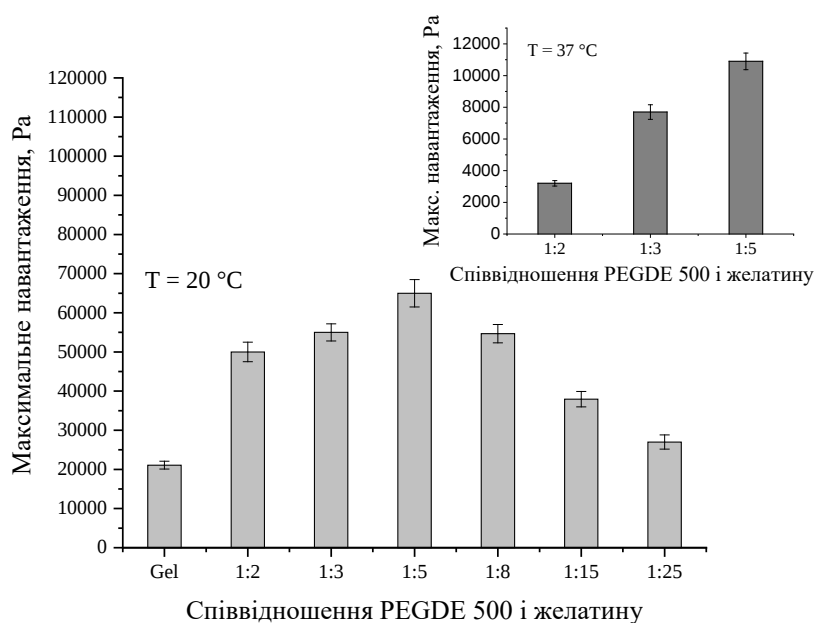


Рис. 4.5. Максимальні значення зусилля одноосового стиснення зразків гідрогелів із різним масовим співвідношенням структуруючого PEGDE 500 і желатину

Для покращення фізико-механічних властивостей гідрогелів на основі желатину використовують спрямоване модифікування, структурування та/або наповнення армуючими елементами, а також використання його тільки як додатку у складі багатокомпонентних матеріалів [197, 198].

У дослідженнях проведених раніше було встановлено, що 4 год при 80 °C є достатньо, щоб процеси структурування в обраній системі завершилися

(властивості гідрогелів на основі желатину Bloom 180 уже перестають суттєво змінюватися) і визначаються співвідношенням реагуючих компонентів. Вивчення механічних властивостей гідрогелю за температури 20 °C показало, що максимальне зусилля при одноосьовому навантаженні зразків досягається при співвідношенні структуруючий агент : желатин як 1 : 5 (рис.4.5). При тому високі значення демонструють також і зразки отримані при співвідношеннях 1 : 2 і 1 : 3. Тут варто зауважити, що гідрогель синтезований в цих умовах є дуже еластичним і не руйнується при таких випробуваннях навіть при максимальних ступенях деформації стиснення, а після знімання прикладеної сили відновлює свою форму. Зразки отримані при вищих співвідношеннях, як і гідрогель чистого желатину, мають меншу механічну міцність, не такі еластичні і при певному рівні деформації зазнають руйнування при цих випробуваннях. На цьому ж рисунку наведено результати випробування при температурі 37 °C. У зразках структурованих діоксирановим зшивачем спостерігається залежність механічних властивостей від температури. При тому зразки отримані при співвідношеннях 1 до 6 і вище (низький вміст структуруючого агенту) повністю втрачають механічну міцність так само як і гідрогель незшитого желатину. Збільшення вмісту агенту структурування за межі діапазону від 1 : 5 до 1 : 2 очевидно суттєво розбалансовує співвідношення реагуючих груп, що приводить до меншої кількості ефективних зв'язків, які формують полімерну матрицю гідрогелю, що також приводить до втрати міцності. При температурі тіла отримані гідрогелі хоча і не втрачають формостійкості, проте його пружність суттєво зменшується і відповідно зусилля необхідні для їх деформування зменшуються в 5.5÷17 разів в залежності від вмісту структуруючого агенту. В даному випадку має місце антибатна залежність і в діапазоні співвідношень від 1 : 2 до 1 : 5 найвищі механічні властивості, як при кімнатній так і при підвищеній температурі, має гідрогель з вмістом структуруючого 3 % (1:5), при якому ж спостерігаються і максимальні значення гель-фракції (рис. 4.5).

4.4. Дослідження набрякання і морфології зразків гідрогелів.

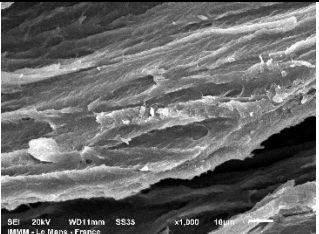
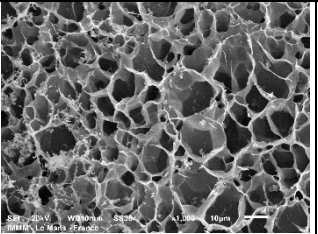
Підвищення міцності полімерних гідрогелів передбачають збільшення кількості поперечних зшивок у їх структурному каркасі, але це часто призводить до суттєвого погіршення інших характеристик (зменшення швидкості та рівноважного ступеня набрякання, швидкості та повноти сорбції та десорбції лікарських препаратів). Тому були проведені комплексні дослідження зміни ступеня набрякання гідрогелів в залежності від вмісту агента структурування при їх синтезі.

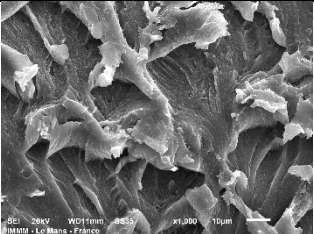
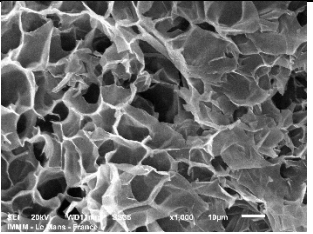
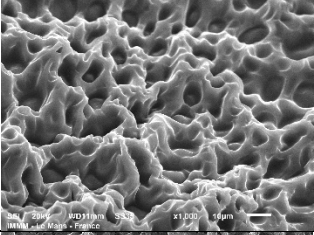
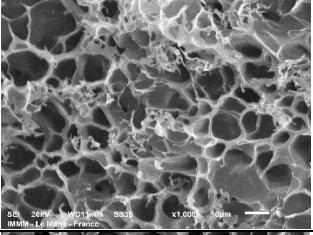
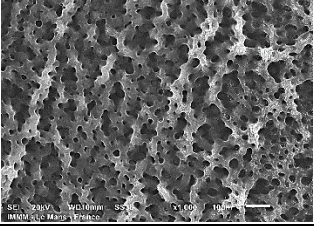
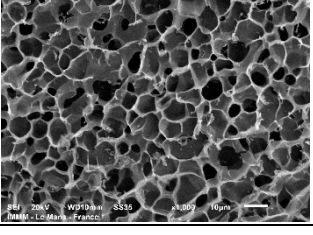
Оскільки передбачається, що желатинові гідрогелі будуть придатні до використання як засоби догляду за ранами актуальною є інформація про їх здатність набрякати у фізрозчині, а також поглинати ексудат [199, 200, 201].

В таблиці 4.2 приведено результати досліджень по набряканню у різних рідинах при двох температурах і приведено фотографії мікроструктури гідрогелів при різному ступені набрякання (представлено збільшення в 1000 разів).

Таблиця 4.2

SEM фотографії мікроструктури желатинових гідрогелів та характеристики набрякання цих гідрогелів отриманих при різних співвідношеннях структуруючого і желатину у воді, фізіологічному розчині та рідині, що моделює ексудат при температурах 20 °C та 37 °C.

Концентрація желатину, %	Концентрація PEGDE 500, %	Мікрофотографія вихідного зразка гідрогелю	Мікрофотографія набряклого у воді зразка гідрогелю	Розмір пор (μm)	Ступінь набрякання 20 °C/37 °C, Г середовища /г полімеру		
					Вода	Фізіологічний розчин	Моделюваний ексудат
18	0			25 ± 10	11,0/*	8,8/*	8,6/*

12	6			15 ± 7	16,4/44,3	11,5/18,4	9,6/13,0
13.5	4.5			12 ± 5	13,7/39,1	10,5/17,5	9,1/12,4
15	3			7 ± 3	11,0/32,7	8,8/14,2	8,7/13,0

** неструктурований желатин при температурі 37 °C плавиться і розчиняється*

Зразок гідрогелю, отриманий при співвідношенні 1 : 5, характеризується, у стані максимального набрякання, найменшими регулярними порами, що є симбатно до максимального значення міцності при випробуванні на стиск і найвищим значенням модуля зберігання G' . Разом з тим в ряді розглянутих співвідношень цей зразок гідрогелю має найменші значення набрякання у рідинах різної природи. Причому різниця у цьому параметрі для води, фізрозчину, ексудату є найменшою у порівнянні з іншими зразками і свідчить про максимально реалізований потенціал структурування (таблиця 4.2). Розмір пор у зразках отриманих при співвідношеннях 1 : 3 і 1 : 2 суттєво більший - 12 мкм і 15 мкм проте закономірності набрякання у різних рідинах однакові. Максимальні ступені набрякання спостерігаються для гідрогелю отриманого з найбільшим вмістом агента структурування – 1 : 2 (у досліджуваному діапазоні). Таким чином, гідрогелева пов'язка на основі желатину, виготовлена за запропонованим методом, демонструє здатність поглинати 45–60 г/дм² ранового ексудату, що відповідає вимогам для догляду за середньо- та слабоексудуючими ранами [202].

Кінетичні закономірності набрякання желатинових гідрогелів

Оцінка закономірностей набрякання гідрогелів у воді чи інших середовищах є важливою для розуміння механізму поглинання рідини, прогнозування швидкості набрякання та моделювання їх поведінки у реальних застосуваннях, таких як: доставка ліків; абсорбенти; сенсори вологості; очищення стічних вод. Метою дослідження є підбір математичної моделі, яка буде найкраще описувати набрякання желатинових гідрогелів, та визначення основних параметрів: константи швидкості (k) та показник механізму набрякання (n). Оцінку кінетики набрякання желатинового гідрогелю було визначено шляхом побудови графіків (рис. 4.6. А-В) і підбору найкращого співвідношення експериментальних даних до різних моделей: першого порядку (експотенційна), другого порядку (модель Шота), емпірична модель Пеппаса–Корсмейєра.

Перший порядок [203]:

$$W_t = W_\infty(1 - e^{-kt}) \quad (4.1)$$

або у логарифмічній формі:

$$-\ln(1 - W_t/W_\infty) = kt \quad (4.2)$$

Другий порядок [203]:

$$t/W_t = 1/kW_\infty^2 + t/W_\infty \quad (4.3)$$

Емпірична модель Пеппаса–Корсмейєра [204]:

$$W_t/W_\infty = kt^n \quad (4.4)$$

або у логарифмічній формі:

$$\ln(W_t/W_\infty) = \ln k + n \ln t \quad (4.5)$$

де k – константа швидкості; t – час, хв; W_t – набрякання гідрогелю в момент часу t ; W_∞ – рівноважне набрякання.

Емпірична модель Пеппаса–Корсмейєра враховує різні механізми набрякання (дифузійне та релаксаційне); n визначає механізм процесу:

- $n < 0.5$ – Фіківська дифузія (повільне проникнення води);
- $n \approx 0.5$ – класична Фіківська дифузія;
- $n > 0.5$ – набрякання обмежене релаксацією полімерної матриці;

– $n = 1$ – набрякання керується тільки релаксацією полімеру (аномальний транспорт).

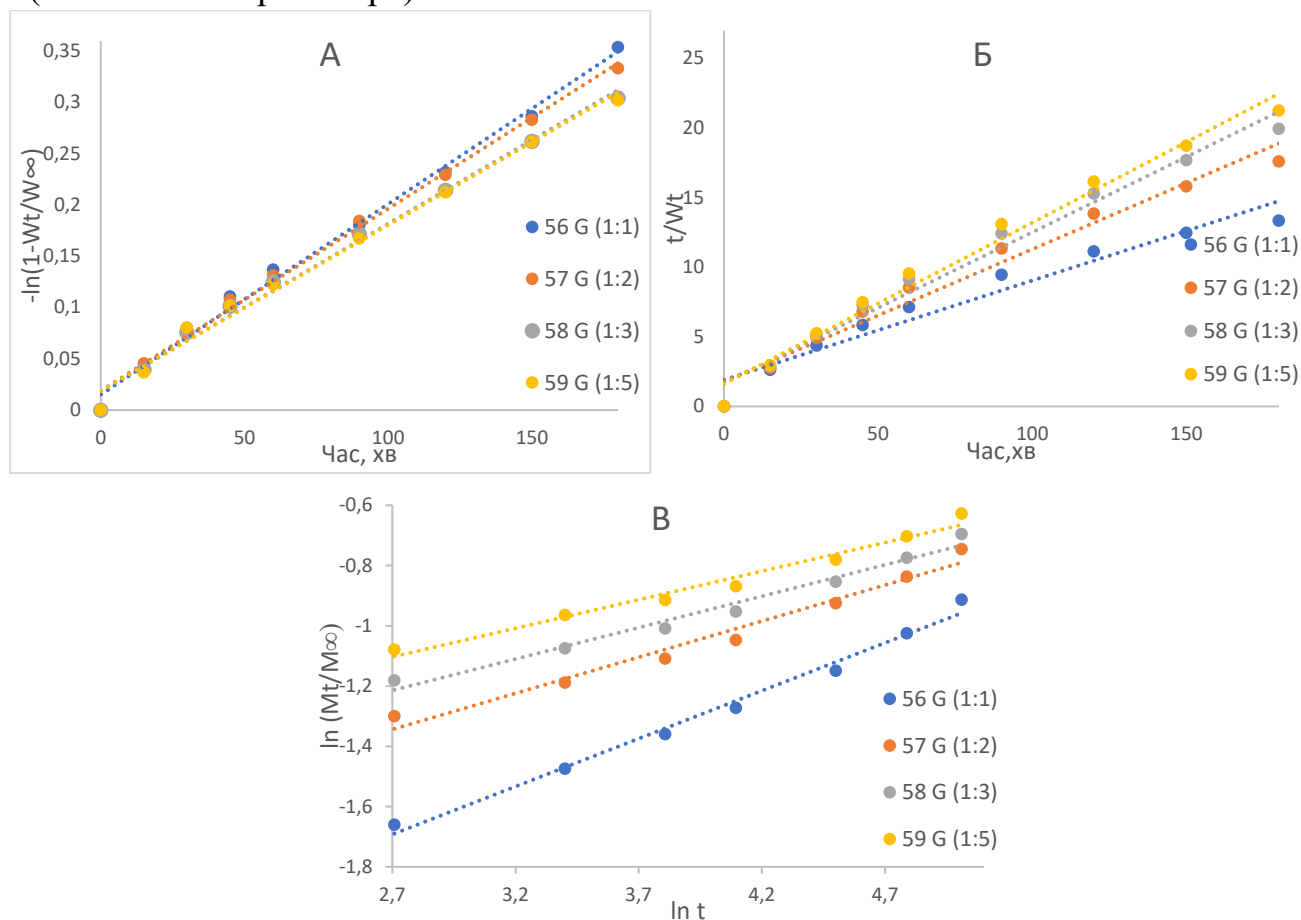


Рис. 4.6. Графіки кінетики набрякання желатинових гідрогелів: модель першого порядку (А), модель другого порядку (Б), емпірична модель Пеппаса–Корсмейєра (В)

Отримані експериментальні дані для кінетики набрякання гідрогелів з різним вмістом структуруючого та желатину були оброблені відповідно до вище зазначених математичних моделей. Для кожної моделі визначали нахил (константу швидкості) та коефіцієнт регресії R^2 (таблиця 4.3.), які використовувалися для прогнозування кінетики та механізму набрякання гідрогелевого матеріалу.

Побудувавши дані моделі та оцінивши кореляцію R^2 можна зробити висновок, що модель першого порядку дає найкращу відповідність, отже процес набрякання структурованих желатинових гідрогелів у воді керується дифузією та наближається до стану рівноваги експотенційно. Для визначення механізму

дифузії було застосовано модель Кросмейєра-Пеппаса, показник $n < 0.5$ у всіх випадках, характерний для Фіківської дифузії (класичне проникнення води в полімерну мережу), основний механізм переносу води – дифузія з поступовим насиченням, яку можна розділити на три етапи: 1) спочатку швидке набрякання – на початкових стадіях вода активно проникає в полімерну сітку, і швидкість набрякання висока; 2) поступове уповільнення – зі збільшенням кількості поглинутої води простір між полімерними ланцюгами заповнюється, і швидкість зменшується; 3) наближення до рівноваги – після тривалого часу гідрогель майже повністю насичується водою, і швидкість набрякання стає дуже низькою.

Таблиця 4.3

Параметри для прогнозування кінетики та механізму набрякання желатинових гідрогелів, отримані з математичних моделей

Кінетична модель	Параметр	Співвідношення PEGDE 500 до желатину			
		1:1	1:2	1:3	1:5
1 ^{го} порядку	k	0,0016	0,0016	0,0018	0,0019
	R^2	0,9936	0,994	0,9917	0,9905
2 ^{го} порядку	k	0,0714	0,0951	0,1084	0,1159
	R^2	0,9461	0,9712	0,9801	0,983
Кросмейєра-Пеппаса	k	0,0028	0,0102	0,0167	0,0242
	n	0,318	0,2397	0,2084	0,1897
	R^2	0,9886	0,9726	0,9765	0,9744

Показник n , визначений із моделі Кросмейєра-Пеппаса, характерно зменшується від 0,318 до 0,1897 із збільшенням ступеня структурування гідрогелів, що свідчить про перехід до більшого обмеження дифузії. Це пов'язано з утрудненням проникнення молекул води у більш щільну та структуровану полімерну сітку, що уповільнює набрякання.

Проте показник k (константа швидкості набрякання), визначений із моделі Кросмейєра-Пеппаса, зростає від 0,0028 до 0,0242 для більш структурованих гідрогелів, що вказує на швидше досягнення рівноважного стану. Це може

означати, що, незважаючи на повільніше набрякання на початкових стадіях, система загалом наближається до рівноваги швидше.

4.5. Дослідження реологічних властивостей желатинових гідрогелів.

Механічну поведінку желатинових гідрогелів та неструктурованого желатину було виражено через модулі зберігання G' і модулі втрат G'' для кількісної оцінки в'язкопружних характеристик одержаних матеріалів. Для визначення лінійної в'язкопружної області (LVR) кожного зразка при фіксованій частоті ($\omega = 10 \text{ рад} \times \text{с}^{-1}$) було проведено амплітудну розгортку при різних значеннях температури ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ і $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$).

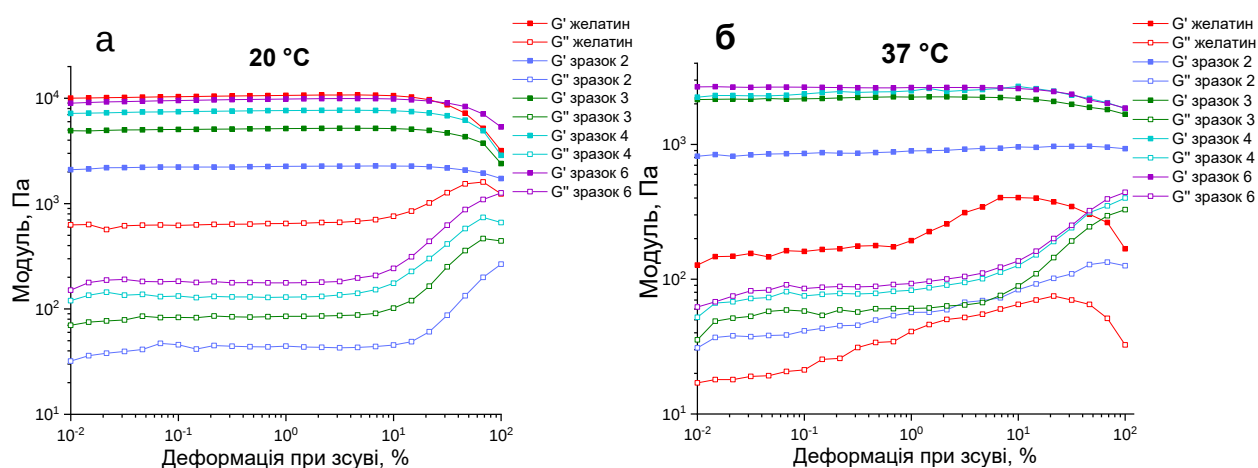


Рис. 4.7 Деформація (амплітудна розгортка) для досліджуваних гідрогелів: а - при $20 \text{ }^\circ\text{C}$, б - при $37 \text{ }^\circ\text{C}$

Із залежностей наведених на рисунку 4.6 видно, що LVR для усіх зразків для обох динамічних модулів при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (рис. 4.7 (а)) спостерігається до $10 \text{ } \%$ деформації, практично така ж LVR характерна і при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (рис. 4.7 (б)) для усіх зразків, окрім неструктурованого желатину (не містить PEGDE 500), що пов'язано з втратою формостійкості желатинового зразка при досліджуваній температурі.

Динамічний механічний аналіз, проведений на зразках желатинових гідрогелів (при $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$), показує кількісну інформацію про в'язкопружні та реологічні властивості матеріалу, шляхом вимірювання механічної реакції зразків, під час періодичної деформації. Представлено пружний (дійсний або

накопичувальний) модуль G' і в'язкий (уявний або втрати) модуль G'' . На малюнку G' і G'' зображено як функцію радіальної частоти, такий графік відомий як «механічний спектр» (рис.4.8). Дані отримані для систем желатин - PEGDE 500, характеризуються модулем накопичення G' , які демонструють виражене плато в досліджуваному діапазоні частот. Отримані механічні спектри гідрогелів на основі желатину демонструють характерні ознаки добре розвиненої пружної полімерної мережі, що проявляється у домінуванні модуля накопичення G' над модулем втрат G'' у всьому діапазоні частот [205].

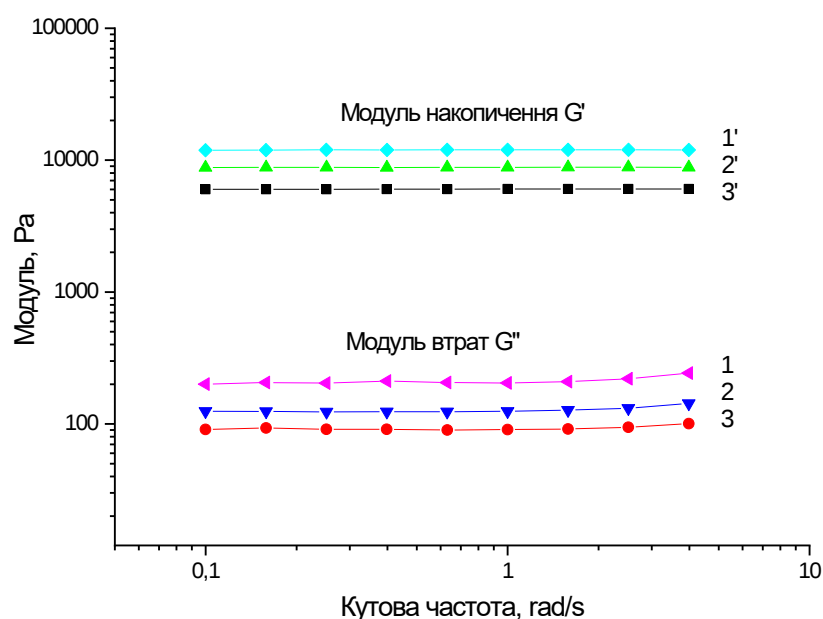


Рис. 4.8. Модуль накопичення (G') та модуль втрат (G'') зразків гідрогелів в залежності від частоти: 1,1' – зразок 3 (1:2); 2,2' – зразок 4 (1:3); 3,3' – зразок 6 (1:5)

Разом з тим, як видно з даних, отриманих в діапазоні оптимальних співвідношень (1:3÷1:5) значення модулів G' і G'' залежать обернено пропорційно до кількості структуруючого у вихідній композиції, - збільшення кількості структуруючого агента приводить до зменшення як кумулятивного модуля G' так і модуля втрат G'' . Тут варто взяти до уваги, що утворення гідрогелю желатину насамперед включає фізичну міжмолекулярну взаємодію і як результат формування спіралеподібних конфігурацій подібних до тих, що характерні для колагену [206]. Однак у гідрогелі утвореного з желатину і PEGDE 500 передбачається два різних типи взаємодії; - один це утворення з ковалентних

поперечних зв'язків між желатином і крослінкером, а другий - утворення фізичних перехресних зв'язків між ланцюгами макромолекул желатину. Зміна кількості структуруючого має вплив на обидва процеси. Також треба врахувати те, що для цих же співвідношень отримані значення гелю фракції (рис. 4.3) є високими і доволі близькими, що свідчить про достатньо добре розвинуту полімерну мережу при всіх трьох співвідношеннях.

Виходячи з цих фактів можна зробити висновок, що зростання частки структуруючого у початковій суміші відповідно зменшує частку желатину (табл.4.1), що зменшує можливості до фізичних взаємодій між макромолекулами желатину, які беруть участь в утворенні гідрогелю 2 роду. З іншого боку гідрофільний структуруючий ненульової довжини виконує в даній системі одночасно і функцію пластифікатора [207]. Використання такого структуруючого-пластифікатора, завдяки тому, що поперечні зв'язки формуються гнучкими гідрофільними поліоксидетиленовими фрагментами, до певної міри нівелює (маскує) ефекти від збільшення густоти зшивання при збільшенні його частки у початковій суміші через ефекти міжмолекулярної пластифікації.

Таким чином в оптимальному співвідношенні реакційноздатних груп у початковій суміші, при утворенні гідрогелю реалізується максимальна кількість поперечних міжмолекулярних зв'язків. За межами цього діапазону стабільні гідрогелі з підвищеними механічними властивостями не утворюються. Це можна пояснити або недостатньою кількістю структуруючого, при співвідношеннях більших за 1:5 (тобто недостатньою кількістю поперечних міжмолекулярних зв'язків у утвореній просторовій сітці гідрогелю) або надмірною кількістю структуруючого, коли не можна в силу стеричних ефектів здійснити міжмолекулярну взаємодію за його двома реакційними групами. У випадку співвідношень менших за 1:3, очевидно, уже відбувається утворення гребнеподібних макромолекул желатину з бічними замісниками молекул структуруючого, які провзаємодіяли по одній епоксидній групі з усіма

доступними аміногрупами, є переважаючим процесом, що, тим самим, частково виключило можливість утворення поперечних зшивок і тривимірних структур [208]. Желатин звичайно містить велику кількість функційних груп різної природи здатних за певних умов до взаємодії з епоксидами, але за методикою проведення даного синтезу участь в утворенні ковалентних зв'язків можна передбачати тільки для аміногруп, всі інші за цих умов ($\text{pH} = 5.5 \div 6$), якщо і взаємодіють, то в дуже несуттєвих кількостях.

Значення модуля збереження (G') на плато ($0,1\text{--}1 \text{ rad/s}$) позначають як G_e і використовують для кількісної оцінки міцності зв'язків між молекулами матриць. На основі цього значення можна визначити середній розмір сітки (ξ , нм) і густину зшивання (ν_e , моль/м³) гідрогелів, як описано в інших дослідженнях [209, 210]. Ці значення отримано з кривих частотного сканування при кімнатній температурі ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) та наведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Середнє та стандартне відхилення модуля накопичення на плато (G_e), середній розмір комірок ($\xi/\text{нм}$) та густини зшивання (ν_e , моль·м⁻³) для одержаних зразків желатинових гідрогелів

№ зразка	Співвідношення PEGDE 500 до желатину	G_e , Па	ξ , нм	ν_e , моль·м ⁻³
1	1:1	2050 ± 116	$12,54 \pm 0,29$	$0,84 \pm 0,05$
2	1:2	4104 ± 264	$9,95 \pm 0,65$	$1,68 \pm 0,10$
3	1:3	5710 ± 104	$8,92 \pm 0,26$	$2,34 \pm 0,04$
4	1:5	7490 ± 210	$8,15 \pm 0,52$	$3,07 \pm 0,09$
5	1:8	6290 ± 156	$8,63 \pm 0,39$	$2,58 \pm 0,06$
6	0:1	6500 ± 125	$8,54 \pm 0,31$	$2,67 \pm 0,05$

Значення G_e не демонструють значної варіації між зразками. Найнижчі значення G' спостерігалися у зразку 1 (при співвідношенні PEGDE 500 до желатину 1:1), що може вказувати на необхідність дотримання балансу між кількістю структуруючого та желатину у зразку. Цей баланс досягався у зразках 3 і 4 (при співвідношеннях PEGDE 500 до желатину 1:3 і 1:5, відповідно), що сприяло утворенню більшої кількості зв'язків між полімерними компонентами. Зразок 5 (1:8), за результатами реологічних досліджень, також показував

задовільні результати модуля накопичення, проте при нагріванні до температури застосування $T = 37 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ він втрачав свою форму, і подібно до неструктурованого желатину, втрачав свою форму і плавився.

Середній розмір сітки (ξ) у гідрогелях варіював від $8,15 \pm 0,52\text{ нм}$ (1:5) до $12,54 \pm 0,29\text{ нм}$ (1:1). Слід зазначити, що ці значення корелюють із розміром пор, хоча це приблизні значення, отримані на основі теорії пружності гуми [209, 211]. Загалом, розмір сітки зменшувався з досягненням оптимальної кількості структуруючого (1:5) в гідрогелі. Важливо, що значення розміру сітки та розміру пор мають важливе значення для біомедичних застосувань, впливаючи на іммобілізацію ліків, їх дифузію, деградацію, набрякання і деформацію гідрогелю [212].

Густина зшивки (n_e) у гідрогелях є важливим параметром, який характеризує кількість хімічних зв'язків (зшивок) між полімерними ланцюгами на одиницю об'єму. Вона вимірюється в $\text{моль} \cdot \text{м}^{-3}$ і відображає ступінь зшитості полімерної мережі. Чим вища густина зшивки, тим більше зв'язків утворюється між полімерними ланцюгами, що впливає на механічні, фізичні та функціональні властивості гідрогелю.

Аналіз густини зшивки для наведених зразків:

- Зразок 1 (1:1) та Зразок 2 (1:2): густина зшивки становить $0,84 - 1,68\text{ моль} \cdot \text{м}^{-3}$. Це найнижчі значення серед досліджуваних зразків, що вказує на меншу кількість зв'язків між полімерними ланцюгами. Це може бути пов'язано з надлишковою кількістю структуруючого агента (PEGDE 500) та призводить до перенасичення та зниження ефективності зшивки.

- Зразок 3 (1:3) і зразок 4 (1:5): густина зшивки досягає $2,34 - 3,07\text{ моль} \cdot \text{м}^{-3}$. Це середні значення для досліджуваних зразків, вони свідчать про баланс між кількістю структуруючого агента та желатину, що сприяє утворенню щільнішої та стабільної мережі із залученням максимальної кількості поперечних зв'язків.

- Зразок 5 (1:8) і зразок 6 (0:1): густина зшивки варіюється у межах $2,58 - 2,67\text{ моль} \cdot \text{м}^{-3}$. Хоча значення не сильно відрізняються від зразків 3 і 4, проте

надлишок желатину (зразок 5, табл. 4.4.) та відсутність структуруючого (зразок 6 – неструктурований желатин, табл. 4.4.) впливає на температурну стабільність цих гідрогелів, вони стають термооборотними і плавляться при фізіологічних температурах.

Можна вважати оптимальними співвідношення (1:3 та 1:5) при яких забезпечується максимальну густину зшивки, що відповідає найбільшій кількості зв'язків у полімерній мережі. Надлишок або недостача структуруючого агента призводять до зниження густини зшивки, що впливає на температурну стабільність та функціональні властивості гідрогелю.

4.6. Теплова поведінка гідрогелів на основі желатину.

Теплові переходи гідрогелів на основі желатину з різним ступенем структурування поліетиленгліколь диепоксидом (PEGDE 500) були досліджені методом диференціальної сканувальної калориметрії (DSC). На рис. 4.9 наведено термограми для неструктурованого желатину та зразків, структурованих при масових співвідношеннях PEGDE:желатин від 1:1 до 1:5, отриманих при нагріванні гідрогелів в діапазоні від 10 до 80 °C при швидкості сканування 1 °C/хв.

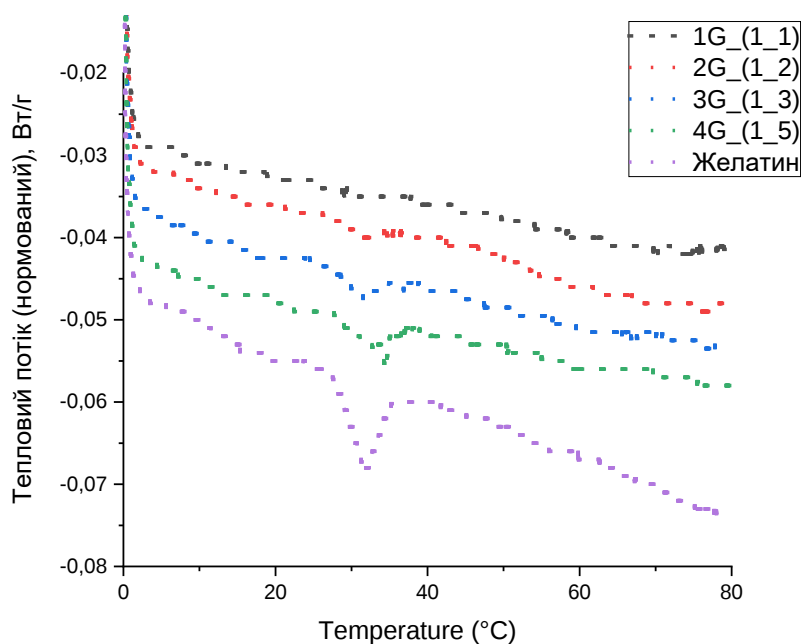


Рис.4.9. DSC-термограми зразків гідрогелів на основі желатину і структуруючого диепоксиду поліетиленгліколю (PEGDE 500) при різних

співвідношеннях PEGDE 500:желатин (1:1, 1:2, 1:3, 1:5) у порівнянні із зразком неструктурованого желатину.

Значення ентальпії денатурації, пов'язане з ендотермічним піком, відповідає відносному вмісту потрійної спіральної структури в зразках і є значно нижчим для зразків гідрогелів структурованих PEGDE 500 порівняно зі зразком неструктурованого желатину [213]. Температури плавлення ($T_{пл}$) та ентальпії плавлення (ΔH), отримані для гідрогелів желатину, перехресно структурованих за різних концентрацій PEGDE 500 (від 0 до 9 % в гідрогелі), досліджених на зразках гідрогелю наведені в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Температури плавлення ($T_{пл}$) та ентальпії плавлення (ΔH) обчислені з кривих DSC-аналізу (рис.4.8) для зразків желатинових гідрогелів та неструктурованого желатину

Зразок	PEGDE 500: желатин	Вміст PEGDE 500 в зразку, %	$T_{пл}, ^\circ C$	$\Delta H, Дж/г$
1G*	1:1	9	—	—
2G	1:2	6	$31,25 \pm 0,52$	$0,26 \pm 0,01$
3G	1:3	4,5	$32,95 \pm 0,65$	$1,24 \pm 0,03$
4G	1:5	3	$34,01 \pm 0,77$	$2,07 \pm 0,05$
Желатин	0:1	—	$31,54 \pm 0,68$	$2,86 \pm 0,06$

** - не зафіксовані або не достатні сигнали при DSC-вимірюваннях зразка гідрогелю 1G для їх аналізу*

Зміна теплового потоку, зафіксована методом DSC, відповідає енергії, необхідній для розплавлення зон з'єднання та здійснення трансформації «спіраль–клубок» і характерна для зміни конформації макромолекул желатину [214, 215]. Зразок неструктурованого желатину демонстрував чітко виражений ендотермічний пік у районі 31-32 $^\circ C$, що свідчить про наявність термічно оборотних агрегатів (потрійних спіралей). Із підвищенням вмісту структуруючого агенту (від зразка 4G до 1G) інтенсивність піку поступово зменшується, що може вказувати на зниження вмісту впорядкованих структур. У зразку 1G (1:1) з найбільшою кількістю структуруючого – 9 %, ендотермічний перехід практично зникає, що свідчить про пригнічення формування надмолекулярних утворень, ймовірно, через надмірну модифікацію, яка обмежує

рухливість макромолекул і перешкоджає їх впорядкуванню. Зразки желатинових гідрогелів 3G (1:3) та 4G (1:5) із вмістом структуруючого 4,5 % і 3 %, відповідно, не демонструють збільшення температури плавлення у порівнянні зі зразком неструктурованого желатину, що може свідчити про те що до певного співвідношення у системі існує фаза чистого желатину яка зберігається при структуруванні. Беручи до уваги отримані результати можна вважати, що у зразку із співвідношенням 1:5 максимально ефективно реалізується потенціал структуруючого агенту у створенні міжмолекулярних зв'язків, що утворюють просторову сітку гідрогелю. Такий висновок дуже добре корелює з результатами механічних випробувань, гель-фракції та набрякання зразків гідрогелів отриманих при різних співвідношеннях структуруючого, результати яких наведені в цьому розділі.

4.7. Дослідження цитотоксичності одержаних зразків желатинових гідрогелів

Отримані в даній роботі гідрогелі на основі желатину можуть бути використані для лікування ран і, як відомо, основними вимогами до матеріалів, для яких передбачається прямий контакт з тканинами живих організмів, є їх нетоксичність і біологічна сумісність. Тому першочерговим завданням є прогнозування та експериментальна оцінка їх впливу на організм та його складові. Одним зі способів є встановлення їх впливу на процеси метаболізму живих клітин та їх життєздатність *in vitro*.

Оцінку цитотоксичності проводили як для структурованого желатину, так і для структуруючого агента PEGDE 500 згідно методики 2.2.16 наведеної в експериментальній частині.

Отримані результати свідчать про відсутність токсичної дії структуруючого агенту та отриманих за його використання гідрогелів. Виживання клітин спостерігається на рівні з контролем і практично не залежить від кількості матеріалу зразка (таблиця 4.6).

Таблиця 4.6

Виживання живих клітин (сперматозоїдів бика) при прямому контакті із зразками гідрогелю та структуруючим агентом

Номер п/п	Зразок	Кількість зразка, мг	Виживання, год
1	η^2		0.162
	PEGDE 500	50	165.0 ± 8.87
		20	165.0 ± 8.87
		10	168.0 ± 8.49
2	η^2		0.364
	Зразок 6 (таблиця 4.1)	50	150.0 ± 5.20
		20	146.0 ± 9.95
		10	148.0 ± 9.95
3	η^2		0.042
	Зразок 2 (таблиця 4.1)	50	144.0 ± 8.49
		20	150.0 ± 5.20
		10	150.0 ± 5.20
4	Контроль		150.0 ± 5.20

Біосумісність отриманих гідрогелів, забезпечується використанням в їх складі природного полімеру, зокрема, полімеру білкової природи - желатину. Він є біосумісним та біодеградабельним полімером, і може бути джерелом амінокислот або коротких пептидів за рахунок яких відбувається утворення нової сполучної тканини в процесах регенерації пошкоджених живих тканин [216].

4.8. Дослідження деградації зразків желатинових гідрогелів під дією ферменту протеази.

Деградація гідрогелів сформованих на основі желатину під дією ферментів є ключовим процесом, особливо в тканинній інженерії, доставці ліків та біомедичних застосуваннях. Желатин, який отримують із колагену, утворює гідрогелі, що є біодеградабельними, що робить їх корисними для створення каркасів, які поступово руйнуються з часом, коли формується нова тканина або вивільняються терапевтичні агенти. Желатин складається з амінокислотних послідовностей, які є особливо чутливими до дії протеолітичних ферментів,

таких як матриксні металопротеїнази, колагеназа або іншими ферментами, що націлені на розщеплення пептидних зв'язків [217].

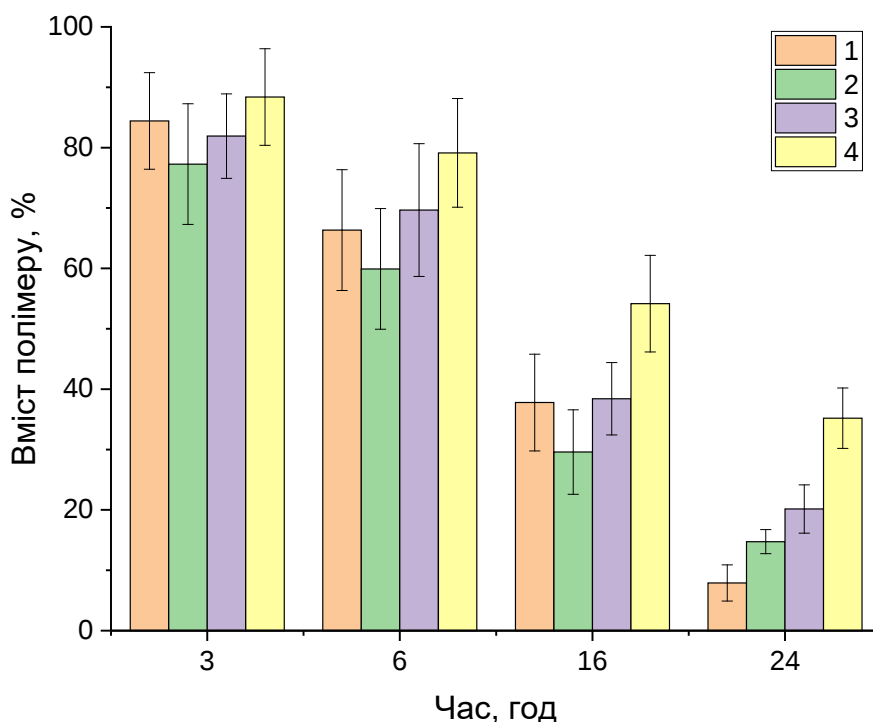


Рис. 4.10. Ферментативна деградація гідрогелів при 20 °С: 1 – не структурований желатин; 2, 3, 4 – желатинові гідрогелі із співвідношенням 1:2, 1:3, 1:5 структуруючого PEGDE 500 до желатинової основи, відповідно.

У біомедичних застосуваннях контрольована деградація є важливою для того, щоб гідрогель зберігав свою структуру протягом потрібного часу перед його розпадом.

Дослідження процесу ферментативної деградації отриманих желатинових гідрогелів проводили за методикою 2.2.14 описаної в розділі 2. Дослідження проводили при 20 °С для того, щоб можна було порівняти зразки структурованого гідрогелю з зразками неструктурованого желатинового гідрогелю.

Як можна побачити на рисунку 4.10., особливо, на 24 год досліджень зразки структурованого желатину менше піддаються впливу ферменту і деградують повільніше ніж зразок неструктурованого желатину, найкраще це спостерігається для зразка 4 (співвідношення структуруючого до желатину 1 до 5) на 24 год дослідження залишається близько 40 % полімерів, а у зразку 1 (неструктурований желатин) – залишається менше 8 % від початкового вмісту

полімерів. Такі результати свідчать про те, що утворення ковалентних зв'язків між макромолекулами в структурованих зразках желатинових гідрогелів і утрудненні доступу ферменту до пептидних зв'язків в макроланцюгах, і чим більше таких зшивок, тим повільніше проявляється деструкція зразка під впливом протеази.

4.9. Дослідження закономірностей вивільнення препаратів з гідрогелів желатину структурованого PEGDE500.

Дослідження закономірностей вивільнення лікарських засобів (таких як лідокаїн, новокаїн та диклофенак) з гідрогелевих систем на основі желатину мають важливе значення для розробки ефективних систем контрольованої доставки препаратів. Такі системи можуть забезпечити тривалу та цільову терапію, зменшити побічні ефекти та покращити біодоступність ліків [218, 219]. Гідрогелі на основі желатину є перспективними носіями завдяки їхній біосумісності, біодеградації та можливості модифікації їхніх фізико-хімічних властивостей [220]. Дослідження вивільнення препаратів з гідрогелів дозволить адаптувати композитні системи під індивідуальні клінічні вимоги, що підтверджується актуальністю подібних досліджень у сучасній літературі та відповідає сучасним тенденціям персоналізованої медицини [221, 222].

Для опису процесу вивільнення препаратів були застосовані різні математичні моделі. Закономірності вивільнення лідокаїну, новокаїну, диклофенаку з желатинового гідрогелю було визначено шляхом підбору найкращого співвідношення експериментальних даних (частка вивільненого препарату залежно від часу) до різних моделей: кінетики нульового порядку, першого порядку, моделі Хігучі та Гіксона–Кровела. Механізм вивільнення препарату може бути визначений за рівнянням Корсмейєра–Пепаса.

Кінетичні моделі:

Нульовий порядок [223]:

$$W = k_0 t \quad (4.6)$$

Перший порядок [224]:

$$\log (100 - W) = \log 100 - k_1 t \quad (4.7)$$

Кінетика Хігучі [225]:

$$W = k_{HT} t^{1/2} \quad (4.8)$$

Кінетика Гіксона–Кровела [226]:

$$(100 - W)^{1/3} = 100^{1/3} - k_{HCT} t \quad (4.9)$$

Рівняння Корсмейєра–Пепаса [204]:

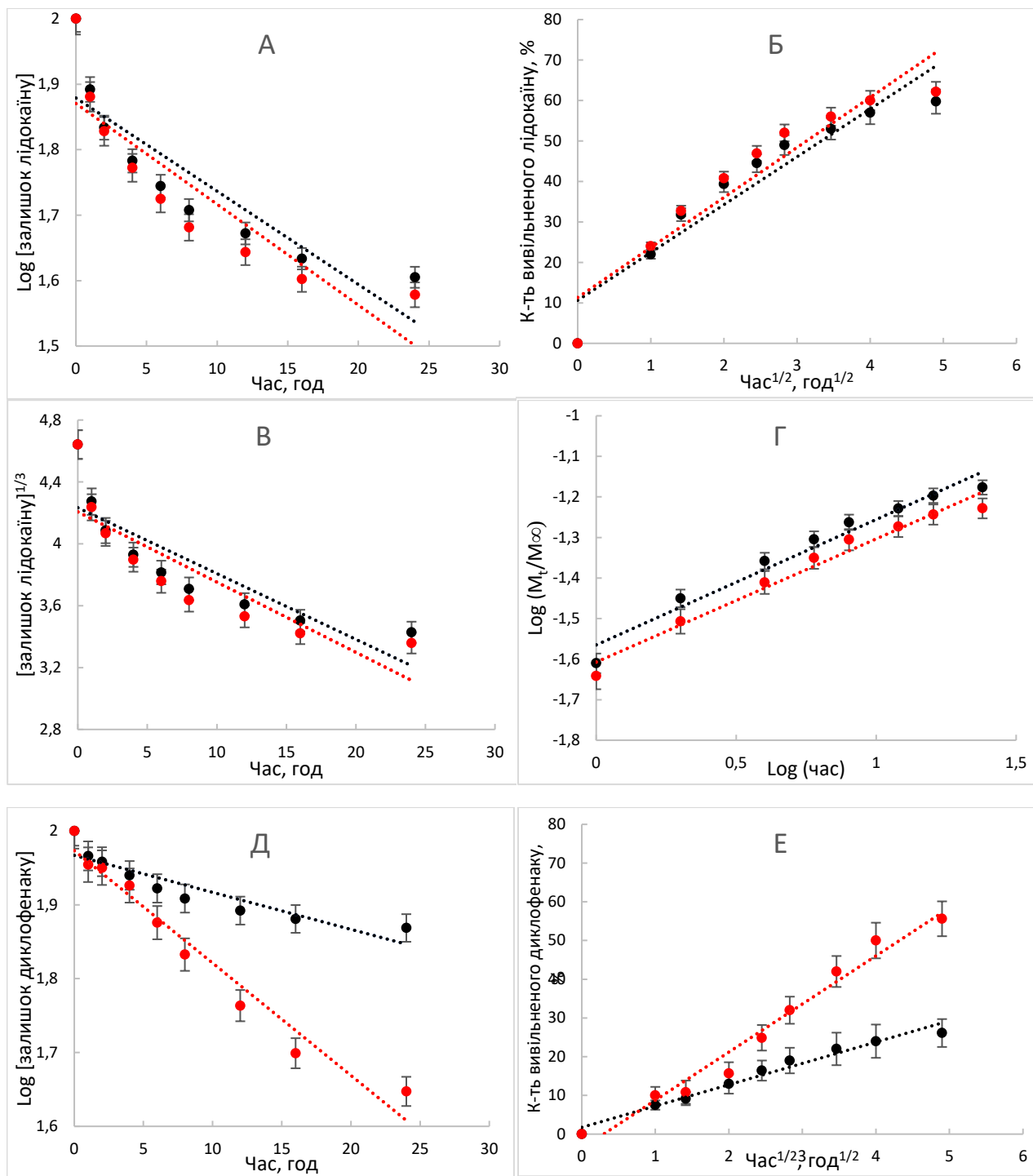
$$M_t/M_\infty = k t^n \quad (4.10)$$

де k_0, k_1, k_H та k_{HC} – константи швидкості вивільнення лікарського засобу відповідно для моделей нульового порядку, першого порядку, Хігучі та Гіксона–Кровела. W – кумулятивний відсоток вивільненого препарату в момент часу t , M_t/M_∞ – фракція вивільненого препарату в середовище розчинення, k – константа, що враховує геометричні та структурні властивості таблетки.

На основі рівняння Корсмейєра–Пепаса показник дифузії n прогнозує механізм вивільнення препарату:

- якщо значення $n = 0.5$, вивільнення відбувається за законом Фіка (Fickian diffusion);
- якщо $n < 0.5$, процес контролюється квазі-Фіковою дифузією (quasi-Fickian diffusion);
- якщо $n > 0.5$ (до 1), це вказує на аномальний механізм вивільнення препарату;
- якщо $n = 1$, очікується вивільнення за нульовим порядком.

Отримані експериментальні дані для лідокаїну гідрохлориду (рис. 4.11А-Г), новокаїну гідрохлориду, диклофенаку (рис. 4.11. Д-Ж) були оброблені відповідно до вище зазначених математичних моделей. Для кожної моделі визначали нахил (константу швидкості) та коефіцієнт регресії R^2 , які використовувалися для прогнозування кінетики та механізму вивільнення препарату. Значення констант швидкості вивільнення (k_0, k_1, k_H та k_{HC}) і показника вивільнення n у степеневому законі (модель Корсмейєра–Пепаса) наведено в Таблиці 4.7 разом із відповідними значеннями R^2 .



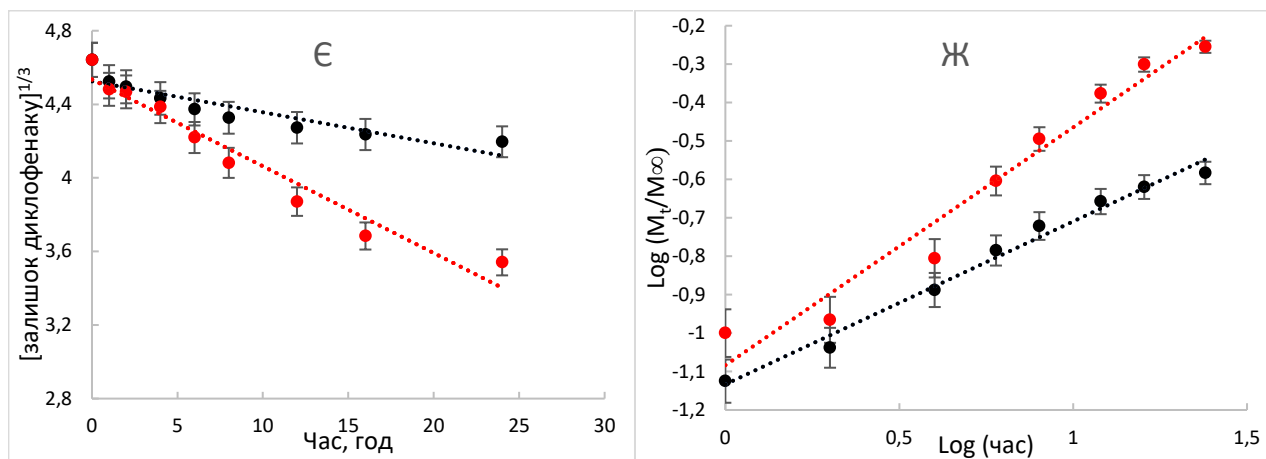


Рис. 4.11. Графіки кінетики вивільнення препаратів. Лідоканін гідрохлорид з желатинового гідрогелю: кінетика першого порядку (А), кінетика Хігучі (Б), кінетика Гіксона-Кровелла (В) та Корсмейєра-Пеппаса (Г). Диклофенак: кінетика першого порядку (Д), кінетика Хігучі (Е), кінетика Гіксона-Кровелла (Є) та Корсмейєра-Пеппаса (Ж).

Таблиця 4.7

Параметри кінетики вивільнення препаратів з желатинового гідрогелю в середовище фосфатно-сольового буферного розчину (PBS, рН = 7,4) і середовище PBS з додаванням ферменту протеази.

Модель вивільнення		Лідокаїн		Новокаїн		Диклофенак	
		PBS	PBS + фермент	PBS	PBS + фермент	PBS	PBS + фермент
Кінетика 0 ^{го} порядку	k_0 (h ⁻¹)	1,9663	2,0504	1,2617	1,7724	0,9714	2,3443
	R ²	0,2919	0,809	0,6281	0,6308	0,8068	0,9219
Кінетика 1 ^{го} порядку	k_1 (h ⁻¹)	0,0327	0,0355	0,0164	0,0272	0,0115	0,0350
	R ²	0,7786	0,7771	0,6707	0,7097	0,8381	0,9622
Кінетика Хігучі	k_H (h ^{-1/2})	11,826	12,366	7,675	10,799	5,5068	12,425
	R ²	0,902	0,8988	0,8724	0,879	0,9733	0,9721
Гіксона-Кровела	k_{HC} (h ⁻¹)	0,0425	0,0454	0,0232	0,0363	0,0168	0,0472
	R ²	0,7419	0,7392	0,6567	0,6839	0,8279	0,9507
Корсмейєра-Пеппаса	K (h ⁻ⁿ)	0,0247	0,0272	0,1246	0,2043	0,0736	0,0825
	n	0,3039	0,3093	0,3958	0,3426	0,4239	0,6189
	R ²	0,9704	0,9641	0,8915	0,9279	0,9856	0,9588

Враховуючи значення R², було встановлено, що процеси вивільнення препаратів найбільшою мірою відповідають моделі Хігучі порівняно з іншими. Значення показника вивільнення ($n < 0.5$) для лідокаїну гідрохлориду ($n = 0,3039$ і $0,3093$), новокаїну ($n = 0,3958$ і $0,3426$) та диклофенаку (у PBS $n = 0,4239$), отримані з рівняння Корсмейєра–Пеппаса, вказують, що процес контролюється квазі-Фіковою дифузією. Низький показник n (експонента вивільнення) свідчить

про дифузійно-контрольований механізм вивільнення, що забезпечує поступову доставку препарату без критичного піку концентрації. Це особливо важливо для лікарських засобів із вузьким терапевтичним вікном, де бурст-ефект (burst release, надмірне початкове вивільнення) може спровокувати дозозалежну токсичність [227], а для місцевих анестетиків може викликати системну токсичність [228]. Якщо $n < 0,5$, лікарська речовина вивільняється повільніше, ніж за класичною дифузією Фіка. Це сприяє досягненню тривалого вивільнення, елімінує феномен надмірної початкової дози та покращує стабільність лікарської форми при зберіганні.

4.10. Дослідження антимікробних властивостей зразків желатинових гідрогелів завантажених бактерицидними препаратами.

Для гідрогелевих пов'язок призначених для догляду за важкозагоюваними ранами важливо містити препарати, які здатні пригнічувати розвиток патологічних бактерій. Одним з найпоширеніших препаратів цього класу є хлоргексидин біглюконат. Хлоргексидин є активним відносно вегетативних форм грамнегативних і грампозитивних бактерій, а також дріжджів, дерматофітів і ліпофільних вірусів. Застосовується для лікування і профілактики ранових інфекцій в хірургії, травматології, комбустіології, стоматології [229, 230].

Гідрогелі, до складу яких введений хлогексидин, мають високий потенціал для використання в пов'язках для ран і, як очікується, будуть придатними для успішного лікування широкого спектру інфекцій, які супроводжують погано заживаючі рани.

Дослідження вивільнення хлоргексидину із складу синтезованих гідрогелів (табл. 2.1., зразок 3, 1 % ХГ в гідрогелі) проводили в середовищі октанолу, фізрозчину та модельного ексудату. Дослідження вивільнення в октанол моделює вивільнення в проблемні зони без пошкодження шкіри тобто в рани без ексудації (пролежні, гематоми та ін.). Вивільнення у фізіологічний розчин та

модельний ексудат демонструє можливість вивільнення препарату в ексудуючі рани.

На рис.4.12 приведені дані щодо вивільнення хлоргексидину в різні середовища на п'яту годину. Проведені дослідження дозволяють стверджувати, що забезпечується вивільнення антисептичного препарату зі складу гідрогелю зі збереженням його вихідних параметрів (ступеня поглинання за водою та ексудатом та механічних властивостей).

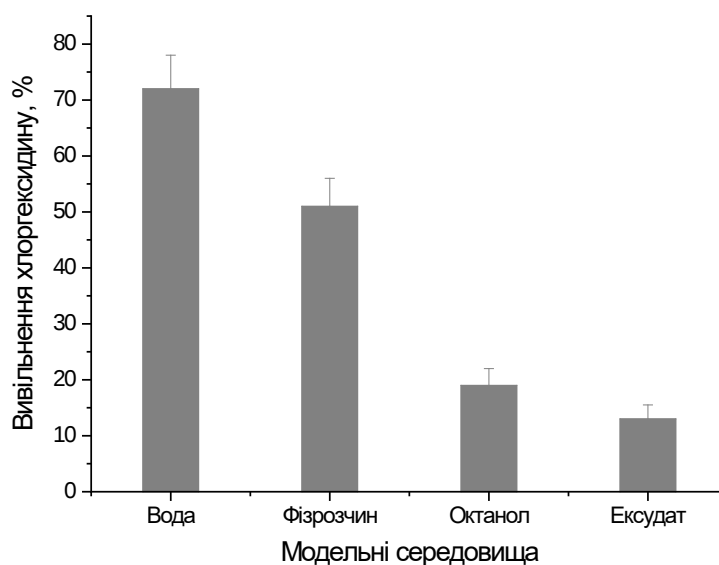


Рис. 4.12. Вивільнення хлоргексидину біглюконату в різні середовища на 5 годину дослідження при 37 °C

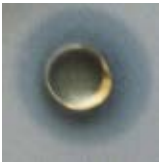
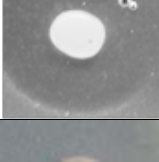
Для перевірки бактерицидних властивостей отриманих гідрогелевих зразків проводили дослідження для яких використовували зразки гідрогелю діаметром 5 мм, товщиною 2 мм вирізаного з желатинових гідрогелів, до складу яких була введена різна кількість бактерицидного препарату (0,0; 0,1; 0,25 і 1 % ХГ в гідрогелі). Зразки поміщали в середовище заражене *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* ATCC 23923 (*S. Aureus*) та вимірювали радіус гальмування росту мікроорганізмів.

За результатами досліджень показано, що хлоргексидин, який знаходиться в зразках желатинових гідрогелів вивільняється і ефективно гальмує ріст бактерій *E. coli* and *S. aureus* (таблиця 4.8). Залежно від вмісту антисептика і виду

бактерій радіус пригнічення росту коливається від 10 до 12.5 мм для *S. aureus* і від 15 до 17.5 мм для *E. coli*.

Таблиця 4.8

Залежність зони інгібування бактерій від вмісту антисептика, введеного в желатиновий гідрогель

Номер зразка відповідно до Таблиці 2.1	Тип бактерії	Фото зразка (на 4-й день дослідження)	Концентрація хлоргексидину в гідрогелі, %.	Радіус зони інгібування, мм
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23923		0.1	10.0 ± 0.5
2			0.25	11.2 ± 0.4
3			1.0	12.5 ± 0.5
4			0.0	0.0 ± 0.0
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		0.1	15.0 ± 0.6
2			0.25	15.5 ± 0.6
3			1.0	17.5 ± 0.5
4			0.0	0.0 ± 0.0

Крім того, зі збільшенням вмісту хлоргексидину в желатиновому гідрогелі збільшується тривалість бактерицидної дії зразка, тобто забезпечується пролонговане вивільнення хлоргексидину з матриці гідрогелю. Максимальна

зона пригнічення росту мікробів для всіх доз антисептика спостерігається на 2-3-тю добу. Для зразка з вмістом діючої речовини 1 % ефективне пригнічення росту триває 7 діб.

Підсумки до розділу 4

Встановлено умови утворення гідрогелевих матеріалів з використанням желатину та діоксиранового похідного поліетиленгліколю ПЕГ400. Визначено оптимальне співвідношення біополімеру (желатину) та структуроутворювача для забезпечення набрякання у воді та відповідних фізіологічних середовищах (фізіологічному розчині та модельному ексудаті). Тести на цитотоксичність *in vitro* показали, що отримані гідрогелі не мають негативного впливу на метаболізм і життєздатність живих клітин. Встановлено закономірності вивільнення хлоргексидину з матриці гідрогелю в різні середовища та підтверджено антибактеріальні властивості отриманих гідрогелів на культурах бактерій *S. aureus* та *E. coli*.

Отже, розроблено спосіб формування гідрогелю желатину з використанням як структуроутворювача водорозчинного дигліцидилового естеру поліетиленгліколю PEGDE500. Метод має декілька суттєвих переваг над існуючими:

- Утворення гідрогелів відбувається в одну стадію без додаткових активаторів та регуляторів pH;
- Нема потреби у стадії очищення для видалення непрореагованого структуруючого агента;
- Контроль за ступенем набрякання, механічними характеристиками, морфологією, досягається варіюванням вмістом структуроутворювача у початковій реакційній суміші.

Таким чином, наведені дані свідчать про перспективність отриманого матеріалу як основи спеціалізованої гідрогелевої пов'язки для лікування хронічних та інфікованих ран.

РОЗДІЛ 5

СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЖЕЛАТИН-АЛЬГІНАТНИХ ГІДРОГЕЛІВ

Структура гідрогелів може формуватися за рахунок декількох факторів утворення його просторової сітки [231, 232]. Зокрема, відомо що комплекси желатину з іонними полісахаридами утворюються переважно шляхом міжмолекулярних електростатичних взаємодій та водневих зв'язків [233, 234]. Обґрунтовано, що можна розраховувати на те, що за рахунок іонних взаємодій комплементарних функціональних груп фрагменти макромолекул желатину можуть бути додатково зв'язані з макромолекулами альгінату натрію. Утворення та стійкість таких поліелектролітних комплексів залежать від різних факторів, включаючи ступінь іонізації поліелектролітів, розподіл заряду по полімерних ланцюгах, характеру та положення іонних груп, гнучкості полімерного ланцюга, молекулярної маси та співвідношення поліелектролітів, а також температури, іонної сили та рН реакційного середовища [235]. При певному співвідношенні біополімерів, їх концентрації, рН та іонній силі середовища ці комплекси здатні самостійно утворювати стабільні гідрогелі [236, 237, 238].

5.1. Характеристики умов синтезу желатин-альгінатних гідрогелів.

Запропоновано збільшити кількість зшивок завдяки проведенню структурування суміші біополімерів (желатину і альгінату натрію), які уже утворили поліелектролітні комплекси (ПЕК) за допомогою структуруючого на основі поліетиленгліколю 400 (PEGDE 500). Його здатність до структурування макромолекул желатину з утворенням гідрогелів показана у розділі 4. Для втілення такої схеми створення міжмолекулярних зв'язків у суміші важливо було провести визначення оптимального діапазону співвідношень біополімерів при якому утворюється водорозчинний ПЕК, який можна розглядати як полімер вищої молекулярної маси, і структурування якого може привести до отримання гідрогелів з покращеними властивостями. Якісним і кількісним індикатором отримання аддукту, в цьому випадку, може бути зміна в'язкості розчину суміші

біополімерів. Утворення оптимальної кількості міжмолекулярних зав'язків при яких макромолекули утвореного ПЕК будуть знаходитися в розчині в максимально можливо розгорнутому стані залежить конкретно від співвідношення двох полімерів. З даних наведених на рис.5.1, які ілюструють результати реологічних досліджень 1 % водних розчинів суміші полімерів за різних їх співвідношень видно, що в діапазоні співвідношень желатину і альгінату натрію як 8:1 – 12:1 (желатин:альгінат, відповідно) спостерігається суттєве зростання в'язкості. Аналіз цієї ділянки показав, що максимум в'язкості, яка зростає практично в 10-12 разів відповідає співвідношенню желатину до альгінату натрію як 10 : 1. Встановлене співвідношення було використане в подальших синтезах гідрогелів, які були спрямовані на визначення впливу ковалентного структурування цього полімерного комплексу за використання диіпоксидного структуруючого PEGDE 500.

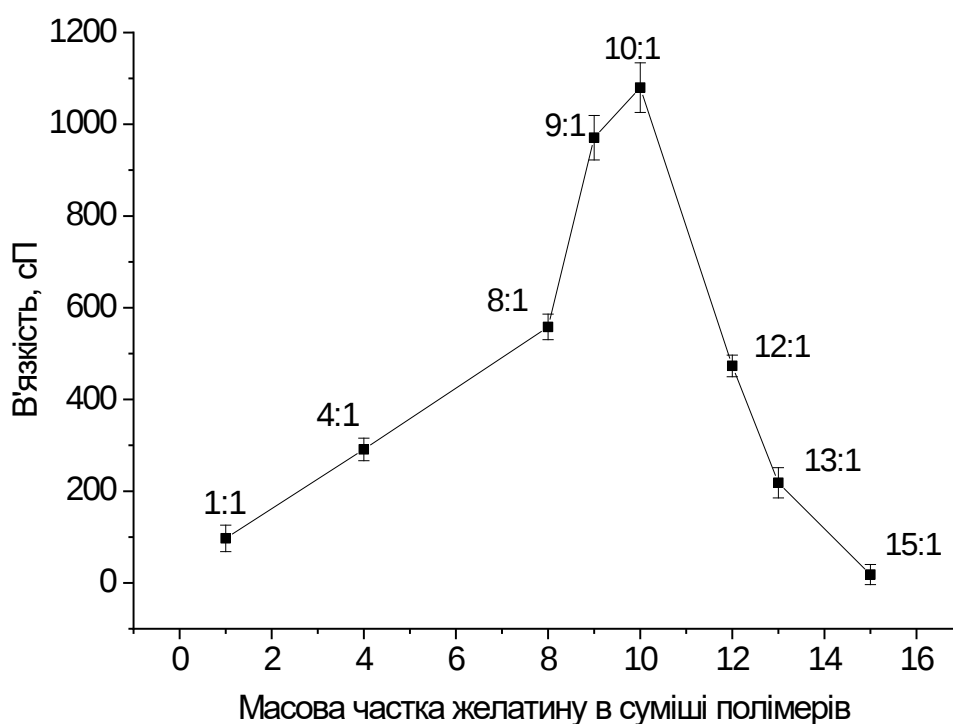


Рис.5.1. Залежність в'язкості 1 % водних розчинів суміші полімерів від їх співвідношення

Важливим чинником, який неможливо не враховувати є загальний вміст полімерів у композиції для синтезу гідрогелів, оскільки він безпосередньо впливає на їх властивості. У попередньому розділі, який присвячений

желатиновим гідрогелем отриманим з використанням PEGDE 500 була визначена оптимальна загальна концентрація полімеру, яка складала 18 %. При отримувались зразки незадовільної якості, а при вищих не досягалося суттєвих переваг у властивостях. У випадку комбінованих гідрогелів желатину і альгінату при загальній концентрації полімерів понад 18 % при спробах приготування гідрогелю відбувається стрімке збільшення в'язкості розчину і гелеутворення, що не дозволяє позбутися бульбашок повітря і досягнути однорідності змішування. Проведені дослідження показали, що нижня границя по концентрації полімерів при якій відбувалося гелеутворення з отриманням формостійкого гідрогелю складає 12 %. Уже цей факт вигідно відрізняє нові гідрогелі від раніше нами досліджених гідрогелів желатину, для яких гелеутворення відбувалось при загальному вмісті полімеру не менше як 18 %.

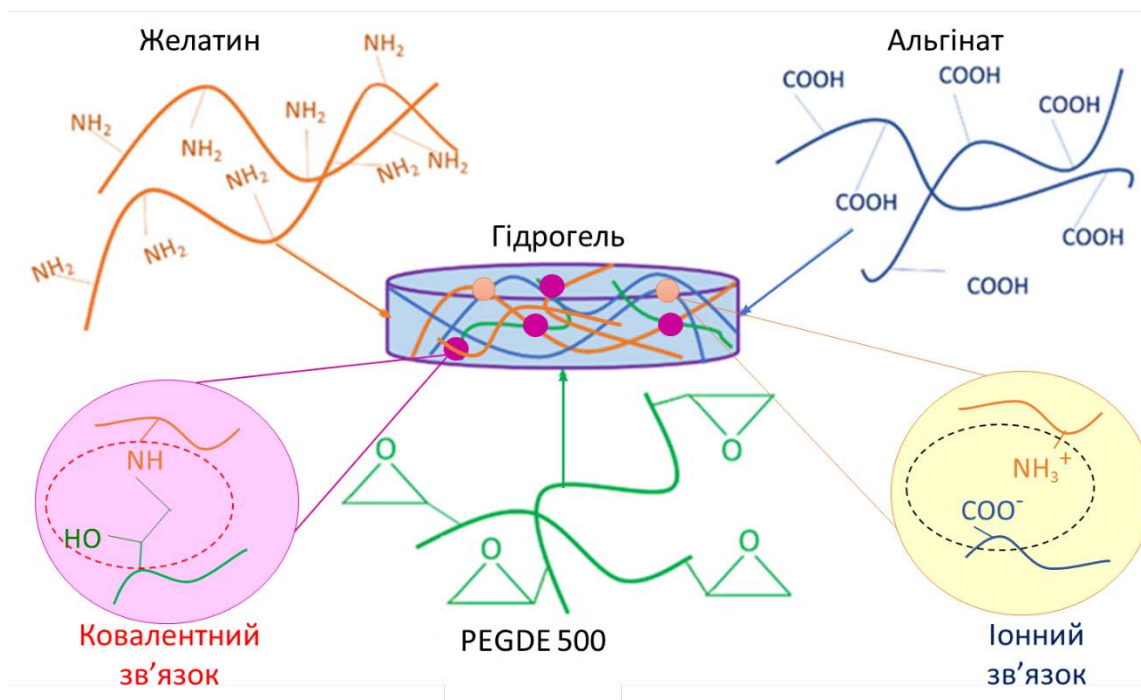


Рис.5.2. Схема синтезу желатин-альгінатного гідрогелю структурованого діепоксидом поліоксиденгліколю PEGDE 500

Схематично утворення желатин-альгінатного гідрогелю показано на рис.5.2., завантаження вихідних речовин наведені в таблиці 5.1. Зразки гідрогелів синтезували при рН реакційної суміші в межах $5,5 \div 6,0$, яке встановлювалось самовільно без додавання будь-яких регуляторів. За цих умов гідроксильні та

карбоксильні групи, як зі складу желатину так і альгілату натрію найбільш імовірно в реакцію з епоксидними групами не вступають, і структурування відбувається в основному через взаємодію структуруючого агенту з аміногрупою лізину у складі макромолекул желатину.

Таблиця 5.1.

Склад композиції та співвідношення реагентів під час синтезу желатин-альгінатних гідрогелів

Номер зразка	Масове співвідношення		Вміст PEGDE 500, %	Вміст желатину, %	Вміст альгілату натрію, %	Вміст води, %
	PEGDE 500	Желатин-альгінатна основа				
1	1	1	8.571	8.571	0.857	82
2	1	2	5.625	11.250	1.125	
3	1	3	4.186	12.558	1.256	
4	1	5	2.769	13.846	1.385	
5	1	8	2.00	14.694	1.470	
6	1	10	1.500	15.000	1.500	
7	1	15	1.029	15.429	1.543	
8	1	25	0.632	15.789	1.579	
9	1	50	0.321	16.071	1.607	
10*	0	1	0.00	16.364	1.636	
11*	1	1	5.714	5.714	0.571	88
12	1	2	3.750	7.500	0.750	
13	1	3	2.791	8.372	0.837	
14	1	5	1.846	9.231	0.923	
15	1	8	1.224	9.796	0.980	
16	1	10	1.000	10.000	1.000	
17	1	15	0.686	10.286	1.023	
18	1	25	0.421	10.526	1.053	

Значення гел-фракції для гідрогелів отриманих за різного вмісту структуруючого агенту вказує на те, що за визначених умов синтезу та співвідношень у межах від 1:2÷1:15 реалізується максимальна кількість актів поперечних зшивок з утворенням зразків гідрогелю формостійкого при нагріванні до 50 °С, що на відміну від неструктурованої суміші желатин-альгінат На у воді набрякає, але не розчиняється, про що свідчать високі (понад 75 %) значення гел-фракції (рис. 5.3).

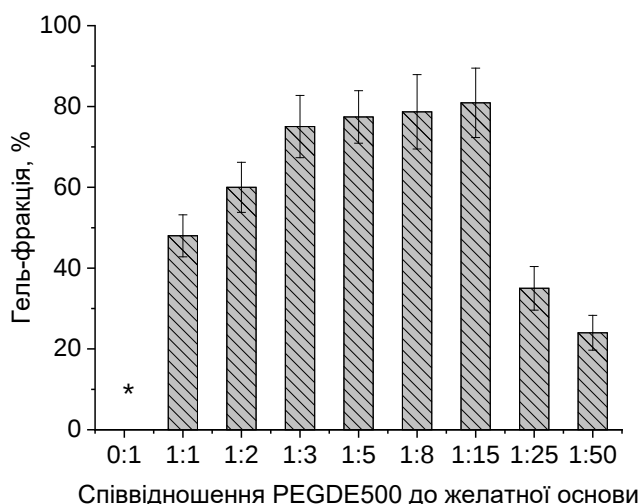


Рис.5.3. Гель-фракція зразків гідрогелю отриманого при різному співвідношенні структуруючого агенту PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи.

Опираючись на описані вище дані для подальших досліджень були обрані умови синтезу, що забезпечували максимальне залучення реагентів у створенні тривимірної полімерної сітки гідрогелю.

5.2. ІЧ -дослідження желатин-альгінатного гідрогелю

На рис.5.4. наведено ІЧ-спектри в діапазоні $4000-500\text{ см}^{-1}$ висушених зразків желатину, альгінату натрію, структуруючого PEGDE 500 та полімеру гелі-фракції гідрогелю. Піки поглинання при 1650 і 1540 см^{-1} в інфрачервоному спектрі чистого желатину відповідають коливанням розтягування C-O і C-N (смуга амідів I) та коливанням вигину групи -NH (смуга амідів II), відповідно. Характерні смуги поглинання при 1616 і 1419 см^{-1} , представлені в ІЧ-спектрі альгінату натрію, відповідають пікам асиметричного і симетричного розтягування -COO- відповідно. Крім того, смуги або піки при 1300 (розтягнення C-O), 1086 (маннуринові одиниці), 1033 (гулуринові одиниці) і 817 см^{-1} (α -конфігурація гулуринових одиниць) також відносяться до структури сахариду.

В ІЧ-спектрі структурованого полімерного каркасу позбавленого від неприщеплених фрагментів (відмитого) гідрогелю спостерігалось значне послаблення характеристичних піків альгінату натрію при 1616 см^{-1}

(асиметричні коливання COO^-) та 1419 см^{-1} (симетричні коливання COO^-) [239]. Ці піки частково накладалися на спектральні смуги чистого желатину, зокрема на область амідних груп (1650 см^{-1} - амід I, C=O ; 1540 см^{-1} - амід II, NH) [240] .

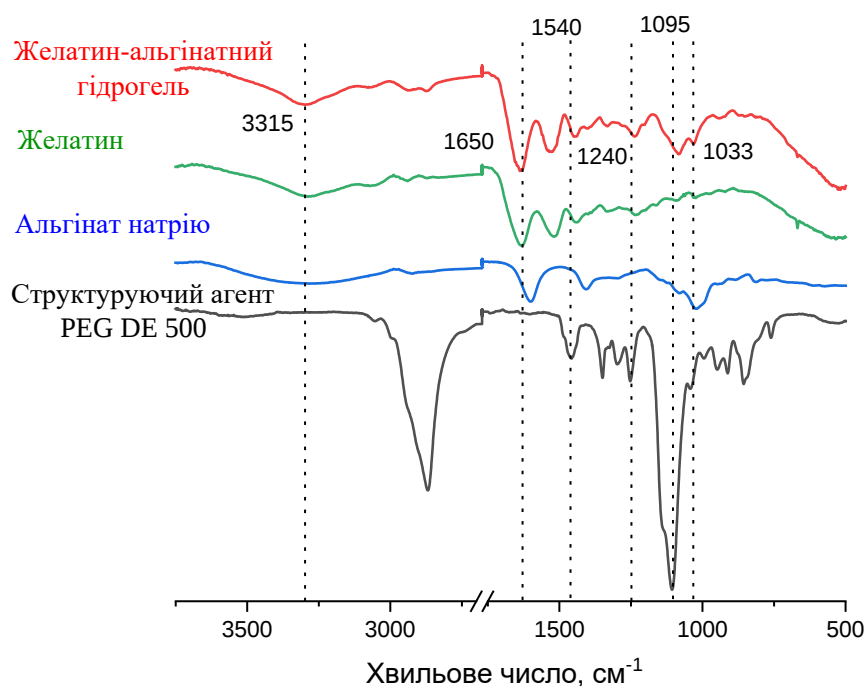


Рис.5.4. FTIR спектри структуруючого агента PEGDE 500, альгінату, желатину та гелі-фракції продукту реакції, виділеної після структурування желатин-альгінату.

Виявлений зсув характеристичних піків ($\sim 10\text{-}15\text{ см}^{-1}$) та зміна їх інтенсивності свідчать про зміну електронної густини в цих функціональних групах, що є прямим доказом утворення міжмолекулярних водневих зв'язків між карбоксильними групами альгінату та амідними/гідроксильними групами желатину [241].

Смуга поглинання при 1095 см^{-1} відноситься до коливань груп C-O-C , що містяться в PEGDE500 (у спектрі желатину та альгінату натрію вона відсутня) та смуга поглинання гулуранових залишків при 1033 см^{-1} в спектрі альгінату натрію (у желатину та структуруючого вона відсутня) у спектрі присутні. Розтягнення N-H у поєднанні з водневим зв'язком при 3315 см^{-1} (амід A), смуги, які характерні для валентних коливань карбонілу (C=O) амідної групи желатину 1650 см^{-1} (Амід I) і деформаційні коливання групи -N-H при 1540 см^{-1} (Амід II) залишилися

присутніми у спектрі, тільки дещо змінилися співвідношення функційних груп у порівнянні з вихідним желатином, який вступив в реакцію. У спектрі одержаного гідрогелю відсутні асиметричні розтяжні коливання C–O оксиранового кільця при 1240 см^{-1} , що пов'язано з його розкриттям і є свідченням хімічної модифікації оксиранових груп унаслідок їхньої реакції з аміногрупами желатину та зміни їхнього хімічного оточення у структурованій матриці гідрогелю. Це може бути підтвердженням ефективності ковалентного зшивання компонентів. В даному випадку можна вважати, що тривимірна структура гідрогелю складається з макромолекул желатину структурованих диепоксидним зшивачем і, в той же час, пов'язана з макромолекулами альгінату за рахунок водневих та іонних взаємодій.

Нижче наведені таблиці 5.2; 5.3; 5.4 з положеннями смуг поглинання та ідентифікацією піків в інфрачервоних спектрах желатину, альгінату натрію та структуруючого агенту, відповідно.

Таблиця 5.2.

Розташування та призначення піків ідентифікованих у ІЧ-спектрі желатину

Положення смуги поглинання, см^{-1}	Призначення діапазону
3315 (амід А)	розтягнення N-H у поєднанні з водневим зв'язком
2964 (амід В)	асиметричне розтягнення C-H
1650 (амід І)	розтягнення C=O у поєднанні з COO-
1540 (амід ІІ)	розтягнення N-H у поєднанні з розтягненням CN
1237 (амід ІІІ)	розтягнення N-H у поєднанні з розтягненням CN

Таблиця 5.3.

Розташування та призначення піків ідентифікованих у ІЧ-спектрі альгінату натрію

Положення смуги поглинання, см^{-1}	Призначення діапазону
3447 (амід А)	Коливання розтягування O-H груп
1616	асиметричні відрізки COO- груп
1419	симетричні відрізки COO- груп
1300	Вібрація розтягування CO- груп
1086	Маннуронові одиниці

1033	Гулуранові одиниці
817	α -конфігурація гулуранових одиниць

Таблиця 5.4.

Розташування та призначення піків ідентифікованих у ІЧ-спектрі
структуруючого PEGDE500

Положення смуги поглинання, cm^{-1}	Призначення діапазону
2566	смуга поглинання C-H
1240	асиметричні розтяжні коливання C-O оксиранового кільця
1095	смуга поглинання відноситься до коливань груп C-O-C
916 та 839	піки поглинання епоксиду

5.3. Механічні властивості желатин-альгінатних гідрогелів

Дослідження механічних властивостей проводили методом заміру зусилля, що виникає у циліндричних зразках гідрогелів діаметром 10 мм при одноосьовому навантаженні на стиск. Оскільки найменші значення були отримані для гідрогелю желатину, який руйнувався уже при 4.5 мм деформації то для всіх гідрогелів іншого складу показники приводяться при деформації 4.5 мм.

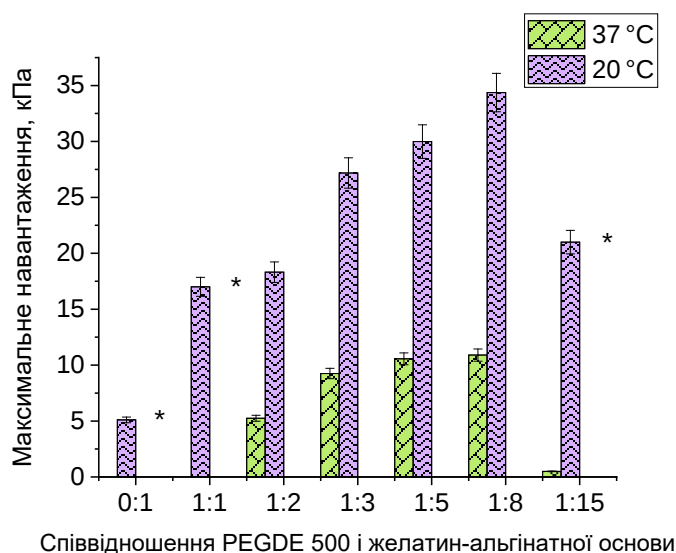


Рис.5.5. Зусилля, яке передає гідрогель при одноосьовому навантаженні на стиск при деформації 4.5 мм. (Для гідрогелів отриманих при 20° С *- гідрогелі руйнуються при стиску, а решта зразків не руйнуються).

Аналіз зусилля, що розвивається при одноосьовому навантаженні на стиск зразків гідрогелів (рис.5.5) демонструє максимум 34 кПа, що досягається при співвідношенні 1 до 8, тобто, у складі гідрогелю, який загалом містить 12 % полімеру гелеутворювача, у який включено 16.66 % структуруючого агенту (1.2 % в гідрогелі). При цьому співвідношенні реалізується максимальна кількість ефективних вузлів полімерної сітки, яка утворює каркас гідрогелю. Ці дані дуже добре корелюються з значеннями гель-фракції, яка також є максимальною за такого складу гідрогелю (рис.5.3, співвідношення 1:8). Варто зауважити, що зразки також мають різну еластичність в залежності від вмісту PEGDE 500. Якщо при співвідношеннях від 1:2 до 1:8 руйнування зразків не відбувається навіть при максимальній їх деформації (як при 20 °C, так і при 37 °C), то при співвідношенні структуруючого агенту до желатин-альгінатної основи 1:15 (за температури 20 °C) зусилля майже однакове з неструктурованим желатином. Тобто, як і неструктурований желатин, ці зразки гідрогелю при досягненні певного (дещо вищого ніж для желатину) ступеня деформації руйнуються. Таким чином, оптимальна область концентрації у гідрогелі структуруючого агенту визначається співвідношенням між ним і полімерним комплексом желатин-альгінат натрію. За отриманими результатами можна вважати, що в діапазоні концентрацій структуруючого агенту (від 1.09 до 3.0 % в гідрогелі) PEGDE 500 у суміші полімерів, які утворюють тривимірну сітку, утворюються гідрогелі з покращеними механічними характеристиками.

5.4. Дослідження реологічних характеристик отриманих гідрогелів

Механічну поведінку гідрогелів, отриманих з желатин-альгінатної суміші структурованої PEGDE 500 оцінювали за допомогою модулів зберігання G' і втрат G'' як кількісного вираження в'язкопружних властивостей матеріалу. Спочатку для визначення лінійної в'язкопружної області (LVR) кожного зразка гідрогелю проводили амплітудну розгортку при фіксованій частоті $\omega = 10 \text{ рад} \times \text{с}^{-1}$. З наведених залежностей видно, що лінійна область обидвох динамічних модулів (G' , G'') практично для всіх зразків (окрім зразка, який не містив PEGDE

500) і при температурах 20 °C і 37 °C спостерігається практично до 7 % деформації (рис. 5.6 а, б).

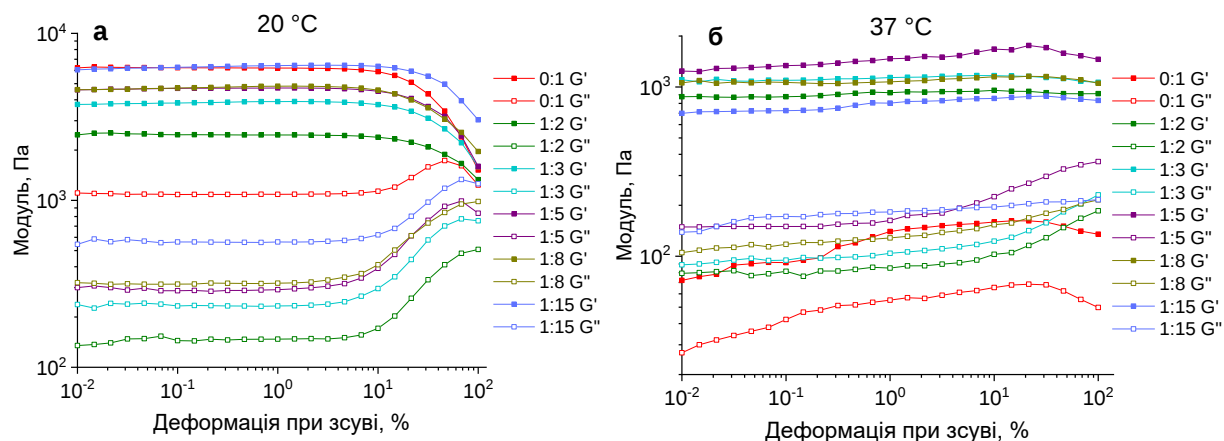


Рис.5.6. Деформація (амплітудна розгортка) желатин-альгінатних гідрогелів, структурованих різними кількостями PEGDE 500 при температурі 20 °C (а) та 37 °C (б).

Розгортка по частоті була виконана шляхом зміни кутової частоти від 1 до 150 рад×с-1 при деформації 1 %, яка відповідає попередньо визначеному LVR для всіх зразків та різних температур (рис. 5.6).

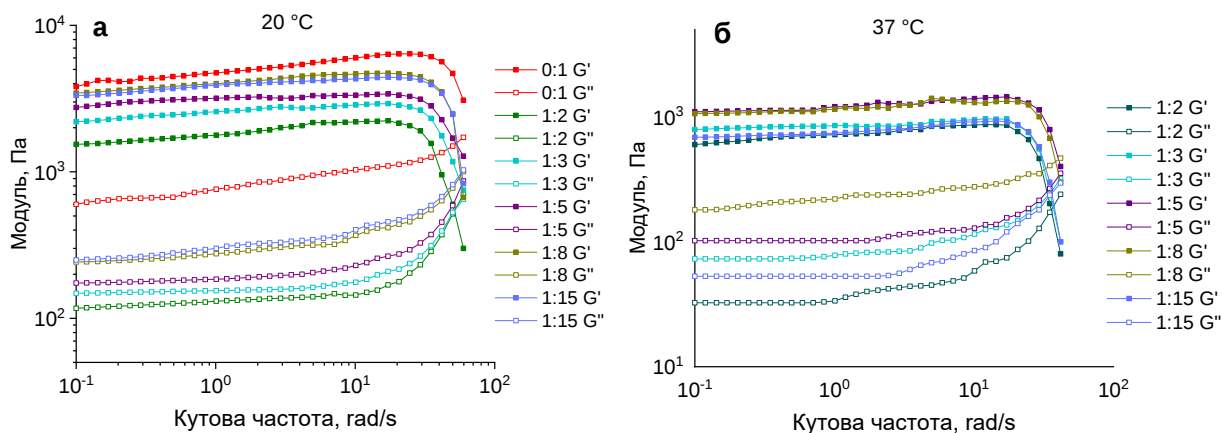


Рис.5.7. Частотна розгортка для желатин-альгінатних гідрогелів, структурованих різними кількостями PEGDE 500 при температурі 20 °C (а) і 37 °C (б).

Дослідження залежності динамічних модулів від радіальної частоти демонструє типову картину добре розвиненої еластичної полімерної сітки, яка характеризується модулем зберігання G' , який значно перевищує значення модуля втрат G'' (рис. 5.7).

Незалежність вказаних величин (G' , G'') від кутової частоти (ω) в межах 0,1–10 рад/с, як при 20 °С так і при 37 °С вказує на існування добре структурованої полімерної сітки, яка утворює гідрогель. При тому, зміна кількості структуруючого агента проявляє неочевидну залежність при різних температурах. При 20 °С модуль зберігання має максимальні значення у межах 3000 Па при співвідношеннях структуруючого до желатин-альгінатної основи від 1:5 до 1:15, причому, коли кількість структуруючого в композиції більша 4 % (при співвідношеннях 1:1; 1:2; 1:3), він зменшується до 1500-2000 Па (рис. 5.7(а)). При 37 °С залежність модуля зберігання G' має виражений екстремальний характер з максимумом, який змістився до співвідношення 1:5, а максимум модуля втрат G'' спостерігається при співвідношенні 1:8 (рис. 5.7(б)).

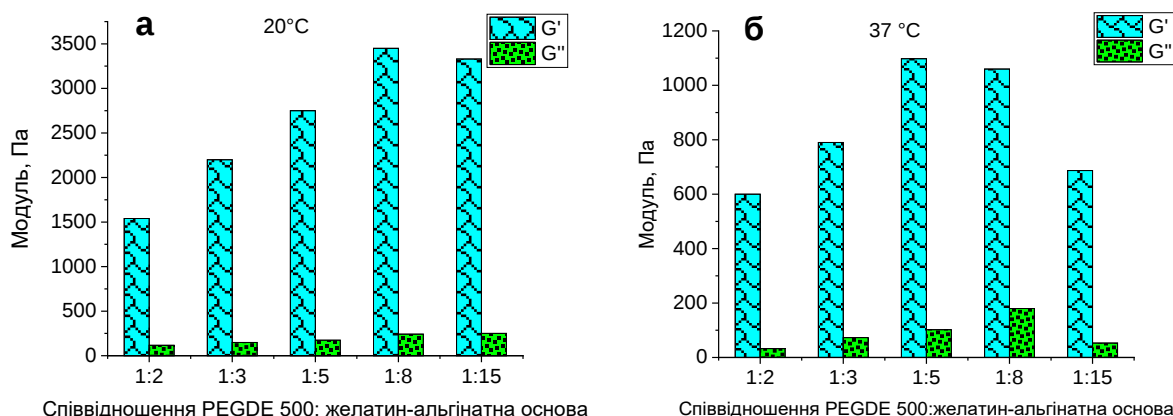


Рис.5.8. В'язко-пружні характеристики желатин-альгінатних гідрогелів структурованих різною кількістю PEGDE 500 при температурі 20°С (а) і 37°С (б).

Багатокомпонентні композити, що містять желатин як основний складник зазвичай мають термооборотні властивості, які проявляються в суттєвому зниженні їх механічних характеристик з ростом температури. В загальному при переході від 20 °С до 37 °С відбувається зниження модуля зберігання, який характеризує пружні властивості матеріалу від 2,6 (співвідношення 1:2) до 4,8 (співвідношення 1:15) разів. На рис. 5.8 наведена залежність динамічних модулів гідрогелів від вмісту структуруючого агента. З наведених даних видно, що при 20 °С модуль зберігання зростає із зменшенням вмісту структуруючого, демонструючи максимальні значення при співвідношеннях 1:15 і 1:8. При

температурі 37 °С при збереженні загальної закономірності у цій залежності проявляється зона оптимальності, яка зміщена в область вищої концентрації PEGDE 500. В цьому випадку оптимальними стають співвідношення 1:5 і 1:8, при яких спостерігається максимум модуля збереження.

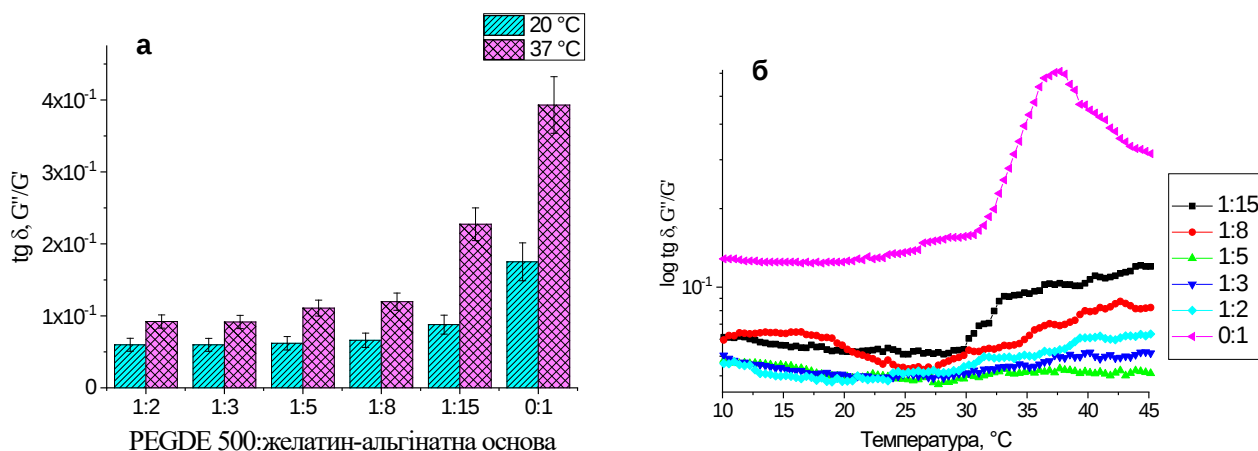


Рис.5.9. Загублений тангенс (коефіцієнт механічних втрат $\tan \delta = G''/G'$) гідрогелів при різних співвідношеннях структуруючого агента PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи при 20 °С та 37 °С (а). Залежність коефіцієнта механічних втрат гідрогелів при різних співвідношеннях структуруючого агента PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи від температури (б).

Коефіцієнт механічних втрат розрахований при деформації 1 % (рис.5.9(а)) при 20 °С є сталим в межах співвідношень 1:2 ÷ 1:8, а при співвідношенні 1:15 уже проявляє тенденцію до зростання. При цьому співвідношенні, а це 6,25 % вмісту PEGDE 500 у перерахунку на безводну суміш полімерів гелеутворювачів коефіцієнт механічних втрат має значення в два рази менші від неструктурованого гідрогелю желатин-альгінату за тієї ж загальної концентрації полімерів (12 %). При 37 °С незначне зростання $\tan \delta$ спостерігається уже від співвідношення 1:5, а при 1:15 його значення уже збільшуються майже в 2,5 рази, що свідчить уже про доволі значний вплив збільшення вмісту желатину і характерного для цього біополімеру зменшення пружних властивостей з підвищенням температури. Розгортка по температурі дозволяє стверджувати, що до 30 °С коефіцієнт механічних втрат матеріалу отриманого за всіх співвідношень є близьким, але суттєво меншим за неструктурований желатин-альгінатний гідрогель (рис.5.9 (б)). При температурі 37,5 °С спостерігається чітко виражений максимум, який індикує перехід неструктурованого матеріалу

з в'язкопружного у в'язкотекучий стан. Натомість, у зразках структурованого желатин-альгінатного гідрогелю цього уже не відбувається – навіть за найменшого вмісту агенту структурування. Разом з тим прослідковується зменшення величини коефіцієнта механічних втрат із збільшенням вмісту PEGDE 500 при співвідношеннях 1:15 - 1:8. При вищих вмістах PEGDE 500 (співвідношення 1:2 ÷ 1:5) гідрогель зберігає пружні властивості у всьому діапазоні температур – коефіцієнт механічних втрат майже не залежить ні від співвідношення, ні від температури.

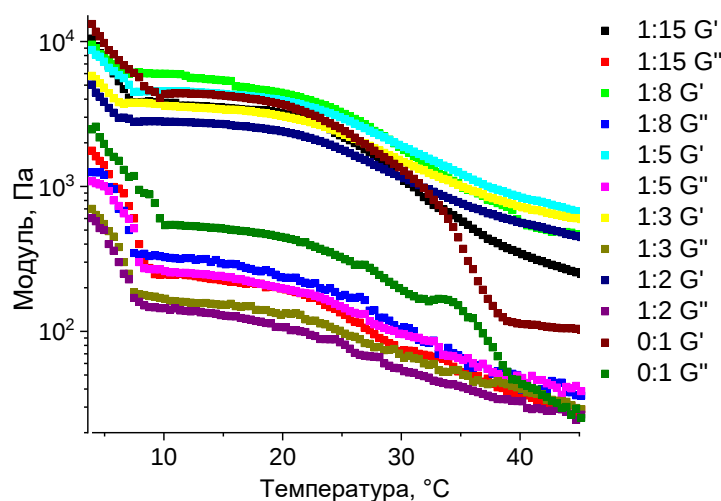


Рис.5.10. Динамічний механічний аналіз для желатин-альгінатних гідрогелів при різних співвідношеннях структуроутворювача PEGDE 500 до желатин-альгінатної суміші.

Для зразків гідрогелів як і для неструктурованої желатин-альгінатної основи спостерігається зменшення обидвох динамічних модулів (G' , G'') із зростанням температури, як це характерно для гідрогелю неструктурованого желатину. При вищій температурі кількість ділянок зв'язувань, що відповідають за утворення гелю 2 роду, яким є желатин, зменшується, що призводить до механічно слабшого гелю (модулі пружності зменшуються). Зразок гідрогелю у якому немає структуруючого агента суттєво змінює свої властивості з ростом температури - при нагріванні до 37 °C це вже в'язка рідина (рис.5.10). Для хімічно структурованих зразків це зменшення не таке стрімке і навіть при температурі 45 °C вони все ще зберігають властивості твердого тіла (не рідини

для якої модулі співпадають за значеннями). При мінімальному співвідношенні 1:15, спостерігається вже сильна залежність від температури, проте суттєво відмінна від зразка гідрогелю неструктурованого. При всіх інших співвідношеннях залежності близькі і підтверджують раніше отримані результати – в межах досліджуваного діапазону температур всі зразки структурованих гідрогелів зберігають властивості пружних тіл. В цілому механічні властивості гідрогелю отриманого за розробленою схемою є цілком достатніми для використання як ранових покриттів [242, 243].

Для кількісної оцінки міцності міжмолекулярних зв'язків у матриці було використано значення модуля збереження (G') на плато (0,1–1 rad/s), отримані з аналізу частотних залежностей при 25 °C. На підставі пружної модульної функції (G_e) розраховано два структурних параметри:

- середній розмір сітки (ξ) - характеризує просторову організацію полімерної мережі;
- густину зшивання (n_e) - відображає кількість ефективних поперечних зв'язків.

Отримані значення наведено в таблиці 5.5. Такі підходи широко застосовуються для характеристики полімерних гідрогелів [244], що дозволяє порівнювати структуру різних систем.

Як і у випадку з желатиновими гідрогелями, значення G_e для желатин-альгінатних гідрогелів не демонструють значної варіації між зразками, проте є відмінність для співвідношення структуруючий агент до основи 1 до 8, у випадку зразків з альгінатом значення G_e продовжують рости (9100 ± 218 Па, зразок 5, таблиця 5.5), а у зразках без альгінату зменшуються (6290 ± 156 Па, зразок 5, таблиця 4.3). Що може бути наслідком того, що тривимірна структура желатин-альгінатного гідрогелю складається з макромолекул желатину структурованих диєпоксидним зшивачем і, в той же час, пов'язана з макромолекулами альгінату за рахунок водневих та іонних взаємодій. Це додаткове структурування може

забезпечувати більшу динамічну в'язкість і, відповідно, значення модуля накопичення при співвідношеннях більших за 1 до 5.

Таблиця 5.5

Середнє та стандартне відхилення модуля накопичення на плато (G_e), середній розмір комірок (ξ /нм) та густини зшивання (ρ_e , моль·м⁻³) для одержаних зразків желатин-альгінатних гідрогелів

№ п/п	Співвідношення PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи	G_e , Па	ξ , нм	ρ_e , моль·м ⁻³
1	1:1	2675 ± 220	11,48 ± 0,54	1,10 ± 0,09
2	1:2	4150 ± 242	9,92 ± 0,60	1,70 ± 0,10
3	1:3	4700 ± 165	9,51 ± 0,26	1,93 ± 0,07
4	1:5	7170 ± 197	8,26 ± 0,47	2,94 ± 0,08
5	1:8	9100 ± 218	7,63 ± 0,54	3,73 ± 0,09
6	0:1	5160 ± 140	9,22 ± 0,35	2,12 ± 0,06

Найнижчі значення G' спостерігалися у зразку 1 (2675 ± 220 Па при співвідношенні PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи 1:1), хоча при цьому співвідношенні забезпечувалось утворення структури гідрогелю, який не втрачав форми при нагріванні до температури застосування $T = 37 - 40$ °C, проте, такі значення можуть вказувати на надлишок структуруючого агенту у зразку. Цей баланс досягався у зразках 3, 4, 5 (при співвідношеннях PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи 1:3, 1:5, 1:8, відповідно), що сприяло утворенню більшої кількості зв'язків між полімерними компонентами. У даному випадку зразок 5 таблиця 5.5, зберігав свою формостійкість при нагріванні і не розтікався, як було для зразка 5 таблиця 4.3 з таким же співвідношенням (1:8), але без додавання альгінату натрію.

Середній розмір сітки (ξ) у зразках желатин-альгінатних гідрогелів варіював від 7,63 ± 0,54 нм (1:8) до 11,48 ± 0,54 нм (1:1). Слід зазначити, що ці значення корелюють із розміром пор, хоча це приблизні значення, отримані на основі теорії пружності гуми (RET). Загалом, розмір сітки зменшувався з досягненням оптимальної кількості структуруючого (1:5 – 1:8) в гідрогелі.

5.5. Дослідження гідрогелів на основі желатину та альгінату методом диференційної сканувальної калориметрії.

Температурні переходи зразків желатин-альгінатних гідрогелів з різним ступенем структурування поліетиленгліколь диепоксидом (PEGDE 500) були досліджені методом диференційної сканувальної калориметрії. Методика дослідження описана у розділі 2 (п.2.3.5). На рисунку. 5.11 наведено термограми зразків гідрогелів, структурованих при масових співвідношеннях PEGDE:желатин-альгінатна основа від 1:2 до 1:15, отриманих при нагріванні гідрогелів в діапазоні від 10 до 80 °С при швидкості сканування 1 °С/хв.

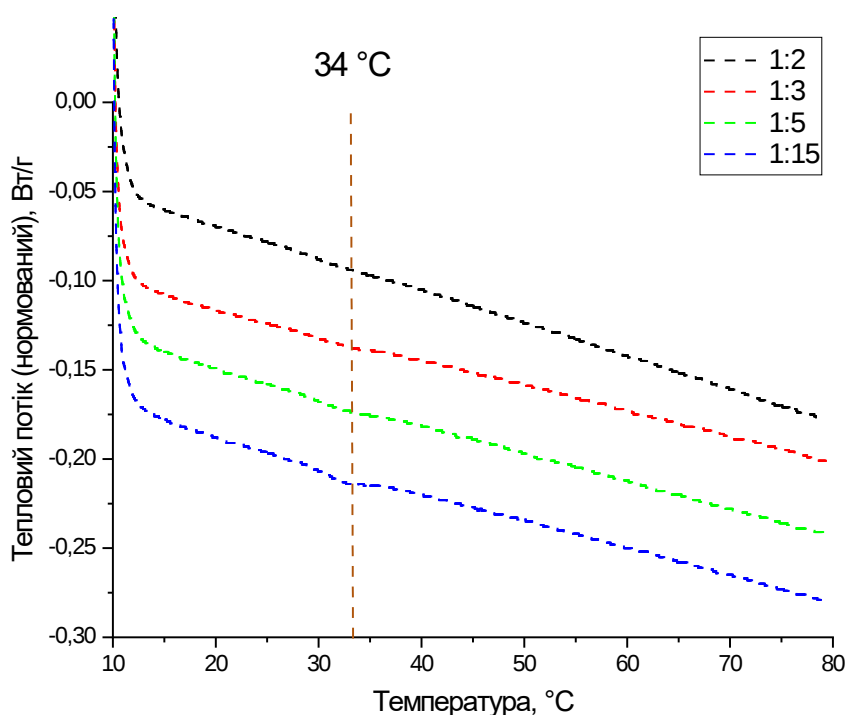


Рис. 5.11. DSC-термограми зразків желатин-альгінатних гідрогелів при різних співвідношеннях PEGDE 500:желатин-альгінатна суміш (1:2, 1:3, 1:5, 1:15).

Температури плавлення ($T_{пл}$) та ентальпії плавлення (ΔH), отримані для желатин-альгінатних гідрогелів, перехресно структурованих за різних концентрацій PEGDE 500 (від 1 до 6 % в гідрогелі), досліджених на зразках гідратованих (не висушених) гідрогелів, наведені в таблиці 5.6.

Слабкий ендотермічний пік, спостерігається у желатин-альгінатних гідрогелях 2GA – 4GA при температурі приблизно 33 °С, виявлявся у вигляді

широкого ендотермічного сигналу. За даними ДСК-аналізу, температура плавлення цих желатин-альгінатних зразків дещо вища, ніж у желатинових гідрогелів та неструктурованого желатину, що вказує на підвищену термічну стабільність систем із альгінатом.

Таблиця 5.6

Температури плавлення ($T_{пл}$) та ентальпії плавлення (ΔH) обчислені з кривих DSC-аналізу (рис.5.11) для зразків желатинових гідрогелів та неструктурованого желатину

Зразок	PEGDE 500: желатин	Вміст PEGDE 500 в зразку, %	$T_{пл}, ^\circ C$	$\Delta H, Дж/г$
1 GA*	1:2	6	—	—
2 GA	1:3	4,5	$33,62 \pm 0,64$	$2,58 \pm 0,04$
3 GA	1:5	3	$34,15 \pm 0,77$	$3,11 \pm 0,04$
4 GA	1:15	1	$32,27 \pm 0,82$	$3,71 \pm 0,07$

* - не зафіксовані або не достатні сигнали при DSC-вимірюваннях зразка гідрогелю 1GA для їх аналізу

Ентальпія плавлення, як і у випадку з чистими желатиновими системами (див. розділ 4), знижувалася із збільшенням ступеня модифікації структуруючим агентом та додаванням альгінату натрію [245]. Наприклад, для зразка 1GA ендотермічний ефект був настільки слабким, що його не вдалося достовірно зафіксувати.

Важливо відзначити, що термічний профіль характерний для желатину практично зникає з термограм желатин-альгінатних гідрогелів. Це дозволяє припустити, що молекули желатину утворюють комплексну сітчасту структуру з альгінатом натрію [246], втрачаючи індивідуальні термічні властивості. Саме ця взаємодія обумовлює відмінності у термічній поведінці порівняно зі звичайними желатиновими гідрогелями.

5.6. Дослідження морфології отриманих гідрогелів

Розуміння розміру пор є важливим для оцінки транспортних властивостей гідрогелів та кінетики вивільнення ліків у застосуваннях для загоєння ран [247]. Для візуалізації структури гідрогелю застосовували метод СЕМ мікроскопії. Для

порівняння досліджували контрольовано набряклі у воді гідрогелі. Відносні відмінності між зразками (отриманими за однаковою методикою при постійному значенні збільшення мікрофотографії) цілком добре візуалізуються (рис.5.12). Розмір пор желатин-альгінатних гідрогелів у набряклому стані коливається від 2 до 8 мікрометрів для усіх зразків, окрім одержаного при співвідношенні структуруючого до желатин-альгінатної основи 1 до 1.

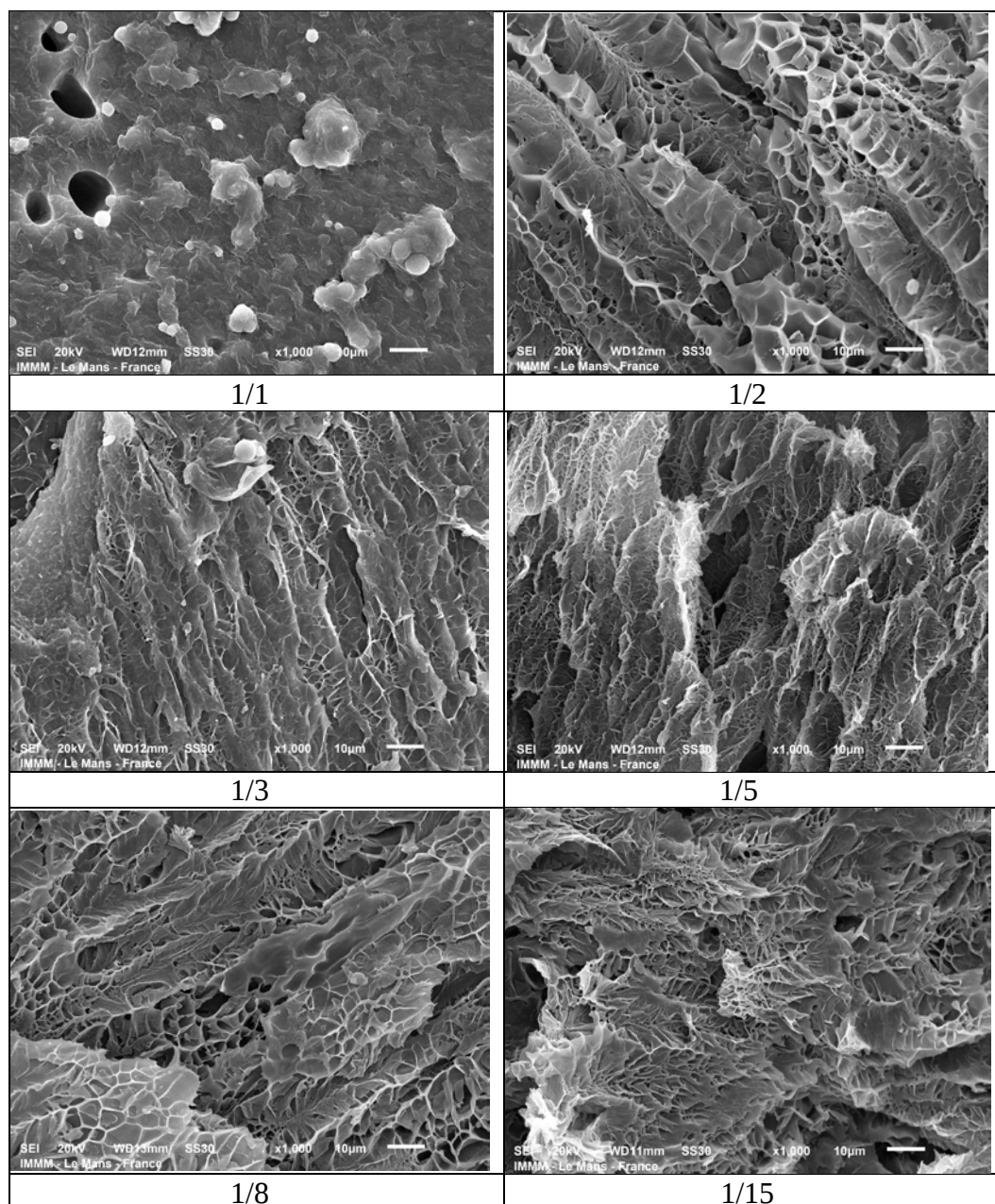


Рис.5.12. СЕМ фотографії зразків набряклих у воді желатин-альгінатних гідрогелів (ступінь набрякання 2).

Спостерігається складна просторово-орієнтована морфологія отриманих гідрогелів. При співвідношенні 1:1 пластинчато-шарувата структура. При інших

співвідношеннях проявляється мікрокоміркова морфологія. В якій доволі добре спостерігається потоншення структури при зменшенні кількості структуруючого агента до співвідношення 1:5. При вищих співвідношеннях особливу різницю помітити складно. І це цілком закономірно оскільки за обраною схемою синтезів гідрогелю при зміні співвідношень понад 1:5 значної зміни концентрації структуруючого агенту в системі не відбувається (табл. 5.1).

5.7. Набрякання желатин-альгінатних гідрогелів в модельних середовищах

В таблиці 5.7 наведено значення ступеня набрякання отриманих гідрогелів в залежності від вмісту структуруючого агента та температури в середовищах, які часто зустрічаються в літературі для охарактеризування і прогнозування поведінки гідрогелю в якості пов'язки на ранах різних типів. Загальна залежність, яку можна помітити це збільшення ступеню набрякання зі збільшенням температури і зі зменшенням кількості структуруючого агенту.

Практично для всіх середовищ зразки гідрогелю синтезованого з максимальною кількістю структуруючого агенту в межах похибки набрякають однаково при 20 °C і при 37 °C. Зменшення його кількості приводить до зміни параметра набрякання, але ці зміни неоднакові для середовищ різної природи.

Таблиця 5.7

Значення набрякання (грам рідини/на грам полімеру) на 24 год дослідження, грам досліджуваної рідини на грам полімеру гелеутворювача

Зразок (табл. 5.1)	Вода, г/г		Фізрозчин, г/г		PBS, г/г		Рідина Рінгера, г/г		Ексудат, г/г	
	20 °C	37 °C	20 °C	37 °C	20 °C	37 °C	20 °C	37 °C	20 °C	37 °C*
1 (1:1)	12.8±1.4	14.0±1.7	13.1±1.8	16.0±1.6	12.2±2.1	14.9±0.9	12.6±1.3	15.8±1.5	9.8±1.2	10.3±1.3
2 (1:2)	12.5±1.1	16.7±1.5	12.6±1.9	14.4±1.4	11.8±1.5	14.7±0.8	11.4±0.9	14.8±1.2	9.4±0.7	9.5±0.9
3(1:3)	11.2±1.2	17.1±1.4	11.7±1.6	14.8±0.9	11.5±0.8	14.6±1.2	11.3±0.8	14.9±1.3	9.3±0.8	10.7±1.1
4(1:5)	9.7±0.8	19.1±2.2	11.2±0.8	15.3±1.3	11.0±1.0	16.4±1.4	10.5±1.2	15.0±1.6	8.6±0.5	10.4±0.7
5(1:8)	8.7±0.8	26.8±2.0	10.9±0.7	15.6±0.8	10.1±0.6	15.3±1.3	10.1±1.1	14.3±1.2	8.4±0.6	11.2±0.8
0:1	13.6±1.6	-	15.0±2.2	-	14.4±1.2	-	14.8±1.5	-	10.2±1.1	-

* при 37 °C спостерігалось незначне розчинення зразків в ексудаті на 24 год вимірювань, тому приведені дані на 12 год

Найбільш цікавою є залежності ступеня набрякання у дистильованій воді і ексудаті - при температурі 20 °С і 37 °С. Якщо при 20 °С ступінь набрякання у воді зменшується симбатно до зменшення вмісту структуруючого агенту і це добре корелює із збільшенням гель-фракції зразків гідрогелю то при температурі 37 °С ступінь набрякання навпаки збільшується у тому ж ряді.

Пояснення цьому можна шукати у посиленні впливу властивостей желатину, вміст якого максимальний в зразку 5 (табл. 5.7), який як відомо утворює термооборотні фізичні гелі, які руйнуються при збільшенні температури. В цьому випадку колагеноподібні кластери у складі желатину частково втрачають міжмолекулярні зв'язки, що і приводить до збільшення ступеню набрякання. Зміна іонної сили розчину при дослідженнях у фізрозчині приводить до того, що спостерігаються дуже незначні відмінності у ступеню набрякання зразків гідрогелю, як зі зміною вмісту структуруючого агенту, так і з температурою, при тому, що в загальному ступінь набрякання вищий ніж у воді. Аналогічна ситуація спостерігається і в фосфатному буфері та розчині Рінгера. В цих середовищах практично нема залежності від складу гідрогелю. Найменший ступінь набрякання спостерігається в модельному ексудаті. Це можна пояснити з точки зору присутності в складі ексудату значної кількості іонів кальцію, які здатні до іонних взаємодій з функційними групами як желатину так і ще в більшій мірі альгілату натрію, що приводить до додаткового йонного структурування, що і відображається в зменшенні ступеню набрякання. Цей ефект загалом нівелює вплив температури і в цьому випадку на відміну від набрякання у воді спостерігається практично однакова ступінь набрякання при 20 °С і при 37 °С. Загалом можна констатувати, що не дивлячись на певні особливості, ступінь набрякання синтезованих гідрогелів у всіх досліджуваних середовищах (60-90 г в перерахунку на 1 дм² гідрогелевого матеріалу товщиною 4 мм) є задовільним для того, щоб поглинати раневі виділення виконуючи функції пов'язки [202, 248].

Кінетичні закономірності набрякання желатин-альгінатних гідрогелів

Для желатин-альгінатних гідрогелів аналогічно желатиновим (розділ 4) проведено підбір математичної моделі для опису процесу набрякання у воді. Як і у попередньому випадку, встановлено основні параметри моделі Корсмейєра–Пеппаса – константу швидкості (k) та показник механізму набрякання (n). Закономірності набрякання желатин-альгінатного гідрогелю досліджували за допомогою аналізу графіків залежності ступеня набрякання від часу (рис. 5.12. А-В) та апроксимації експериментальних даних за двома моделями: першого порядку (експоненційною) та другого порядку (моделлю Шота).

Отримані експериментальні дані для вивчення набрякання гідрогелів з різним вмістом структуруючого та желатину були оброблені відповідно до вище зазначених математичних моделей. Для кожної моделі визначали нахил (константу швидкості) та коефіцієнт регресії R^2 (таблиця 5.8.), які використовувалися для прогнозування кінетики та механізму набрякання гідрогелевого матеріалу.

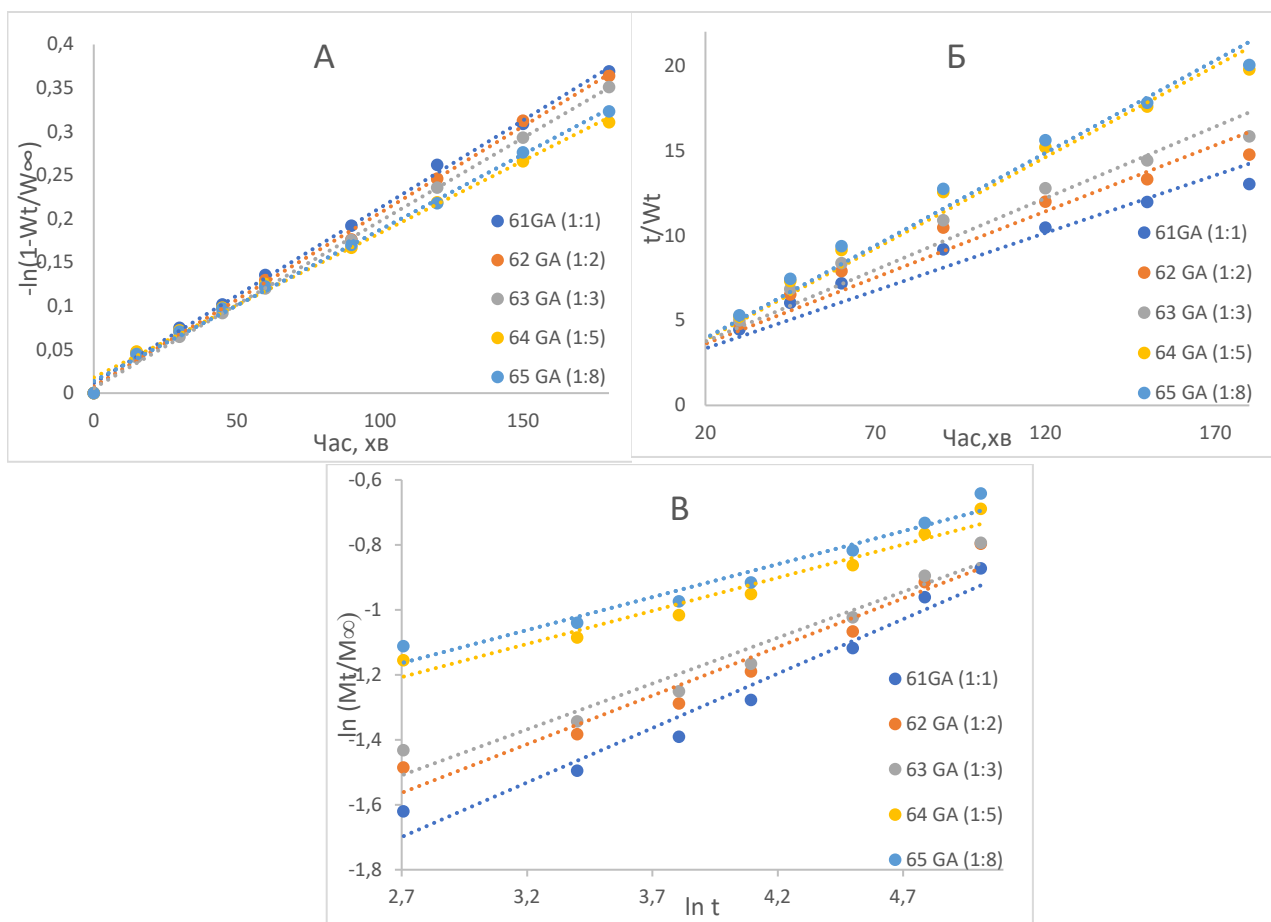


Рис. 5.13. Графіки кінетики набрякання желатин-альгінатних гідрогелів: модель першого порядку (А), модель другого порядку (Б), емпірична модель Пеппаса–Кросмейєра (В)

Таблиця 5.8

Параметри для прогнозування кінетики та механізму набрякання желатин-альгінатних гідрогелів, отримані з математичних моделей

Кінетична модель	Параметр	Зразок гідрогелю (табл. 5.1)				
		1 (1:1)	2 (1:2)	3 (1:3)	4 (1:5)	5 (1:8)
1 ^{го} порядку	k	0,002	0,002	0,0019	0,0017	0,0017
	R^2	0,9977	0,9977	0,9992	0,9943	0,9967
2 ^{го} порядку	k	0,068	0,0779	0,0843	0,1045	0,1091
	R^2	0,9394	0,9443	0,9516	0,9777	0,9761
Кросмейєра-Пеппаса	k	0,0025	0,0043	0,0053	0,0175	0,0194
	n	0,3353	0,2993	0,2824	0,204	0,203
	R^2	0,9622	0,9471	0,9479	0,954	0,95

Отримали кореляцію $R^2 > 0,99$ для моделі першого порядку, отже процес набрякання желатин-альгінатних гідрогелів у воді, аналогічно желатиновим, керується дифузією і, також, наближається до стану рівноваги експотенційно. Показник n , який визначає механізм дифузії (визначений з моделі Кросмейєра-Пеппаса) менший 0,5, що характерно для класичної дифузії Фіка і зменшується від 0,3353 до 0,203 із збільшенням ступеня структурування гідрогелів. Коефіцієнт k (визначений з моделі Кросмейєра-Пеппаса), що визначає константу швидкості набрякання, зростає від 0,0025 до 0,0194 для більш структурованих гідрогелів, що вказує на швидше досягнення рівноважного стану. Це може означати, що, незважаючи на повільніше набрякання на початкових стадіях, система загалом наближається до рівноваги швидше.

5.8. Деградація желатин-альгінатних гідрогелів під впливом ензиму

Протеолітичні ферменти (протеази) як відомо присутні у різного типу ранах на різних стадіях загоєння. Їх функція полягає в розщепленні некротичних тканин і очищенні рани, що є одним з важливих етапів у процесі її загоєння [249, 250]. Відомо також, що присутність екзогенних протеїнів у рані може виступати

промотуючим фактором при загоєнні. І разом з тим це є одним з впливових факторів, у процесах вивільнення терапевтичних препаратів з засобів доставки.

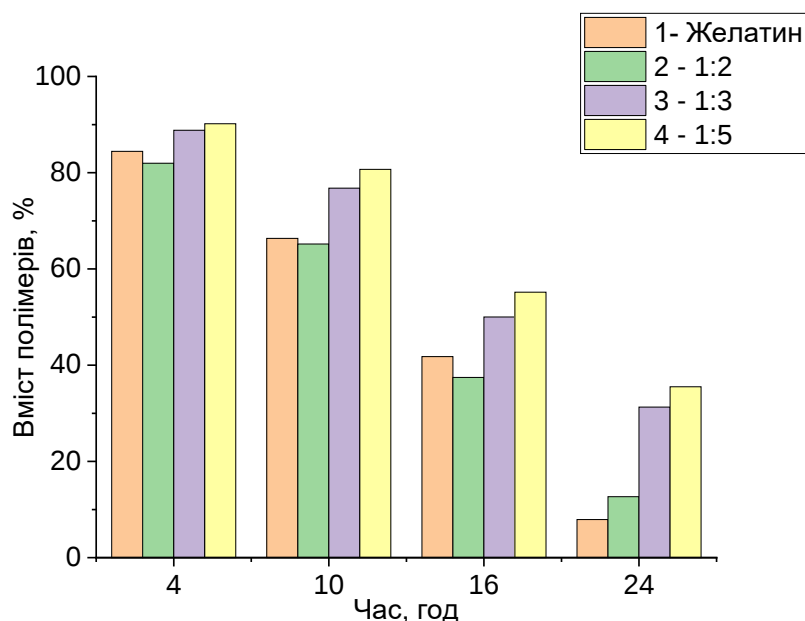


Рис.5.14. Ферментативна деградація гідрогелів при 20 °С: 1 – не структурований желатин; 2, 3, 4 – желатин-альгінатні гідрогелі із співвідношенням 1:2, 1:3, 1:5 структуруючого PEGDE 500 до желатин-альгінатної основи, відповідно.

Вивчення деградації полімерної матриці гідрогелю при дії ферментів необхідне для оцінки та прогнозування його поведінки *in vivo* та в окремих клінічних випадках [251]. Ферментативну деградацію синтезованих гідрогелів вивчали *in vitro* в модельних умовах використовуючи фермент протеазу (2.5 мг/мл у PBS) визначаючи через визначені проміжки часу залишковий відсоток полімерів у гідрогелі (рис. 5.14). Наведені дані свідчать про те, що різні умови структурування при використанні PEGDE 500 неоднозначно впливають на біодеградацію. Закономірно, що неструктурований желатин під дією протеолітичного ферменту деградує найшвидше. Проте приблизно з такою ж швидкістю деградує і зразок, що містить найбільшу кількість структуруючого агенту (рис. 5.14, зразки 1,2), а зразки отримані при менших співвідношеннях за той же проміжок часу деградували значно менше (рис. 5.14; зразки 3,4). Можна припустити, що це є наслідком того що при великій кількості PEGDE 500 його потенціал як структуруючого агенту в цій системі не реалізується повністю. Очевидно значна його частка взаємодіє з аміногрупами у складі желатину тільки

за однією епоксигрупою утворюючи гребенеподібні макромолекули у яких боковими замісниками виступають ланцюги PEG. Це зменшує ступінь структурування, що закономірно проявляється у менших значеннях гель-фракції і прискореній деградації при дії ферменту, який працює по фрагментах желатинових макромолекул значно швидше руйнуючи тривимірну мережу гідрогелю.

Можливість у певних межах регулювати швидкість деградації гідрогелю, ймовірно, буде корисною для розробки гідрогелевої пов'язки з контрольованою деградацією. Гідрогелі, які деградують повільніше, також можуть бути ефективно використані для опосередкованого деградацією тривалого і повільного вивільнення лікарських засобів з матриці впродовж тривалого періоду часу [252]. Крім того вивільнення фрагментів білкових макромолекул желатину в рану як відомо здатне бути фактором, що ініціює процеси її очищення, що сприятиме відновленню і регенерації тканин, та скорішому загоюванню [253].

5.9. Дослідження вивільнення медикаментів з желатин-альгінатних гідрогелів

Вивільнення препаратів з гідрогелів проводили згідно методики 2.2.7. описаної у розділі 2, використовуючи вертикальну комірку Франца та зразок гідрогелю 4 (умови отримання табл.5.1) насичений відповідним препаратом методом вичерпного набрякання. З наведених графіків видно різні закономірності вивільнення (рис.5.15). Для лідокаїну і новокаїну спостерігається традиційне для таких систем початкове швидке вивільнення препаратів [244]. За цей час вивільняється 25-30 % препаратів, а далі воно іде повільніше і досягає значень 35-50 % за наступні 24 години дослідження.

Присутність ферменту видимо прискорює вивільнення цих препаратів після першого швидкого періоду, що очевидно пов'язане з поступовою деструкцією гідрогелю. Закономірність вивільнення диклофенаку натрію демонструє за відсутності протеази практично ідеальну прямопропорційну залежність.

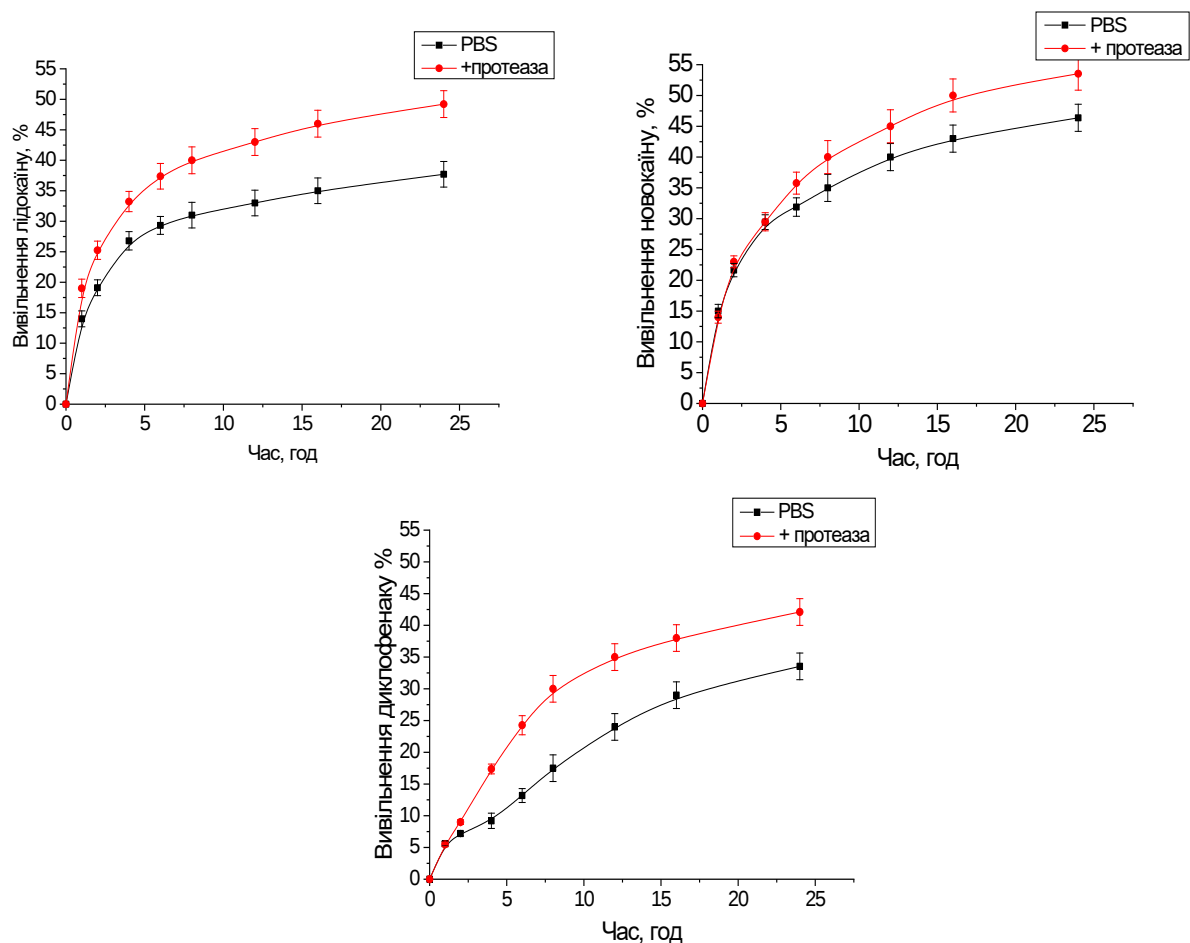


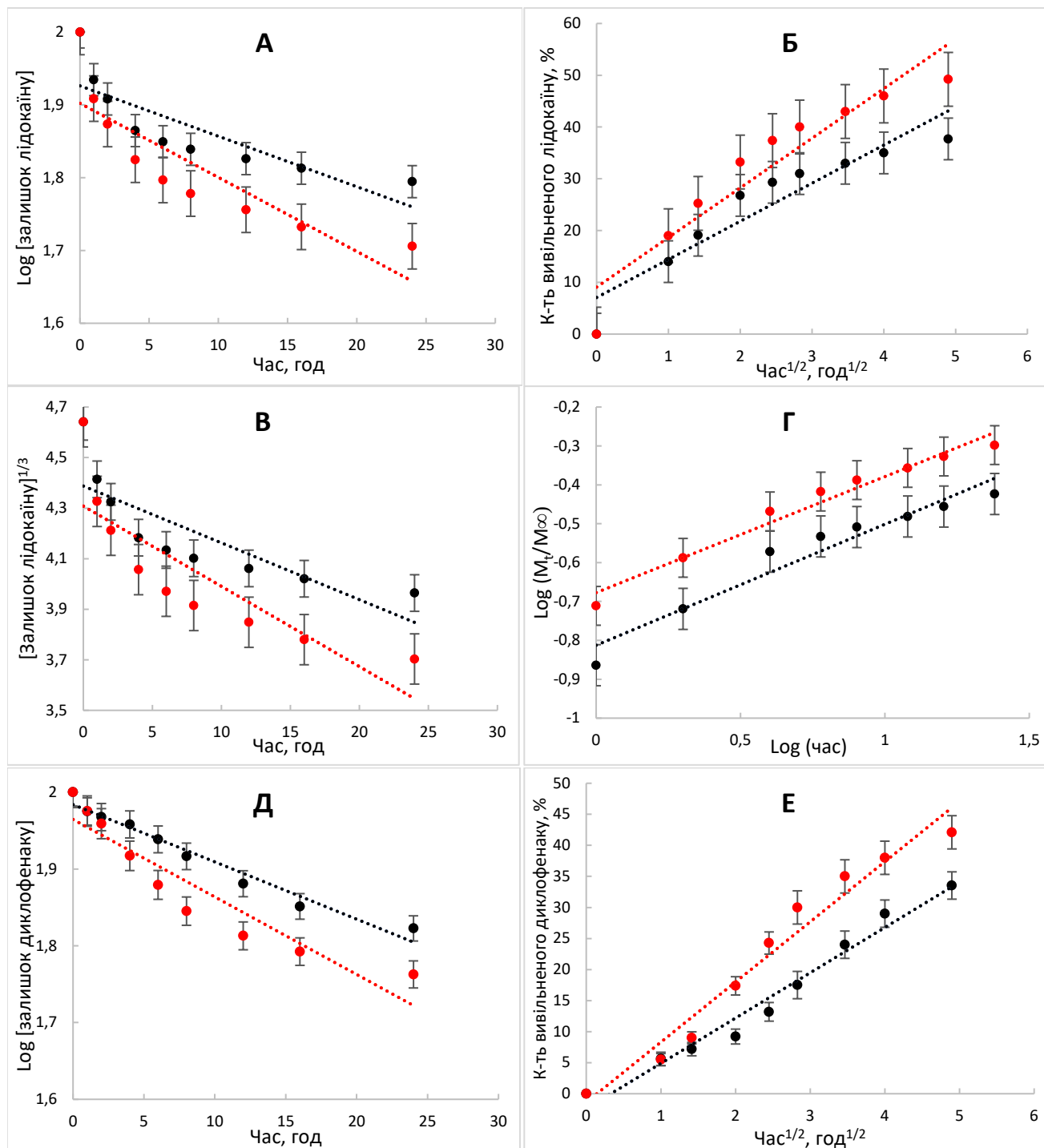
Рис.5.15. Вивільнення препаратів у фосфатно-сольовий буфер (PBS) та в 0,001 % розчин протеази у PBS при $T = 37^{\circ}\text{C}$.

Дія протеази, і в цьому випадку, прискорює вивільнення, дещо порушуючи «ідеальність» кривої вивільнення. Оскільки, дослід з вивільнення проводили у комірці Франца, тому доступ ферменту був тільки з однієї площини зразка і, відповідно, ефект від його дії, хоча і вагомий, проте не настільки очевидний як би можна було очікувати виходячи з даних попереднього розділу.

Дослідження закономірностей вивільнення препаратів з желатин-альгінатних гідрогелів

Як і в попередньому розділі, були застосовані різні математичні моделі для опису кінетики процесу вивільнення лікарських препаратів. Кінетику вивільнення лідокаїну, новокаїну, диклофенаку з желатин-альгінатного гідрогелю було визначено шляхом підбору найкращого співвідношення експериментальних даних (частка вивільненого препарату залежно від часу) до

різних моделей: кінетики нульового порядку, першого порядку, моделі Хігучі та Гіксона–Кровела. У той час як механізм вивільнення препарату може бути визначений за рівнянням Корсмейєра–Пепаса.



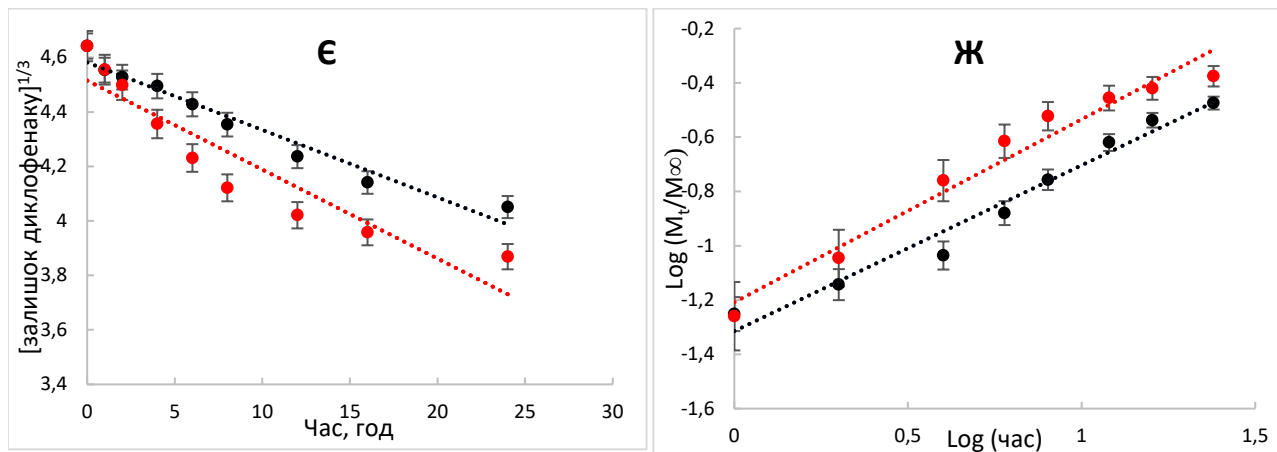


Рис. 5.16. Графіки вивільнення препаратів з гідрогелю. Лідокаїн гідрохлорид з желатин-альгінатного гідрогелю: кінетика першого порядку (А), кінетика Хігучі (Б), кінетика Хіксона-Кроуелла (В) та Корсмейєра-Пеппаса (Г). Диклофенак: кінетика першого порядку (Д), кінетика Хігучі (Е), кінетика Хіксона-Кроуелла (Є) та Корсмейєра-Пеппаса (Ж).

Отримані експериментальні дані для лідокаїну гідрохлориду (рис. 5.16 А-Г), новокаїну гідрохлориду, диклофенаку (рис. 5.16. Д-Ж) були оброблені відповідно до вище зазначених математичних моделей. Для кожної моделі визначали нахил (константу швидкості) та коефіцієнт регресії R^2 , які використовувалися для прогнозування кінетики та механізму вивільнення препарату. Значення констант швидкості вивільнення (k_0, k_1, k_H та k_{HC}) і показника вивільнення n у степеневому законі (модель Корсмейєра–Пеппаса) наведено в таблиці 5.10 разом із відповідними значеннями R^2 .

Таблиця 5.9

Параметри кінетики вивільнення препаратів з желатин-альгінатного гідрогелю в середовище фосфатно-сольового буферного розчину (PBS, pH = 7,4) і середовище PBS з додаванням ферменту протеази.

Модель вивільнення		Лідокаїн		Новокаїн		Диклофенак	
		PBS	PBS + фермент	PBS	PBS + фермент	PBS	PBS + фермент
Кінетика 0 ^{го} порядку	k_0 (h ⁻¹)	1,2717	1,5898	1,5854	1,9387	1,3934	1,7523
	R^2	0,6368	0,6566	0,7234	0,7684	0,9463	0,8409
Кінетика 1 ^{го} порядку	k_1 (h ⁻¹)	0,0161	0,0235	0,0226	0,0295	0,0173	0,0233
	R^2	0,6954	0,7441	0,8007	0,8525	0,9652	0,8842
Кінетика Хігучі	k_H (h ^{-1/2})	7,3607	9,5883	9,3101	11,176	7,2941	9,688
	R^2	0,8821	0,8965	0,9364	0,9585	0,9733	0,9648
Гіксона-Кровела	k_{HC} (h ⁻¹)	0,0225	0,0318	0,0309	0,0395	0,0248	0,0327
	R^2	0,676	0,7155	0,676	0,7155	0,9594	0,8703

Кросмейєра-Пепаса	K (h ⁻ⁿ)	0,210	0,154	0,0128	0,0126	0,0138	0,0177
	n	0,2984	0,3112	0,3548	0,4143	0,6109	0,674
	R ²	0,9397	0,969	0,9397	0,969	0,9712	0,9617

Враховуючи значення R², було встановлено, що процеси вивільнення препаратів найбільшою мірою відповідають моделі Хігучі порівняно з іншими. Значення показника вивільнення ($n < 0.5$) для лідокаїну гідрохлориду та новокаїну, отримані з моделі Корсмейєра–Пепаса, вказують що процес контролюється квазі-Фіковою дифузією. Для диклофенаку показник дифузії $n > 0.5$, що вказує на аномальний механізм вивільнення препарату.

5.10. Дослідження антимікробних властивостей зразків желатин-альгінатних гідрогелів завантажених бактерицидними препаратами.

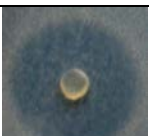
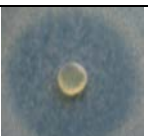
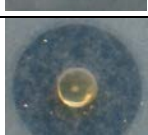
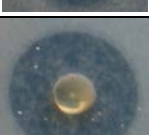
Для підтвердження ефективності дії хлоргексидину вивільненого із гідрогелю на патологічні мікроорганізми досліджували зразки при їх безпосередньому контакті із зараженим субстратом. Для цього використовували зразки гідрогелевих дисків діаметром 5 мм, товщиною 2 мм до складу яких була введена однакова кількість (2 % в гідрогелі) бактерицидного препарату – хлоргексидину. Зразки поміщали на середовище заражене *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* ATCC 23923 (*S. Aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Aspergillus niger* (*A. niger*) та вимірювали радіус гальмування росту мікроорганізмів. Вибір цих штамів в антимікробних дослідженнях обумовлений їх значущістю як приклад мікроорганізмів для різних категорій інфекцій: бактеріальних (грампозитивних і грамнегативних) та грибкових. Це дає змогу отримати всебічну оцінку ефективності антимікробних засобів. Ці штами дуже часто поширені у лікарнях, зокрема, *S. aureus* та *P. aeruginosa*, є причиною виникнення госпітальних інфекцій, що є серйозною проблемою охорони здоров'я.

За результатами досліджень показано, що хлоргексидин, який знаходиться в зразках структурованих желатин-альгінатних гідрогелів здатний вивільнятися

в заражений субстрат, що відображається у суттєвому гальмуванні росту бактерій *E. coli* and *S. aureus* (таблиця 5.11).

Таблиця 5.10

Види мікроорганізмів і площа інгібування росту за впливу хлоргексидину біглюконату зі зразків желатин-альгінатних гідрогелів, см²

Мікроорганізми	1 доба		2 доба		3 доба	
<i>Aspergillus niger</i>	3.45±0.15		1.64±0.11		1.38±0.12	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.65±0.36		9.20±0.54		9.28±0.48	
<i>Escherichia coli</i>	13.60±0.74		14.70±0.75		15.5±0.87	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.29±0.22		8.05±0.19		7.75±0.20	

В залежності від виду бактерій радіус гальмування росту коливається: для *E. coli* від 12.9 до 16.5 мм, для *S. aureus* від 7.3 до 9.8 мм, для *P. aeruginosa* від 7.5 до 8.5 мм, для *A. niger* від 1.2 до 3.6 мм.

Підсумки до розділу 5

Встановлено умови отримання та визначено оптимальне співвідношення біополімерів і структуруючого агента в гідрогелевій матриці для отримання матеріалів з високими значеннями фізико-механічних характеристик при збереженні здатності до набрякання у воді, фізіологічному розчині, фосфатному сольовому розчині, рідині Рінгера та ексудаті. Введення альгінату натрію до складу гідрогелів у порівнянні з желатиновим гідрогелем мало позитивний вплив на властивості матеріалу, зокрема дозволило зберегти їх фізико-механічні властивості при зменшенні концентрації преполімерів у вихідній композиції з 18 до 12 % та, водночас, підвищило стійкість до ферментативної деградації одержаних зразків.

Показано можливість насичення зразків рядом лікарських препаратів (лідокаїн, новокаїн, диклофенак натрію) і досліджено кінетику їх вивільнення. Результати проведених експериментів дозволяють стверджувати, що знеболювальні засоби вивільняються з матриці желатин-альгінатного гідрогелю, і може бути забезпечений анестетичний ефект для пацієнтів, які потребують безпечної дії.

Антибактеріальні властивості отриманих гідрогелів з введенням хлоргексидином підтверджено на культурах бактерій *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. Niger*, що може забезпечити пролонгований антисептичний ефект для попередження інфекційних уражень важкозагоєваних ран. Отриманий гідрогелевий матеріал, може стати основою для перев'язувальних засобів при догляді за хронічними та/або інфікованими ранами.

РОЗДІЛ 6

ОКРЕМІ НАПРЯМКИ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ КОМБІНОВАНИХ ГІДРОГЕЛЕВИХ СИСТЕМ

6.1. Одержання та дослідження властивостей поліакриламід- желатинових гідрогелів для застосування у ветеринарії

В попередніх розділах описано синтез та досліджено властивості желатинових та желатин-альгінатних гідрогелів. Однак існує невелика кількість повідомлень про застосування гідрогелів у ветеринарній практиці, хоча їх можна застосовувати для трансдермальної доставки ліків та як перев'язувальний матеріал при лікуванні тварин [254,255,256,257]. Звичні ранові пов'язки, такі як бинти та марлі ефективні тільки при незначних ексудативних ранах, але і вони вимагають частих змін під час застосування, що призводить до погіршення стану тварин внаслідок больових відчуттів під час перев'язок [258,259,260,261].

Останні досягнення при розробці нових видів перев'язувальних матеріалів значно поліпшили процес лікування гострих і хронічних ран за рахунок вирішення таких проблем, як контроль інфекції, баланс вологи та пришвидшення загоєння. Було досягнуто важливого прогресу, особливо щодо гідрогелів, піни та антимікробних матеріалів для створення оптимальних пов'язок [262,263].

Однак для застосування даних виробів, як лікувальних пов'язок у ветеринарії, однозначно потрібно збільшити їх механічні властивості. Механічна міцність, зокрема модуль зберігання (G'), гідрогелів знаходиться в діапазоні від 1 до 100 кПа, що, як правило, нижче порівняно з марлею або ватою (від 1 МПа до 1 ГПа) [264,265]. Однак цей діапазон механічної міцності для гідрогелів є більш придатним і сумісним зі шкірою людини.

В роботі для підняття механічних властивостей желатинових гідрогелевих матеріалів до їх складу вводили поліакриламід. Утворення ковалентних зв'язків сітки гідрогелів, згідно цього механізму, відбувається за участю NH_2 -груп поліакриламідів. Наявність аміногрупи в складі макромолекули желатину

дозволяла передбачити, можливість залучення макромолекул желатину до утворення сітки гідрогелю.

Важливими чинниками, що впливають на процес утворення гідрогелів за цим механізмом є значення рН середовища та температурний діапазон, тому подальші дослідження були спрямовані на визначення оптимальних умов отримання поліакриламід-желатинових гідрогелів.

Встановлено, що утворення гідрогелів на основі желатину, поліакриламід у при структуруванні полі-N-гідроксиметилоакриламід у відбувається при значеннях рН середовища в діапазоні від 2 до 4. Якщо рН середовища вище за 4 гідрогелі не утворюються, а при значеннях рН менших за 2 утворювались неоднорідні гідрогелі та не вдавалось отримати відтворювані результати. Це можливо пояснити тим, що одночасно з проходженням процесу структурування та утворення гідрогелів відбувається процес гідролізу функційних груп.

Температурний інтервал, при якому доцільно проводити синтез гідрогелів обумовлювався головним чином необхідністю дотриматися певного балансу між швидкістю утворення тривимірної структури гідрогелю та намаганням уникнути процесів гідролізу полімерів. Дослідження продемонстрували, що при отриманні гідрогелів з желатином за температур більших за 70°C як і за умови отримання їх при рН менших за 2 одержуються гідрогелі з дуже неоднорідною, шаруватою структурою а зменшення температури менше за 50°C призводить до значного збільшення часу синтезу. Тому подальші дослідження проводились при температурах 50÷70 °C і рН= 2.

Для одержання гідрогелів були використані поліакриламід з молекулярною масою 40 кДа та полі-N-гідроксиметилоакриламід з молекулярною масою 55 кДа. За таких значень водні розчини преполімерів підпорядковувались закономірностям течії ньютонівських рідин і це дозволяло в широких межах змінювати їх концентрацію уникаючи початкових розчинів високої в'язкості.

Гідрогелі на основі поліакриламід у та полі-N-гідроксиметилоакриламід у задовільними фізико-механічними властивостями можна отримати при їх

сумарній концентрації 7,5÷9,0 %. Однак, при введенні у гелеутворюючу композицію, як додаткового компоненту желатину суттєво порушувався баланс реакційноздатних груп, які приймають участь в процесі утворення тривимірної сітки гідрогелю. Отримання гідрогелю із аналогічними властивостями відбувалось лише за мінімальної сумарної концентрації гелеутворюючих преполімерів (желатину, поліакриламід та полі-N-гідроксиметилоакриламід) рівної 12 %. З іншого боку збільшення концентрації полімерів гелеутворювачів до 15% та вище суттєво погіршували сорбційні характеристики отриманих гідрогелів і не були вигідні з економічних міркувань. Тому для подальших досліджень був обраний діапазон концентрації преполімерів при синтезі в межах 12÷14%. У таблиці 6.1 наведені властивості отриманих гідрогелів у залежності від умов їх отримання.

Таблиця 6.1

Фізико-механічні властивості поліакриламід-желатинових гідрогелів в залежності від умов синтезу*

№.	Концентрація, %			Т, °С	Набрякання, Г _{води} /Г _{полім.}		Границя міцності, кПа
	СТ	ПАА	Желатин		2 год	10 діб	
1	7,0	7,0	0	60	8,94	32,21	9800
2	7,0	0	7,0	60	12,12	35,99	4000
3	7,0	4,9	2,1	60	9,83	23,05	14000
4	7,0	7,0	0	70	8,92	26,19	11300
5	7,0	0	7,0	70	10,54	28,24	10085
6	7,0	4,9	2,1	70	8,55	18,1	23500
7	7,0	7,0	0	50	11,8	35,14	3720
8	7,0	0	7,0	50	14,29	42,15	-
9	7,0	4,9	2,1	50	10,4	28,95	10302
10	7,0	2,1	4,9	70	9,6	22,15	12800

*- тривалість синтезу гідрогелів 12 годин, рН = 2.

Для встановлення оптимальних співвідношень поліакриламід÷полі-N-гідроксиметилоакриламід÷желатин були проведені дослідження залежності вмісту гель-фракції в зразках гідрогелів отриманих за різного вмісту желатину (рис. 6.1). Спостерігається добре виражена екстремальна залежність вмісту гель-фракції від концентрації желатину в складі гелеутворюючої композиції.

Максимальне залучення макромолекул форполімерів у процеси структурування при синтезі гідрогелів відбувається при вмісті желатину в гелеутворюючій композиції 2,1÷4,5 %, оскільки досягається найбільший вміст гель-фракції який є в межах 70-80 %.

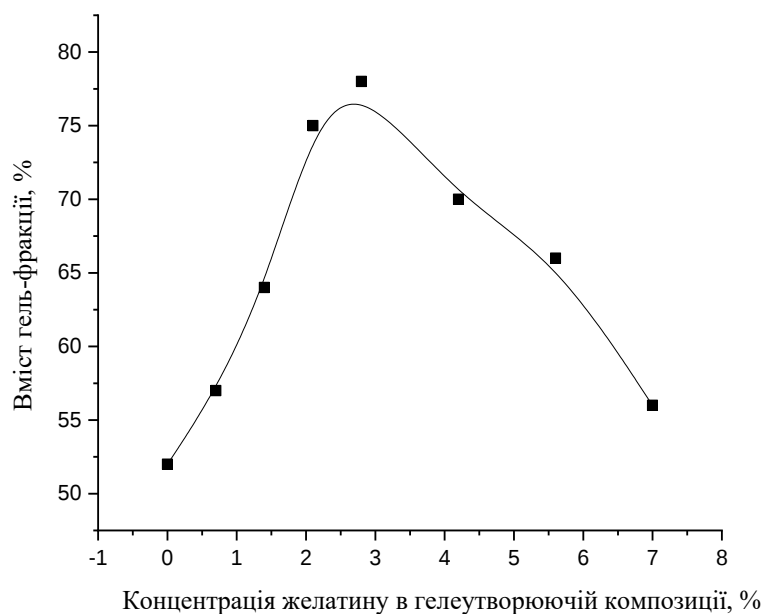


Рис. 6.1. Вміст гель-фракції у зразках гідрогелів отриманих за різного вмісту желатину у гелеутворюючій композиції. (Умови отримання зразків $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 2$, тривалість синтезу гідрогелів 12 годин).

Встановлено, що від концентрації желатину в складі гелеутворюючої композиції залежать не тільки процеси структурування, але і ступінь набрякання поліакриламід-желатинових гідрогелів (рис.6.2). Зразок гідрогелю отриманого при концентрації желатину в гелеутворюючій композиції 2,1 % (крива 2, рис. 6.2 а) при якому спостерігається мінімальний вміст золь фракції демонструє і мінімальне значення рівноважного ступеня набрякання, яке менше навіть у порівнянні з гідрогелем який синтезований у порівняльних умовах без желатину (крива 3, рис. 6.2 а). Крива 1 рис. 6.2 а демонструє зміну ступеня набрякання для зразка гідрогелю отриманого при структуруванні полі-N-гідроксиметилоакриламід у та желатину при їх співвідношенні 1 до 1. Відсутність в композиції форполімеру акриламід, тобто, коли в реакційній суміші є тільки структуруючий агент та желатин, приводить (синтез за температури $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) до утворення гідрогелю з високими значеннями швидкості

набрякання. Проте характер кривої набрякання свідчить про те, що гідрогель не повністю структурований і у процесі набрякання відбувається його часткове розчинення.

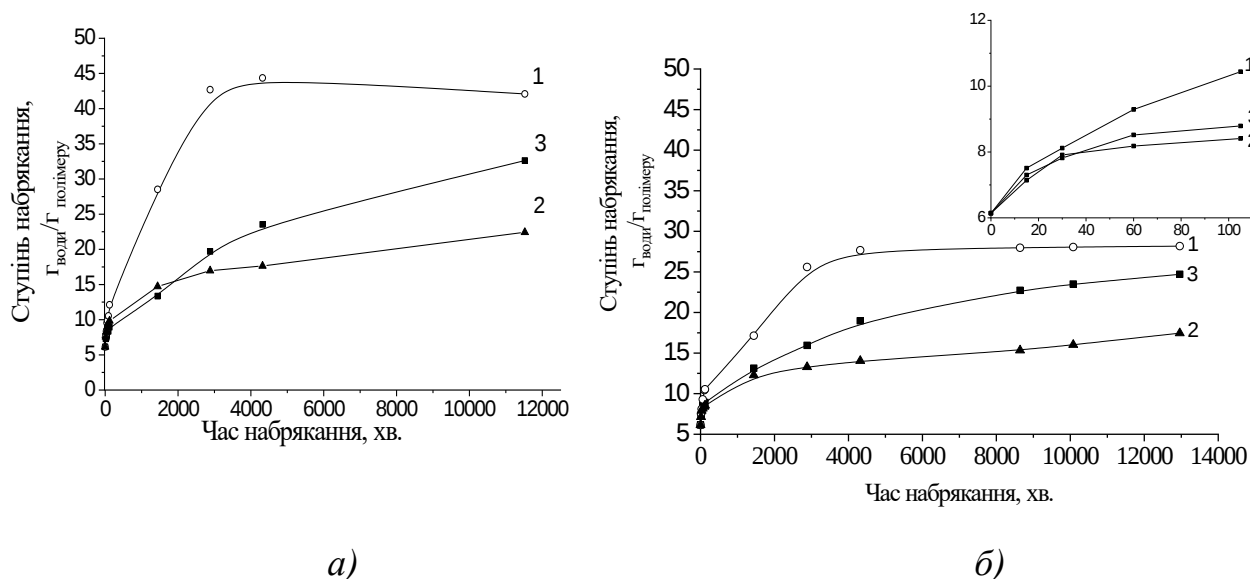


Рис. 6.2. Залежність ступеня набрякання від часу набрякання для зразків гідрогелів: а - при температурі синтезу 60 °С; б - при температурі синтезу 70 °С. Вміст компонентів у гелеутворюючій композиції складає для: 1 – ПАА 0 %, СТ 7 %, желатину 7 %; 2 – ПАА 4,9 %, СТ 7 %, желатину 2,1 %; 3 – ПАА 7 %, СТ 7 %, желатину 0 %.

Збільшення температури синтезу до 70 °С (крива 1 рис. 6.2 б) приводить до того, що гідрогель цього ж складу ознак розчинення не проявляє. Проте порівняно висока початкова швидкість набрякання зберігається і в цьому випадку. Рівноважного ступеня набрякання він досягає уже за 3000 хв, в той час як гідрогелі іншого складу з вмістом желатину 2,1 % та без нього рівноважного ступеня набрякання не досягають і за 14000 хв (крива 2 та 3 рис. 5б). У додатковому вікні рис.6.2 б наведені криві набрякання, що демонструють, що зразок гідрогелю з вмістом желатину на стадії синтезу 2,1 % за 15 хвилин здатен поглинути від 12,5 % рідини а за 60 хвилин 40 % рідини. Ці величини є цілком достатні для забезпечення поглинання зразком гідрогелю відповідної кількості водного розчину лікарського препарату за умови його подальшого використання як гідрогелевої лікувальної пов'язки.

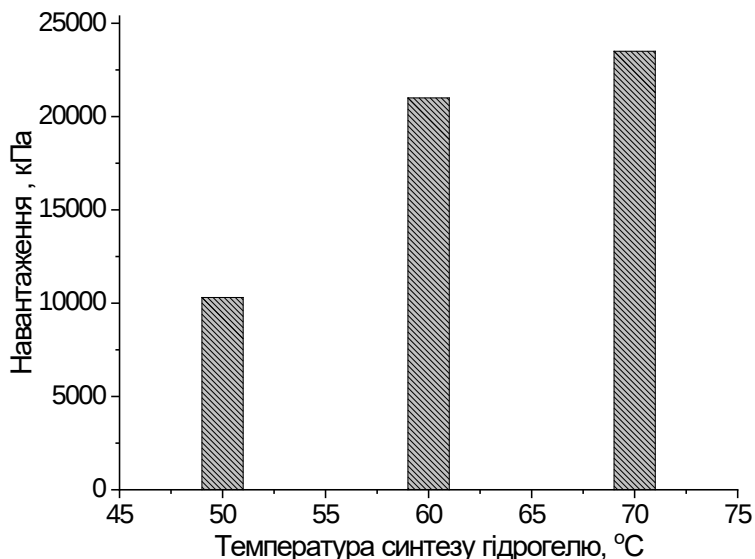


Рис. 6.3. Залежність максимального навантаження від температури синтезу для зразків гідрогелів. (Умови отримання зразків рН = 2, час синтезу 12 годин, сумарна концентрація компонентів 14 %, вміст компонентів у гелеутворюючій композиції: ПАА 4,9 %, СТ 7%, желатину 2,1 %).

Зміну механічних властивостей зразка гідрогелю визначали за зміною величини максимального навантаження, після якого відбувається його руйнування. На рис. 6 для зразків гідрогелів 3, 6 та 9 таблиця 2 однакового складу, що відрізняються лише температурою синтезу наведена залежність максимального навантаження до їх руйнування. Отримані значення дозволяють зробити висновок, що з ростом температури синтезу механічні властивості суттєво покращуються. Для зразків, які отримані при температурах 60 і 70 °C спостерігається зростання в 2÷2,3 рази у порівнянні з аналогами синтезованими при 50 °C. Величина максимального навантаження на відміну від набрякання для температур 60 і 70 °C уже відрізняється несуттєво. Цей факт можна пояснити зростанням кількості вузлів зшивки у полімерній сітці гідрогелю, що сприяє зростанню механічних властивостей гідрогелю та не впливає на зміну величини ступеня набрякання.

За результатами проведених досліджень встановлено вплив умов отримання на характеристики гідрогелів на основі поліакриламід, полі-N-гідроксиметилоакриламід та желатину. Виявлено мінімальні граничні межі концентрацій компонентів, температурний діапазон, рН середовища при яких

можливе утворення гідрогелю із задовільними фізико-хімічними та механічними властивостями.

6.2. Армовані поліакриламід-желатинові гідрогелі.

Наступним етапом робіт по підвищенню механічних властивостей поліакриламід-желатинових гідрогелю було введення до їх структури армувальних елементів, зокрема поліпропіленової сітки чи волокон. Армувальні елементи здатні суттєво покращувати фізико-механічні властивості гідрогелів різних типів та дозволяють отримувати перев'язувальні матеріали (пов'язки) на їх основі [266,267].

Оскільки поліпропіленова сітка або волокно має гідрофобну природу були проведені дослідження по функціоналізації волокон поліпропілену. Насамперед поверхню поліпропілену модифікували поліпероксидом структурна формула якого наведена на рис.6.4. за методиками наведеними в [268]. Макромолекула статистичного пероксидвмісного кополімеру N-[(трет-бутилперокси)метил]акриламід-ко-октилметакрилату включає ланки комономеру октилметакрилату, який забезпечує фізичну сорбцію макромолекули на поверхні поліпропілену та суттєво підвищує імовірність наступної хімічної взаємодії "пероксидний фрагмент - полімерна поверхня".

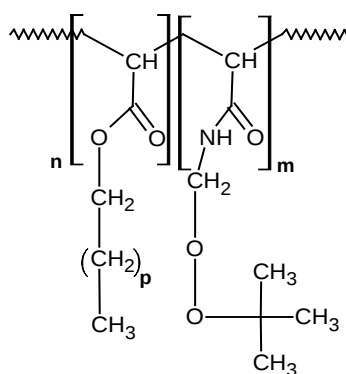


Рис. 6.4. Структурна формула статистичного пероксидвмісного кополімеру N-[(трет-бутилперокси)метил]акриламід-ко-октилметакрилат, де $m=5-15$, $n=95-85$).

Наступним етапом було прищеплення до поверхні пероксидованого поліпропілену (волокно, сітка, тестові пластини) акрилової кислоти та акриламіду за методом «прищеплення від» поверхні. При термічному розпаді

пероксидної групи поліпропілену утворюються радикали на поверхні та в об'ємі. За рахунок радикалів, які локалізовані у шарі прищепленого до поверхні поліпероксиду відбувається ініціювання полімеризації та ріст полімерного ланцюга від поверхні. Крім того, радикали, які є в об'ємі ініціюють полімеризацію та ріст ланцюгів в об'ємі. Прищеплення цих ланцюгів відбувається при рекомбінації з радикалами на поверхні. Акрилову кислоту прищеплювали з водного розчину в присутності ініціатора персульфату калію при температурі 100 °С, час модифікації 12 годин. Акриламід прищеплювали у водному середовищі при температурі 80 °С, час модифікації 15 годин.

Модифікацію поверхні контролювали за зміною кутів змочування двох рідин модифікованої та вихідної поверхонь поліпропілену (оскільки на поверхні волокна та сітки виміряти кут змочування поверхні не можливо то паралельно модифікували тестові пластинки поліпропілену на поверхні яких і проводили заміри). У таблиці 6.2. наведені параметри вільної поверхневої енергії модифікованих поверхонь.

Таблиця 6.2.

Поверхневі характеристики модифікованих поверхонь поліпропілену*

№ п/п	Природа поверхні	Складові та сумарна вільна поверхнева енергія, мН/м		
		λ_s^d	λ_s^h	λ_s
1	ПП	30,60	2,83	33,43
2	ПП-ПА-ОМА	31,62	5,25	36,88
3	ПП-ПА-ОМА-АК ¹	21,46	22,29	43,75
4	ПП-ПА-ОМА-Акриламід ²	9,33	29,81	39,15

¹- модифікація пероксидованої поверхні поліпропілену акриловою кислотою проводилась у водному розчині, концентрація АК 4%, температура 100 °С, час модифікації 12 год.

²- модифікація пероксидованої поверхні поліпропілену акриламідом проводилась у водному середовищі, концентрація АА 4%, температура 80°С, час модифікації 15 год.

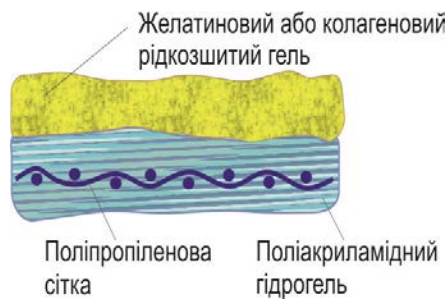
* - оскільки на поверхні волокна та сітки виміряти кут змочування поверхні не можливо то паралельно модифікували тестові пластинки поліпропілену

За даними таблиці 6.2. зросла воднева складова вільної поверхневої енергії поверхонь після прищеплення акрилової кислоти та акриламиду, що свідчить про зміну властивостей поверхні з гідрофобної до гідрофільної.

Внаслідок модифікації зросла і величина водоутримання води волокном, що також є доказом проходження модифікації. Так для вихідного немодифікованого мікрОВОлокна ця величина рівна $0,3 \div 0,5$ г води /г волокна, пероксидоване мікрОВОлокно має здатність утримувати $0,6 \div 0,8$ г води /г волокна. Після прищеплення акрилової кислоти та акриламідУ відбувається суттєве зростання величини водоутримання (зразок 3 таблиця 6.2. $7,0 \div 7,2$ г води /г волокна та зразок 4 таблиця 6.2. $8,0 \div 8,6$ г води /г волокна). Отже модифіковані акриловою кислотою або акриламідом поліпропіленові мікрОВОлокна, які були отримані набували здатності до змочування водою.

За використання цих волокон, або сітки були отримані комбіновані гідрогелі в яких на поверхні базового поліакриламідного гідрогелю армованого модифікованим поліпропіленовим волокном був зформований шар структурованого желатину. Тобто було використано здатність діоксиранових похідних поліетиленгліколів до участі у міжланцюговій взаємодії з макромолекулами функціональних полімерів та перехресно структурувати макромолекули желатину. На рис. 6.5. наведено схематичне відображення отриманого двошарового гідрогелю та фотографія фрагменту його дослідного зразка.

Одночасно з формуванням структури желатинового гідрогелю відбувається його прищеплення до поверхні кополіакриламідного гідрогелю за рахунок фрагментів діоксиранових похідних поліетиленгліколів та карбоксильних груп, що входять до його складу. На рис. 6.5. б наведено фотографію гідрогелевого виробу (відмитого у воді при 50 °С протягом 12 год.) у якого прищеплений верхній желатиновий шар проявлений за допомогою амідочорного 10 Б у відповідності до методики якісного виявлення білків при гель-електрофорезі.



а)



б)

Рис. 6.5. а) схематичне зображення структури комбінованого поліакриламід-желатинового гідрогелю, б) фотографія фрагменту експериментального зразка такого гідрогелю: верхній шар желатиновий – забарвлений барвником амідочорним 10 Б; нижній шар поліакриламідний – прозорий.

Отримана комбінована поліакриламід-желатинова гідрогелева пластина представляє собою композиційний матеріал, структурні елементи якого ковалентно зшиті між собою. Механічну міцність цього композиційного матеріалу забезпечує поліпропіленова сітка, шар поліакриламідного гідрогелю прищеплений до неї відповідає за водний та тепловий баланс рани, а також забезпечує захист рани від механічних пошкоджень і створює бар'єр для інфекційного та грибкового зараження за рахунок бактеріостатичних та фунгіцидних препаратів, які в ньому локалізовані. Рідкозшитий шар желатину на поверхні такої поліакриламід-желатинової пов'язки сам по собі достатньої механічної міцності не має, і використати його як самостійне ранове покриття було не можливо. Крім того, при температурі близькій до температури тіла людини зшитий желатиновий гідрогель не руйнується. За рахунок утворення перехресних міжмолекулярних зв'язків він залишається компонентом гідрогелевої пов'язки переходячи з нагріванням до температури тіла тільки в високоеластичний стан. Такий гідрогель, як по своїй природі, так і по консистенції здатний ефективно моделювати профіль рани, а також може слугувати джерелом амінокислот необхідних для процесів регенерації тканин.

6.3. Функціоналізовані поліакридамідні гідрогелі.

В даному підрозділі наведено дослідження по функціоналізації поліакриламідного гідрогелю з метою отримання рН чутливого сенсора.

Загально відомо, що основною характеристикою водних середовищ є показник кислотності рН. Внаслідок зростаючої потреби проводити моніторинг навколишнього середовища, контроль проходження біотехнологічних процесів, а ще з ростом використання рН сенсорів при медичній діагностиці, росте і потреба у розробці високочутливих, швидких, та недорогих методів контролю рН. Зокрема, як рН сенсори часто використовують в медицині та біотехнології полімерні гідрогелеві системи, параметри яких є чутливими до дії зовнішніх факторів [269]. Серед основних завдань що виникають під час створення чутливих компонентів для сенсорів важливим є метод реєстрації змін, що відбуваються при дії певних чинників. Для того щоб одержати певні числові значення, які матимуть прямо-пропорційну залежність до зміни рН середовища, в якому необхідно провести замір, найбільш придатними до використання є фізичні ефекти пов'язані зі зміною оптичних параметрів середовища. Однак досліджені поліакриламідні гідрогелі (підрозділ 6.1.) неможливо використовувати для реєстрації рН середовища. Однак він придатний для подальшої функціоналізації так як в ньому залишається певна кількість реакційноздатних груп у зшивачі які не прийняли участь у структуруванні просторової матриці гідрогелю, тому його було використано, як основу для створення рН-чутливого сенсора. Для отримання необхідного оптичного ефекту в склад гідрогелю необхідно ввести компонент, який рівномірно розподілений у його об'ємі, зміна оптичної густини якого, пропорційна до зміни рН розчину.

Тому було синтезовано поліакриламідний гідрогель, до складу якого уведено кополіестери на основі флуоресцеїну (F), 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти (GluLa), поліетиленоксидів різної молекулярної маси (PEG) які були попередньо одержані за методикою [270]. Застосування флуоресцеїновмісних кополієстерів зумовлено тим, що ввести флуоресцеїн як індивідуальну сполуку в поліакриламідний гідрогель неможливо, бо він має дуже великі гідрофобні властивості і при $\text{pH} < 7$ практично нерозчинний у воді.

Для отримання рН-чутливого поліакриламідного проводили взаємодію форполімерів поліакриламідну та полі-(Nгідроксиметилакриламідну) з дисперсною фазою кополіестеру на основі 2-(додеканоїламіно)пентандіової кислоти, поліестеру гліколю різної 40 молекулярної маси та флуоресцеїну, концентрація якого є від 0,5 до 2,5 %, при цьому співвідношення форполімерів рівне 1:1. Гомогенізацію проводили при рН=1, далі вакуумували та заповнювали сумішню плоско паралельні форми, які після герметизування витримували при температурі 60-65 °С впродовж 12-15 годин. В результаті синтезу одержано зразки гідрогелів товщиною 1,0 мм.

Таблиця 6.3.

Склад реакційної суміші для формування поліакриламідного рН-чутливого гідрогелю

№ зразка	Співвідношення форполімерів	рН-чутливий компонент (вводимо у вигляді колоїдного розчину)	Концентрація кополіестеру в колоїдному розчині, %	Вміст флуоресцеїну в кополіестері, %
1	1:1	GluLa-PEG600-F	1,0	5,2
2	1:1	GluLa-PEG1000-F	1,0	3,75
3	1:1	GluLa-PEG1500-F	1,0	3,17

Оптичну густину гідрогелів вимірювали у порівнянні з гідрогелями, які не містили флуоресцеїну при довжині хвилі $\lambda = 480$ нм за допомогою спектрофотометра UNICO 2101. Водневий показник середовища створювали за допомогою буферних розчинів з рН = 1,67, рН = 4,01, рН = 4,67, рН = 6,86, рН = 9,18.

На рис. 6.6, приведено залежність оптичної густини гідрогелів від рН середовища. Спостерігається, прямо пропорційна залежність оптичної густини (при довжині хвилі світла 480 нм) флуоресцеїнівмісного гідрогелю товщиною 1,0 мм від рН середовища, тільки для зразків гідрогелів, які одержані при введенні колоїдних розчинів кополіестерів тільки GluLa-PEG1000-F (зразок 2) і GluLa-PEG1500-F (зразок 3). Це пов'язано з тим, що колоїдний розчин кополіестеру GluLa-PEG600-F (зразок 1) при рН<4 втрачає колоїдну стабільність що

спричиняє помутніння та не дає можливість отримати прямо пропорційну залежність оптичної густини від рН.

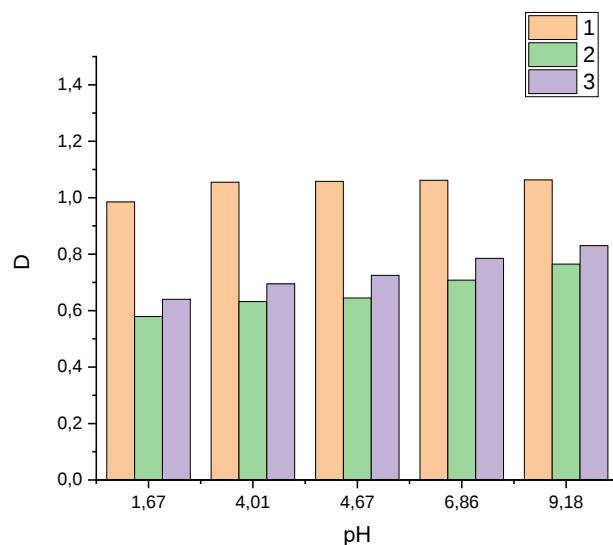


Рис.6.6. Залежність оптичної густини синтезованих гідрогелів від значення рН, де 1 – гідрогель наповнений дисперсною фазою кополіестеру на основі GluLa, PEG600 та F; 2- гідрогель наповнений кополіестером на основі GluLa, PEG1000 та флуоресцеїну; 3- гідрогель наповнений кополіестером на GluLa, PEG1500 та F.

Отже, розроблений спосіб отримання рН-чутливих поліакриламідних гідрогелів не передбачає використання дорогого обладнання, тривалих, енерго- та матеріалозатратних технологічних процесів, і їх можна використовувати як рН-сенсор у біомедицині та діагностиці.

ВИСНОВКИ

1. Шляхом конденсаційного структурування макромолекул желатину та його поліелектролітного комплексу з альгінатом натрію водорозчинними діоксирановими сполуками отримані нетоксичні гідрогелі придатні для медико-біологічного використання.
2. Синтезовано ряд діоксиранових похідних поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси та після проведеної оптимізації встановлено, що найбільш ефективним структуруючим агентом для синтезу гідрогелів на основі желатину є діоксирановий структуруючий агент на основі ПЕГ400.
3. Встановлено характер впливу на перебіг процесів структурування концентраційного, температурного, часового та інших факторів. Вивчено закономірності гідролітичного перетворення водорозчинних діоксиранових сполук у воді для оцінки їх ефективності як структуруючих агентів для отримання гідрогелів на основі желатину.
4. Дослідженням процесу структурування желатину діоксирановими похідними поліоксиетиленгліколів у водному розчині, виявлено умови, що дозволяють синтезувати гідрогелі желатину в одну стадію без необхідності додаткових процедур очистки, які здатні до набрякання у воді та фізіологічних середовищах.
5. Встановлено умови отримання та визначено оптимальне співвідношення біополімерів і структуруючого агента в гідрогелевій матриці для отримання матеріалів на основі структурованих поліелектролітних комплексів желатину з альгінатом натрію. Отримані гідрогелі мають високі значення фізико-механічних характеристик при збереженні здатності до набрякання у воді та фізіологічних розчинах.
6. Дослідженням модуля пружності та рівноважного набрякання гелів визначено ступень їх зшивання. Досліджено характеристику термодинамічного стану системи гідрогель - вода.

7. Електронно-мікроскопічними дослідженнями показано, що отримані гідрогелі, характеризуються розвиненою пористою структурою з розміром відкритих пор від одиниць до десятків мікрометрів, причому загальна пористість і середній розмір пор закономірно зменшується із збільшенням ступеня структурування.

8. Продемонстровано можливість використання синтезованих гідрогелів як основу для локальної доставки бактерицидних та терапевтичних препаратів. Охарактеризовано залежності вивільнення біологічно активних сполук з синтезованих гідрогелевих матеріалів.

9. Встановлено високий рівень біосумісності отриманих полімерних систем. Показано їх здатність до біодеградації під дією протеолітичних ензимів.

10. Продемонстровано окремі напрямки конструювання гідрогелевих матеріалів із спеціальними властивостями

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Li, Z., Lu, F., & Liu, Y. (2023). A Review of the Mechanism, Properties, and Applications of Hydrogels Prepared by Enzymatic Cross-linking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01162>
2. Sokker, H. H., Abdel Ghaffar, A. M., Gad, Y. H., & Aly, A. S. (2009). Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, 75(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.06.015>
3. Vashist, A., & Ahmad, S. (2013). Hydrogels: Smart Materials for Drug Delivery. *Oriental Journal Of Chemistry*, 29(03), 861–870. <https://doi.org/10.13005/ojc/290303>
4. Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638–1649. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>
5. Tillet, G., Boutevin, B., & Ameduri, B. (2011). Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature. *Progress in Polymer Science*, 36(2), 191–217. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.08.003>
6. Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Aslan, B., Özkan, B., Mutlu, H., & Üstün, E. (2018). Hydrogels in Regenerative Medicine. *Y Biomaterials in Regenerative Medicine*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70409>
7. am Ende, M. T., & Mikos, A. G. (2002). Diffusion-Controlled Delivery of Proteins from Hydrogels and Other Hydrophilic Systems. *Y Pharmaceutical Biotechnology* (c. 139–165). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-306-46803-4_5
8. Lin, C.-Y., Battistoni, C. M., & Liu, J. C. (2021). Redox-Responsive Hydrogels with Decoupled Initial Stiffness and Degradation. *Biomacromolecules*, 22(12), 5270–5280. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01180>.
9. Li, Y., Rodrigues, J., & Tomás, H. (2012). Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, 41(6), 2193–2221. <https://doi.org/10.1039/c1cs15203c>
10. Mortier, C., Costa, D. C. S., Oliveira, M. B., Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Blaker, J. J., & Mano, J. F. (2022). Advanced hydrogels based on natural macromolecules: chemical routes to achieve mechanical versatility. *Materials Today Chemistry*, 26, 101222. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101222>.
11. Panouillé, M., & Larreta-Garde, V. (2009). Gelation behaviour of gelatin and alginate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1074–1080. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.011>.

-
12. Goudoulas, T. B., & Germann, N. (2017). Phase transition kinetics and rheology of gelatin-alginate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 66, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.018>.
13. Varvarenko, S., Samaryk, V., Nosova, N., Puzko, N., Taras, R., Tarnavchyk, I., Voronov, A., Kohut, A., & Voronov, S. (2010). Prediction of Interfacial Interactions between Polymer Layers. *Macromolecular Symposia*, 298(1), 72–78. <https://doi.org/10.1002/masy.201000037>
14. Dou, L., Li, B., Zhang, K., Chu, X., & Hou, H. (2018). Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1377–1383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>.
15. Grytsenko, O., Bratychak Jr., M., Dulebova, L., & Gajdoš, I. (2024). Thermophysical Properties of Composite Metal-Filled Copolymers of Polyvinylpyrrolidone. *Chemistry & Chemical Technology*, 18(1), 37–43. <https://doi.org/10.23939/chcht18.01.037>
16. Vasile, C., Pamfil, D., Stoleru, E., & Baican, M. (2020). New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers. *Molecules*, 25(7), 1539. <https://doi.org/10.3390/molecules25071539>
17. Zhang, Y., & Huang, Y. (2021). Rational Design of Smart Hydrogels for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.615665>.
18. Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*, 12(11), 2702. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
19. Bustamante-Torres, M., Romero-Fierro, D., Arcentales-Vera, B., Palomino, K., Magaña, H., & Bucio, E. (2021). Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials. *Gels*, 7(4), 182. <https://doi.org/10.3390/gels7040182>
20. Kumar, A., & Han, S. S. (2016). PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(4), 159–182. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>.
21. Benwood, C., Chrenek, J., Kirsch, R. L., Masri, N. Z., Richards, H., Teetzen, K., & Willerth, S. M. (2021). Natural Biomaterials and Their Use as Bioinks for Printing Tissues. *Bioengineering*, 8(2), 27. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8020027>
22. Katime, I., Novoa, R., & Zuluaga, F. (2001). Swelling kinetics and release studies of theophylline and aminophylline from acrylic acid/n-alkyl methacrylate hydrogels.

European Polymer Journal, 37(7), 1465–1471. [https://doi.org/10.1016/s0014-3057\(01\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0014-3057(01)00004-0)

23. Zhang, H., Lin, X., Cao, X., Wang, Y., Wang, J., & Zhao, Y. (2024). Developing natural polymers for skin wound healing. *Bioactive Materials*, 33, 355–376. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.11.012>

24. Lan, L., Ping, J., Xiong, J., & Ying, Y. (2022). Sustainable Natural Bio-Origin Materials for Future Flexible Devices. *Advanced Science*, 2200560. <https://doi.org/10.1002/advs.202200560>

25. Qiu, A., Wang, Y., Zhang, G., & Wang, H. (2022). Natural Polysaccharide-Based Nanodrug Delivery Systems for Treatment of Diabetes. *Polymers*, 14(15), 3217. <https://doi.org/10.3390/polym14153217>

26. Wang, C., Yokota, T., & Someya, T. (2021). Natural Biopolymer-Based Biocompatible Conductors for Stretchable Bioelectronics. *Chemical Reviews*, 121(4), 2109–2146. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00897>

27. Puppi, D., & Chiellini, F. (2020). Biodegradable Polymers for Biomedical Additive Manufacturing. *Applied Materials Today*, 20, 100700. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100700>

28. Seymour/Carraher's Polymer Chemistry. (2003). CRC Press. <https://doi.org/10.4324/9780203911303>.

29. Chinnasamy, G., Chandrasekharan, S., & Bhatnagar, S. (2019). Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Melia azedarach*: Enhancement of Antibacterial, Wound Healing, Antidiabetic and Antioxidant Activities. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 9823–9836. <https://doi.org/10.2147/ijn.s231340>

30. Wang, J., & Zhuang, S. (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*, 131825. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131825>

31. Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., & Gomez d'Ayala, G. (2020). Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115839. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>

32. Chen, K., Sivaraj, D., Davitt, M. F., Leeolou, M. C., Henn, D., Steele, S. R., Huskins, S. L., Trotsyuk, A. A., Kussie, H. C., Greco, A. H., Padmanabhan, J., Perrault, D. P., Zamaleeva, A. I., Longaker, M. T., & Gurtner, G. C. (2022). Pullulan-Collagen hydrogel wound dressing promotes dermal remodelling and wound healing compared to commercially available collagen dressings. *Wound Repair and Regeneration*. <https://doi.org/10.1111/wrr.13012>

-
33. Mbese, Z., Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2021). Collagen-Based Nanofibers for Skin Regeneration and Wound Dressing Applications. *Polymers*, 13(24), 4368. <https://doi.org/10.3390/polym13244368>
34. Taheri, P., Jahanmardi, R., Koosha, M., & Abdi, S. (2020). Physical, mechanical and wound healing properties of chitosan/gelatin blend films containing tannic acid and/or bacterial nanocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.114>
35. Afjoul, H., Shamloo, A., & Kamali, A. (2020). Freeze-gelled alginate/gelatin scaffolds for wound healing applications: An in vitro, in vivo study. *Materials Science and Engineering: C*, 113, 110957. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110957>
36. Aliabadi, M., Chee, B. S., Matos, M., Cortese, Y. J., Nugent, M. J. D., de Lima, T. A. M., Magalhães, W. L. E., & de Lima, G. G. (2020). Yerba Mate Extract in Microfibrillated Cellulose and Corn Starch Films as a Potential Wound Healing Bandage. *Polymers*, 12(12), 2807. <https://doi.org/10.3390/polym12122807>
37. Jabbari, F., Babaeipour, V., & Saharkhiz, S. (2023). Comprehensive review on biosynthesis of hyaluronic acid with different molecular weights and its biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 240, 124484. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124484>
38. Hu, B., Gao, M., Boakye-Yiadom, K. O., Ho, W., Yu, W., Xu, X., & Zhang, X.-Q. (2021). An intrinsically bioactive hydrogel with on-demand drug release behaviors for diabetic wound healing. *Bioactive Materials*, 6(12), 4592–4606. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.040>
39. Zhang, X., Li, Y., Ma, Z., He, D., & Li, H. (2021). Modulating degradation of sodium alginate/bioglass hydrogel for improving tissue infiltration and promoting wound healing. *Bioactive Materials*, 6(11), 3692–3704. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.038>
40. Wang, T., Yi, W., Zhang, Y., Wu, H., Fan, H., Zhao, J., & Wang, S. (2022). A platelet-rich plasma contained sodium alginate hydrogel for wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113096. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113096>
41. Yu, R., Yang, Y., He, J., Li, M., & Guo, B. (2020). Novel supramolecular self-healing silk fibroin-based hydrogel via host-guest interaction as wound dressing to enhance wound healing. *Chemical Engineering Journal*, 128278. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128278>
42. Long, Y., Bai, M., Liu, X., Lu, W., Zhong, C., Tian, S., Xu, S., Ma, Y., Tian, Y., Zhang, H., Zhang, L., & Yang, J. (2022). A zwitterionic cellulose-based skin sensor for the real-time monitoring and antibacterial sensing wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 297, 119974. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119974>

-
43. de Amorim, J. D. P., da Silva Junior, C. J. G., de Medeiros, A. D. M., do Nascimento, H. A., Sarubbo, M., de Medeiros, T. P. M., Costa, A. F. d. S., & Sarubbo, L. A. (2022). Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application. *Molecules*, 27(17), 5580. <https://doi.org/10.3390/molecules27175580>
44. Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., & Khademhosseini, A. (2013). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3), 441–453. <https://doi.org/10.1002/bit.25160>
45. Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337–4351. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00340-5)
46. Kamoun, E. A., Chen, X., Mohy Eldin, M. S., & Kenawy, E.-R. S. (2015). Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.07.005>
47. Zhao, X., Lang, Q., Yildirimer, L., Lin, Z. Y., Cui, W., Annabi, N., Ng, K. W., Dokmeci, M. R., Ghaemmaghami, A. M., & Khademhosseini, A. (2015). Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 5(1), 108–118. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500005>
48. Chung, B. G., Lee, K. H., Khademhosseini, A., & Lee, S. H. (2012). Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering. *Lab on a chip*, 12(1), 45–59. <https://doi.org/10.1039/c1lc20859d>
49. Chen, H., Liu, Y., Ren, B., Zhang, Y., Ma, J., Xu, L., Chen, Q., & Zheng, J. (2017). Super Bulk and Interfacial Toughness of Physically Crosslinked Double-Network Hydrogels. *Advanced Functional Materials*, 27(44), 1703086. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703086>
50. Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(1), 47–73. <https://doi.org/10.1080/10408399709527767>
51. Jiang, Q., Han, Z., Li, W., Ji, T., Yuan, Y., Zhang, J., Zhao, C., Cheng, Z., & Wang, S. (2022). Adsorption properties of heavy metals and antibiotics by chitosan from larvae and adult *Trypoxylus dichotomus*. *Carbohydrate Polymers*, 276, 118735. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118735>
52. Dhankhar, P., Dalal, V., Singh, V., Sharma, A. K., & Kumar, P. (2021). Structure of dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* in complex with veratryl alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.100>

-
53. Draget, K. I., & Skjåk-Bræk, G. (2007). Alginates in relation to human health; from commodity to high cost products? *Y Gums and Stabilisers for the Food Industry 11* (c. 356–364). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551016-00356>
54. Harrington, J. C., & Morris, E. R. (2009). An unusual manifestation of phase separation in mixtures of disordered gelatin with konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.002>
55. Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., Leroux, J. C., Atkinson, B. L., Binette, F., & Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155–2161. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00116-2)
56. Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>
57. García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., & Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549–579. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00050-1)
58. H. Gulrez, S. K., Al-Assaf, S., & O, G. (2011). Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Y Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/24553>
59. Mirzaei, A., Esmkhani, M., Zallaghi, M., Nezafat, Z., & Javanshir, S. (2022). Biomedical and Environmental Applications of Carrageenan-Based Hydrogels: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02726-5>
60. Dong, S., Wang, Y., Li, J., Zhang, D., Zhou, Y., & Tong, Y. (2020). Tuning the crosslink structure of cationic hydrogel for enhanced chromium(VI) removal: The covalent and electrostatic co-crosslinked effects and adsorption mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 394, 124944. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124944>
61. Marta M. Bukartyk, Nataliia G. Nosova, Olha V. Maikovych, Nataliia M. Bukartyk, Anna V. Stasiuk, Iryna A. Dron, Nataliia V. Fihurka, Semen V. Khomyak, Dmytro D. Ostapiv, Vasyl V. Vlizlo, Volodymyr Ya. Samaryk, Serhii M. Varvarenko (2022). Preparation and research of properties of combined alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Chemistry and Technologies*, 30(1), 11–20. <https://doi.org/10.15421/jchemtech.v30i1.242230>.
62. Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00107-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00107-0)

-
63. Yan, B., Hu, X., Zhao, Y., Wu, M., Feng, Y., He, Z., Qi, G., Ren, W., Liang, Y., Wang, W., Qiao, J., & Zhang, Q. (2022). Research and development of a sodium alginate/calcium ion gel based on in situ cross-linked double-network for controlling spontaneous combustion of coal. *Fuel*, 322, 124260. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124260>
64. Roas-Escalona, N., Becquart, F., Delair, T., & Dutertre, F. (2024). Chitosan-based hydrogels: Influence of crosslinking strategy on rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 122329. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122329>
65. Ma, S., Qi, X., Cao, Y., Yang, S., & Xu, J. (2013). Hydrogen bond detachment in polymer complexes. *Polymer*, 54(20), 5382–5390. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.07.047>
66. Bai, Z., Jia, K., Liu, C., Wang, L., Lin, G., Huang, Y., Liu, S., & Liu, X. (2021). A Solvent Regulated Hydrogen Bond Crosslinking Strategy to Prepare Robust Hydrogel Paint for Oil/Water Separation. *Advanced Functional Materials*, 2104701. <https://doi.org/10.1002/adfm.202104701>
67. Tang, L., Zhang, D., Gong, L., Zhang, Y., Xie, S., Ren, B., Liu, Y., Yang, F., Zhou, G., Chang, Y., Tang, J., & Zheng, J. (2019). Double-Network Physical Cross-Linking Strategy To Promote Bulk Mechanical and Surface Adhesive Properties of Hydrogels. *Macromolecules*, 52(24), 9512–9525. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b01686>
68. Qavi, S., Pourmahdian, S., & Eslami, H. (2014). Acrylamide Hydrogels Preparation via Free Radical Crosslinking Copolymerization: Kinetic Study and Morphological Investigation. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 51(10), 842–848. <https://doi.org/10.1080/10601325.2014.937132>
69. Ghosh, A., Meyyappan, P., & Steele, T. W. J. (2022). Voltage activation of poly (ethylene glycol) diacrylate. *Progress in Organic Coatings*, 165, 106770. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.106770>
70. Chen, M., Ni, Z., Shen, Y., Xiang, G., & Xu, L. (2020). Reinforced swelling and water-retention properties of super-absorbent hydrogel fabricated by a dual stretchable single network tactic. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 602, 125133. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125133>
71. Ugrinovic, V., Markovic, M., Bozic, B., Panic, V., & Veljovic, D. (2024). Physically Crosslinked Poly(methacrylic acid)/Gelatin Hydrogels with Excellent Fatigue Resistance and Shape Memory Properties. *Gels*, 10(7), 444. <https://doi.org/10.3390/gels10070444>
72. Zhang, Z., Fu, H., Li, Z., Huang, J., Xu, Z., Lai, Y., Qian, X., & Zhang, S. (2022). Hydrogel materials for sustainable water resources harvesting & treatment: Synthesis,

- mechanism and applications. *Chemical Engineering Journal*, 439, 135756. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135756>
73. Ashfaq, A., Clochard, M.-C., Coqueret, X., Dispenza, C., Driscoll, M. S., Ulański, P., & Al-Sheikhly, M. (2020). Polymerization Reactions and Modifications of Polymers by Ionizing Radiation. *Polymers*, 12(12), 2877. <https://doi.org/10.3390/polym12122877>
74. Ghobashy, M. M. (2018). Ionizing Radiation-Induced Polymerization. *Y Ionizing Radiation Effects and Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73234>
75. Kimura, A., Yoshida, F., Ueno, M., & Taguchi, M. (2021). Application of radiation crosslinking technique to development of gelatin scaffold for tissue engineering. *Radiation Physics and Chemistry*, 180, 109287. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109287>
76. Nasution, H., Harahap, H., Dalimunthe, N. F., Ginting, M. H. S., Jaafar, M., Tan, O. O. H., Aruan, H. K., & Herfananda, A. L. (2022). Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: A Review. *Gels*, 8(9), 568. <https://doi.org/10.3390/gels8090568>
77. He, M., Wang, Z., Cao, Y., Zhao, Y., Duan, B., Chen, Y., Xu, M., & Zhang, L. (2014). Construction of Chitin/PVA Composite Hydrogels with Jellyfish Gel-Like Structure and Their Biocompatibility. *Biomacromolecules*, 15(9), 3358–3365. <https://doi.org/10.1021/bm500827q>
78. Suprpto, S., Sulaiman, T. N. S., Rohman, A., & Nugroho, A. K. (2024). Modification And Characterization Of Amprotab With Hydroxypropyl Methylcellulose Using Citric Acid As Crosslinking Agent. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 43–53. <https://doi.org/10.22159/ijap.2024v16s5.52487>
79. Peptu, C. A., Băcăiță, E. S., Savin (Logigan), C.-L., Luțcanu, M., & Agop, M. (2021). Hydrogels Based on Alginates and Carboxymethyl Cellulose with Modulated Drug Release—An Experimental and Theoretical Study. *Polymers*, 13(24), 4461. <https://doi.org/10.3390/polym13244461>
80. Skopinska-Wisniewska, J., Tuszynska, M., & Olewnik-Kruszkowska, E. (2021). Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials*, 14(2), 396. <https://doi.org/10.3390/ma14020396>
81. Kaczmarek, B., Sionkowska, A., Monteiro, F. J., Carvalho, A., Łukowicz, K., & Osyczka, A. M. (2017). Characterization of gelatin and chitosan scaffolds cross-linked by addition of dialdehyde starch. *Biomedical Materials*, 13(1), 015016. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/aa8910>
82. Mugnaini, G., Gelli, R., Mori, L., & Bonini, M. (2023). How to Cross-Link Gelatin: The Effect of Glutaraldehyde and Glyceraldehyde on the Hydrogel Properties. *ACS Applied Polymer Materials*. <https://doi.org/10.1021/acsapm.3c01676>

-
83. Sapuła, P., Bialik-Wąs, K., & Malarz, K. (2023). Are Natural Compounds a Promising Alternative to Synthetic Cross-Linking Agents in the Preparation of Hydrogels? *Pharmaceutics*, 15(1), 253. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010253>
84. Catanzano, O., Gomez d'Ayala, G., D'Agostino, A., Di Lorenzo, F., Schiraldi, C., Malinconico, M., Lanzetta, R., Bonina, F., & Laurienzo, P. (2021). PEG-crosslinked-chitosan hydrogel films for in situ delivery of *Opuntia ficus-indica* extract. *Carbohydrate Polymers*, 264, 117987. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117987>
85. Shams Es-haghi, S., & Weiss, R. A. (2016). Fabrication of Tough Hydrogels from Chemically Cross-Linked Multiple Neutral Networks. *Macromolecules*, 49(23), 8980–8987. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b02264>
86. Sung, H.-W., Chang, Y., Chiu, C.-T., Chen, C.-N., & Liang, H.-C. (1999). Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(2), 116–126. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199911\)47:2%3C116::aid-jbm2%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199911)47:2%3C116::aid-jbm2%3E3.0.co;2-j)
87. Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2006). *Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol*. International Agency for Research on Cancer.
88. Hermanson, G. T. (2013). The Reactions of Bioconjugation. *Y Bioconjugate Techniques* (c. 229–258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00003-0>
89. Final Report on the Safety Assessment of Sodium p -Chloro- m -Cresol, p -Chloro- m -Cresol, Chlorothymol, Mixed Cresols, m -Cresol, o -Cresol, p -Cresol, Isopropyl Cresols, Thymol, o -Cymen-5-ol, and Carvacrol1. (2006). *International Journal of Toxicology*, 25(1_suppl), 29–127. <https://doi.org/10.1080/10915810600716653>
90. Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T., & Osada, Y. (2003). Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Advanced Materials*, 15(14), 1155–1158. <https://doi.org/10.1002/adma.200304907>
91. Zhang, Y. S., & Khademhosseini, A. (2017). Advances in engineering hydrogels. *Science*, 356(6337), Стаття eaaf3627. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3627>
92. Nonoyama, T., & Gong, J. P. (2015). Double-network hydrogel and its potential biomedical application: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 229(12), 853–863. <https://doi.org/10.1177/0954411915606935>
93. Sun, Y., Zhou, T., Li, W., Yu, F., & Ma, J. (2020). Amino-functionalized alginate/graphene double-network hydrogel beads for emerging contaminant removal from aqueous solution. *Chemosphere*, 241, 125110. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125110>

-
94. Bai, C., Huang, Q., Zhang, X., & Xiong, X. (2019). Mechanical Strengths of Hydrogels of Poly(N , N -Dimethylacrylamide)/Alginate with IPN and of Poly(N , N -Dimethylacrylamide)/Chitosan with Semi-IPN Microstructures. *Macromolecular Materials and Engineering*, 304(11), 1900309. <https://doi.org/10.1002/mame.201900309>
95. Xu, S., Li, H., Ding, H., Fan, Z., Pi, P., Cheng, J., & Wen, X. (2019). Allylated chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel based on a functionalized double network for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, 214, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.008>
96. Yan, X., Chen, Q., Zhu, L., Chen, H., Wei, D., Chen, F., Tang, Z., Yang, J., & Zheng, J. (2017). High strength and self-healable gelatin/polyacrylamide double network hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(37), 7683–7691. <https://doi.org/10.1039/c7tb01780d>
97. Han, Q., Chen, L., Li, W., Zhou, Z., Fang, Z., Xu, Z., & Qian, X. (2018). Self-assembled three-dimensional double network graphene oxide/polyacrylic acid hybrid aerogel for removal of Cu²⁺ from aqueous solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34), 34438–34447. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3409-9>
98. Tarashi, S., Nazockdast, H., & Sodeifian, G. (2020). A comparative study on microstructure, physical-mechanical properties, and self-healing performance of two differently synthesized nanocomposite double network hydrogels based on κ-car/PAm/GO. *Polymer*, 188, 122138. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.122138>
99. Yuan, L., Wu, Y., Gu, Q.-s., El-Hamshary, H., El-Newehy, M., & Mo, X. (2017). Injectable photo crosslinked enhanced double-network hydrogels from modified sodium alginate and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.058>
100. Li, J., Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
101. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
102. Zhang, H., Sun, T., Liu, K., Chen, Z., Liu, F., & Fan, Y. (2021). Hemostatic hydrogels. *ACS Applied Bio Materials*, 4(5), 4021–4036. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00295>
103. Peppas, N. A., & Hoffman, A. S. (2020). Hydrogels. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* (pp. 153–166). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00010-0>

-
104. Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
105. Van Tomme, S. R., & Hennink, W. E. (2007). Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Review of Medical Devices*, 4(2), 147–164. <https://doi.org/10.1586/17434440.4.2.147>
106. Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>
107. Chen, F. M., & Liu, X. (2016). Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 53, 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
108. Sood, A., Granick, M. S., & Tomaselli, N. L. (2014). Wound dressings and comparative effectiveness data. *Advances in Wound Care*, 3(8), 511–529. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>
109. Guvendiren, M., Lu, H. D., & Burdick, J. A. (2012). Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter*, 8(2), 260–272. <https://doi.org/10.1039/C1SM06513K>
110. Ratner, B. D., & Bryant, S. J. (2004). Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6, 41–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>
111. Jones, V. J. (2006). The use of gauze: Will it ever change? *International Wound Journal*, 3(2), 79–86. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00191.x>
112. Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
113. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., & Roveri, N. (2002). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 23(24), 4827–4832. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00235-5)
114. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
115. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
116. Highley, C. B., Prestwich, G. D., & Burdick, J. A. (2016). Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 40, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.008>

-
117. Boateng, J. (Ред.). (2020). *Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119433316>
118. Sen, C. K. (2019). Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in Wound Care*, 8(2), 39–48. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0946>
119. Aitzetmüller, M. M., Machens, H.-G., & Duscher, D. (2018). Challenges and Opportunities in Drug Delivery for Wound Healing. Y *Chronic Wounds, Wound Dressings and Wound Healing* (с. 37–49). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/15695_2017_91
120. Stiehl, J. B. (2021). Early wound bed preparation: irrigation and debridement. *Journal of Wound Care*, 30(Sup9), S8—S16. <https://doi.org/10.12968/jowc.2021.30.sup9.s8>
121. Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O., & Tomic-Canic, M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(5), 569–578. <https://doi.org/10.1111/wrr.12205>
122. Dutra Alves, N. S., Reigado, G. R., Santos, M., Caldeira, I. D. S., Hernandez, H. d. S., Freitas-Marchi, B. L., Zhivov, E., Chambergo, F. S., & Nunes, V. A. (2025). Advances in regenerative medicine-based approaches for skin regeneration and rejuvenation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1527854>
123. Choudhury, A., Deka, H., Dey, B. K., Bhairam, M., & Sengupta, K. (2023). Nanomaterials for skin repair and regeneration. Y *Nanostructured Materials for Tissue Engineering* (с. 497–510). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95134-0.00015-8>
124. Zhang, X., Shu, W., Yu, Q., Qu, W., Wang, Y., & Li, R. (2020). Functional Biomaterials for Treatment of Chronic Wound. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00516>
125. Ndlovu, S. P., Ngece, K., Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2021). Gelatin-Based Hybrid Scaffolds: Promising Wound Dressings. *Polymers*, 13(17), 2959. <https://doi.org/10.3390/polym13172959>
126. Market Research Report. 2022. <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/chronic-wound-care-market-100222>
127. Ribeiro, M., Simões, M., Vitorino, C., & Mascarenhas-Melo, F. (2024). Hydrogels in Cutaneous Wound Healing: Insights into Characterization, Properties, Formulation and Therapeutic Potential. *Gels*, 10(3), 188. <https://doi.org/10.3390/gels10030188>

-
128. Mogoşanu, G. D., & Grumezescu, A. M. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 463(2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>
129. Dron, I., Nosova, N., Fihurka, N., Bukartyk, N., Nadashkevych, Z., Varvarenko, S., & Samaryk, V. (2022). Investigation of Hydrogel Sheets Based on Highly Esterified Pectin. *Chemistry & Chemical Technology*, 16(2), 220–226. <https://doi.org/10.23939/chcht16.02.220>
130. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*, 101(7), 1869–1880. <https://doi.org/10.1021/cr000108x>
131. Ebhodaghe, S. O. (2020). Hydrogel – based biopolymers for regenerative medicine applications: a critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1–18. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1809409>
132. *Hydrogels in Tissue Engineering*. (2018). MDPI. <https://doi.org/10.3390/books978-3-03897-122-1>
133. Bryan, J. (2004). Moist wound healing: a concept that changed our practice. *Journal of Wound Care*, 13(6), 227–228. <https://doi.org/10.12968/jowc.2004.13.6.26625>
134. Priya, S. G., Jungvid, H., & Kumar, A. (2008). Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(1), 105–118. <https://doi.org/10.1089/teb.2007.0318>
135. Koehler, J., Brandl, F. P., & Goepferich, A. M. (2018). Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *European Polymer Journal*, 100, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.046>
136. Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. *Y Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64301>.
137. Chen, Z., Cao, W., Liu, Y., Liu, H., Ru, J., Yin, M., Luo, X., Zhang, Y., & Chen, F. (2024). Hydrogel microspheres encapsulating lysozyme/MXene for photothermally enhanced antibacterial activity and infected wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135527. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135527>
138. Hou, X., Huang, B., Zhou, L., Liu, S., Kong, J., & He, C. (2023). An Amphiphilic Entangled Network Design Towards Ultratough Hydrogels. *Advanced Materials*. <https://doi.org/10.1002/adma.202301532>
139. Shin, Y., Hu, Y., Park, S., & Jung, S. (2023). Novel succinoglycan dialdehyde/aminoethylcarbamoyl- β -cyclodextrin hydrogels for pH-responsive delivery of hydrophobic drugs. *Carbohydrate Polymers*, 305, 120568. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120568>

-
140. Kolour, A. K., Shahrousvand, M., Mohammadi-Rovshandeh, J., Puppi, D., & Farzaneh, D. (2024). Absorbable and biodegradable enzyme-crosslinked gelatin/alginate semi-IPN hydrogel wound dressings containing curcumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134938. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134938>
141. Ma, Y., Wang, Y., Chen, D., su, t., Chang, Q., Huang, W., & Lu, F. (2023). 3D bioprinting of a gradient stiffness gelatin-alginate hydrogel with adipose-derived stem cells for full-thickness skin regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/d2tb02200a>
142. Dash, R., Foston, M., & Ragauskas, A. J. (2013). Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.080>
143. Demirci, G., Niedźwiedź, M. J., Kantor-Malujdy, N., & El Fray, M. (2022). Elastomer–Hydrogel Systems: From Bio-Inspired Interfaces to Medical Applications. *Polymers*, 14(9), 1822. <https://doi.org/10.3390/polym14091822>
144. Abourehab, M. A. S., Rajendran, R. R., Singh, A., Pramanik, S., Shrivastav, P., Ansari, M. J., Manne, R., Amaral, L. S., & Deepak, A. (2022). Alginate as a Promising Biopolymer in Drug Delivery and Wound Healing: A Review of the State-of-the-Art. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9035. <https://doi.org/10.3390/ijms23169035>.
145. Razzak, M. A., Kim, M., & Chung, D. (2016). Elucidation of aqueous interactions between fish gelatin and sodium alginate. *Carbohydrate Polymers*, 148, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.035>
146. Maikovych, O., Nosova, N., Bukartyk, N., Fihurka, N., Ostapiv, D., Samaryk, V., Pasetto, P., & Varvarenko, S. (2023). Gelatin-based hydrogel with antiseptic properties: synthesis and properties. *Applied Nanoscience*. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02956-6>
147. Ghallehmohamadi, M. O., Heydari, I., Jahani, A., & Behniafar, H. (2023). Simultaneously cured diglycidyl ethers of bisphenol A and polyethylene glycol: DSC , TGA, and DMA measurements. *Polymers for Advanced Technologies*. <https://doi.org/10.1002/pat.6108>
148. Cortés-Triviño, E., Valencia, C., Delgado, M., & Franco, J. (2018). Modification of Alkali Lignin with Poly(Ethylene Glycol) Diglycidyl Ether to Be Used as a Thickener in Bio-Lubricant Formulations. *Polymers*, 10(6), 670. <https://doi.org/10.3390/polym10060670>
149. Chuc-Gamboa, M. G., Cámara Perera, C. M., Aguilar Ayala, F. J., Vargas-Coronado, R. F., Cauich-Rodríguez, J. V., Escobar-García, D. M., Sánchez-Vargas, L.

-
- O., Pacheco, N., & San Román del Barrio, J. (2021). Antibacterial Behavior of Chitosan-Sodium Hyaluronate-PEGDE Crosslinked Films. *Applied Sciences*, 11(3), 1267. <https://doi.org/10.3390/app11031267>
150. Das, S., & Pal, S. (2023). Designing Viscoelastic Gelatin-PEG Macroporous Hybrid Hydrogel with Anisotropic Morphology and Mechanical Properties for Tissue Engineering Application. *Gels*, 3(2), 29. <https://doi.org/10.3390/gels3020029>
151. Nishi, C., Nakajima, N., & Ikada, Y. (1995). In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(7), 829–834. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290707>
152. De Boulle, K., Glogau, R., Kono, T., Nathan, M., Tezel, A., Roca-Martinez, J.-X., Paliwal, S., & Stroumpoulis, D. (2013). A Review of the Metabolism of 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether-Crosslinked Hyaluronic Acid Dermal Fillers. *Dermatologic Surgery*, 39(12), 1758–1766. <https://doi.org/10.1111/dsu.12301>
153. Nozière, B., Fache, F., Maxut, A., Fenet, B., Baudouin, A., Fine, L., & Ferronato, C. (2018). The hydrolysis of epoxides catalyzed by inorganic ammonium salts in water: kinetic evidence for hydrogen bond catalysis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(3), 1583–1590. <https://doi.org/10.1039/c7cp06790>
154. Sharp, N., Li, C., Strachan, A., Adams, D., & Pipes, R. B. (2017). Effects of water on epoxy cure kinetics and glass transition temperature utilizing molecular dynamics simulations. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 55(15), 1150–1159. <https://doi.org/10.1002/polb.24357>
155. Sipakov, R., Voloshkina, O., Trofimovich, V., & Bereznitska, J. (2018). Impact of weather factors on the speed of the reaction of formaldehyde formation above motorway overpasses. *DSpace at USEFUL.academy*, (2018), 97–102. <https://doi.org/10.32557/issn.2640-9631/2018-3>
156. Akyalcin, S. (2017). Kinetic study of the hydration of propylene oxide in the presence of heterogeneous catalyst. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 23(4), 573–580. <https://doi.org/10.2298/ciceq170203011a>
157. Lichtenstein, H. J., & Twigg, G. H. (1948). *The hydration of ethylene oxide*. *Transactions of the Faraday Society*, 44, 905. <https://doi.org/10.1039/tf9484400905>
158. Mijovic, J., & Wijaya, J. (1994). Reaction Kinetics of Epoxy/Amine Model Systems. The Effect of Electrophilicity of Amine Molecule. *Macromolecules*, 27(26), 7589–7600. <https://doi.org/10.1021/ma00104a013>
159. Zvetkov, V. L. (2002). A Modified Kinetic Model of the Epoxy-Amine Reaction. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203(3), 467–476. [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(20020201\)203:3%3C467::aid-macp467%3E3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1521-3935(20020201)203:3%3C467::aid-macp467%3E3.0.co;2-q)

-
160. Kurniawan, L., Qiao, G. G., & Zhang, X. (2007). Chemical Modification of Wheat Protein-Based Natural Polymers: Grafting and Cross-Linking Reactions with Poly(ethylene oxide) Diglycidyl Ether and Ethyl Diamine. *Biomacromolecules*, 8(9), 2909–2915. <https://doi.org/10.1021/bm0703719>
161. Parhi, R. (2017). Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(4), 515–530. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.064>
162. 8600079 Gel of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substitute. (1986). *Biotechnology Advances*, 4(2), 359. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(86\)90634-8](https://doi.org/10.1016/0734-9750(86)90634-8)
163. La Gatta, A., Schiraldi, C., Papa, A., D'Agostino, A., Cammarota, M., De Rosa, A., & De Rosa, M. (2013). Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether crosslinking: Toward improvements in composition and performance. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.022>
164. Stropoli, S. J., & Elrod, M. J. (2015). Assessing the Potential for the Reactions of Epoxides with Amines on Secondary Organic Aerosol Particles. *The Journal of Physical Chemistry A*, 119(40), 10181–10189. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.5b07852>
165. Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 469–489. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>
166. Tomihata, K. (1997). Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*, 18(3), 189–195. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(96\)00116-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(96)00116-0)
167. Kiuchi, H., Kai, W., & Inoue, Y. (2007). Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) crosslinked chitosan films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(6), 3823–3830. <https://doi.org/10.1002/app.27546>
168. Azizi, N., & Saidi, M. R. (2005). Highly Chemoselective Addition of Amines to Epoxides in Water. *Organic Letters*, 7(17), 3649–3651. <https://doi.org/10.1021/ol051220q>
169. Bakarich, S. E., Balding, P., Gorkin III, R., Spinks, G. M., & in het Panhuis, M. (2014). Printed ionic-covalent entanglement hydrogels from carrageenan and an epoxy amine. *RSC Adv.*, 4(72), 38088–38092. <https://doi.org/10.1039/c4ra07109c>
170. Zhuravleva, I. Y., Karpova, E. V., Oparina, L. A., Kabos, N., Ksenofontov, A. L., Zhuravleva, A. S., Nichay, N. R., Bogachev-Prokophiev, A. V., Trofimov, B. A., & Karaskov, A. M. (2018). Bioprosthetic xenopericardium preserved with di- and penta-epoxy compounds: molecular cross-linking mechanisms, surface features and

- mechanical properties. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*, 22(3), 56. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2018-3-56-68>
171. Cano-Velázquez, M. S., Yáñez-Limón, J. M., Zárate-Triviño, D. G., González-Cuello, A., & del Real, A. (2019). The effect of PEGDE concentration and temperature on physicochemical and biological properties of chitosan. *Polymers*, 11(11), 1830. <https://doi.org/10.3390/polym11111830>
172. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., & Schubert, U. (2010). Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(36), 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>
173. Лі, В. М., & Беляєва, О. М. (2020). Вивчення особливостей гелеутворення та реологічних процесів гідрогелів на основі желатину для косметології та медицини. *Інтегровані технології та енергозбереження*, 4(59), 5–12. <https://doi.org/10.20998/2078-5364.2020.4.01>
174. Gornall, J. L., & Terentjev, E. M. (2008). Helix–coil transition of gelatin: helical morphology and stability. *Soft Matter*, 4(3), 544. <https://doi.org/10.1039/b713075a>
175. Kessler, J. L., Kang, G., Qin, Z., Kang, H., Whitby, F. G., Cheatham, T. E., Hill, C. P., Li, Y., & Yu, S. M. (2021). Peptoid Residues Make Diverse, Hyperstable Collagen Triple-Helices. *Journal of the American Chemical Society*, 143(29), 10910–10919. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c00708>
176. Rather, J. A., Akhter, N., Ashraf, Q. S., Mir, S. A., Makroo, H. A., Majid, D., Barba, F. J., Khaneghah, A. M., & Dar, B. N. (2022). A comprehensive review on gelatin: Understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 100945. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100945>
177. Xu, J., Li, T.-D., Tang, X.-L., Qiao, C.-D., & Jiang, Q.-W. (2012). Effect of aggregation behavior of gelatin in aqueous solution on the grafting density of gelatin modified with glycidol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.041>
178. Montalbano, G., Toumpaniari, S., Popov, A., Duan, P., Chen, J., Dalgarno, K., Scott, W. E., & Ferreira, A. M. (2018). Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin based hydrogels for soft tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.101>
179. Zagórska-Dziok, M., & Sobczak, M. (2020). Hydrogel-Based Active Substance Release Systems for Cosmetology and Dermatology Application: A Review. *Pharmaceutics*, 12(5), 396. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050396>
180. Dron, I., Nosova, N., Fihurka, N., Bukartyk, N., Nadashkevych, Z., Varvarenko, S., & Samaryk, V. (2022). Investigation of hydrogel sheets based on highly esterified pectin. *Chemistry & Chemical Technology*, 16(2), 220–226. <https://doi.org/10.23939/chcht16.02.220>

-
181. Ahmed, M. A., Al-Kahtani, H. A., Jaswir, I., AbuTarboush, H., & Ismail, E. A. (2020). Extraction and characterization of gelatin from camel skin (potential halal gelatin) and production of gelatin nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1596–1601. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.022>.
182. Ranasinghe, R. A. S. N., Wijesekara, W. L. I., Perera, P. R. D., Senanayake, S. A., Pathmalal, M. M., & Marapana, R. A. U. J. (2020). Functional and Bioactive Properties of Gelatin Extracted from Aquatic Bioresources – A Review. *Food Reviews International*, 1–44. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1747486>
183. Kang, J. I., & Park, K. M. (2021). Advances in gelatin-based hydrogels for wound management. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(6), 1503–1520. <https://doi.org/10.1039/d0tb02582h>
184. Mushtaq, F., Raza, Z. A., Batool, S. R., Zahid, M., Onder, O. C., Rafique, A., & Nazeer, M. A. (2022). Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 601–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>
185. Khamrai, M., Banerjee, S. L., Paul, S., Samanta, S., & Kundu, P. P. (2019). Curcumin entrapped gelatin/ionically modified bacterial cellulose based self-healable hydrogel film: An eco-friendly sustainable synthesis method of wound healing patch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 940–953. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.196>
186. Bertsch, P., Andrée, L., Besheli, N. H., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2022). Colloidal hydrogels made of gelatin nanoparticles exhibit fast stress relaxation at strains relevant for cell activity. *Acta Biomaterialia*, 138, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.053>
187. Masood, F., Makhdoom, M. A., Channa, I. A., Gilani, S. J., Khan, A., Hussain, R., Batool, S. A., Konain, K., Rahman, S. U., Wadood, A., bin Jumah, M. N., & Rehman, M. A. U. (2022). Development and Characterization of Chitosan and Chondroitin Sulfate Based Hydrogels Enriched with Garlic Extract for Potential Wound Healing/Skin Regeneration Applications. *Gels*, 8(10), 676. <https://doi.org/10.3390/gels8100676>
188. Prelipcean, A.-M., Iosageanu, A., Gaspar-Pintiliescu, A., Moldovan, L., Craciunescu, O., Negreanu-Pirjol, T., Negreanu-Pirjol, B., Mitran, R.-A., Marin, M., & D’Amora, U. (2022). Marine and Agro-Industrial By-Products Valorization Intended for Topical Formulations in Wound Healing Applications. *Materials*, 15(10), 3507. <https://doi.org/10.3390/ma15103507>
189. Han, K., Bai, Q., Wu, W., Sun, N., Cui, N., & Lu, T. (2021). Gelatin-based adhesive hydrogel with self-healing, hemostasis, and electrical conductivity.

International Journal of Biological Macromolecules, 183, 2142–2151.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.147>

190. Chen, H., Wu, D., Ma, W., Wu, C., Tian, Y., Wang, S., & Du, M. (2021). Strong fish gelatin hydrogels enhanced by carrageenan and potassium sulfate. *Food Hydrocolloids*, 119, 106841. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106841>

191. Cao, H., Wang, J., Hao, Z., & Zhao, D. (2024). Gelatin-based biomaterials and gelatin as an additive for chronic wound repair. *Frontiers in Pharmacology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1398939>

192. Advancements in Gelatin-Based Wound Dressings: Cross-Linking Techniques, Biocompatibility, and Biodegradability for Enhanced Angiogenesis and Healing. (2024). *Journal of Angiotherapy*, 8(11). <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.81110011>

193. Hadjipanayi, E., Mudera, V., & Brown, R. A. (2009). Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(2), 77–84. <https://doi.org/10.1002/term.136>

194. Branco da Cunha, C., Klumpers, D. D., Li, W. A., Koshy, S. T., Weaver, J. C., Chaudhuri, O., Granja, P. L., & Mooney, D. J. (2014). Influence of the stiffness of three-dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology. *Biomaterials*, 35(32), 8927–8936. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.047>

195. Karamichos, D., Brown, R. A., & Mudera, V. (2007). Collagen stiffness regulates cellular contraction and matrix remodeling gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A(3), 887–894. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31423>

196. Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M., & Berghmans, H. (2000). Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*, 1(1), 31–38. <https://doi.org/10.1021/bm990017d>

197. Grytsenko, O., Pukach, P., Suberlyak, O., Shakhovska, N., & Karovič Jr., V. (2021). Usage of Mathematical Modeling and Optimization in Development of Hydrogel Medical Dressings Production. *Electronics*, 10(5), 620. <https://doi.org/10.3390/electronics10050620>

198. Samaryk, V., Varvarenko, S., Nosova, N., Fihurka, N., Musyanovych, A., Landfester, K., Popadyuk, N., & Voronov, S. (2017). Optical properties of hydrogels filled with dispersed nanoparticles. *Chemistry & Chemical Technology*, 11(4), 449–453. <https://doi.org/10.23939/chcht11.04.449>

199. Manon, M., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., & Mignon, A. (2022). Commercial wound dressings for the treatment of exuding wounds: an in-depth physico-chemical comparative study. *Burns and Trauma*, 10. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkac024>

-
200. Maikovych, O. V., Nosova, N. G., Yakoviv, M. V., Dron, I. A., Stasiuk, A. V., Samaryk, V. Y., Varvarenko, S. M., & Voronov, S. A. (2021). Composite materials based on polyacrylamide and gelatin reinforced with polypropylene microfiber. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*, (1), 45–54. <https://doi.org/10.32434/0321-4095-2021-134-1-45-54>
201. Wiegand, C., Hippler, U.-C., Elsner, P., & Tittelbach, J. (2015). Clinical efficacy of dressings for treatment of heavily exuding chronic wounds. *Chronic Wound Care Management and Research*, 101. <https://doi.org/10.2147/cwcmr.s60315>
202. Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., Boccafocchi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(10). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>
203. Xin, F., Sui, M., Liu, X., Zhao, C., & Yu, Y. (2019). Biodegradable poly(N-isopropylacrylamide-co-N-maleylgelatin) hydrogels with adjustable swelling behavior. *Colloid and Polymer Science* <https://doi.org/10.1007/s00396-019-04498-2>
204. Işıklan, N., Geyik, G., & Güncüm, E. (2024). Alginate-based bio-nanocomposite reinforced with poly(2-hydroxypropyl methacrylamide) and magnetite graphene oxide for delivery of etoposide and photothermal therapy. *Materials Today Chemistry*, 41, 102323. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2024.102323>
205. Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H., & Lee, S.-H. (2020). Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(2), 164-180. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>
206. Scott, G. (Ред.). (2002). *Degradable Polymers*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1217-0>
207. Campiglio, C. E., Contessi Negrini, N., Farè, S., & Draghi, L. (2019). Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials*, 12(15), 2476. <https://doi.org/10.3390/ma12152476>
208. Vargas, G., Acevedo, J. L., López, J., & Romero, J. (2008). Study of cross-linking of gelatin by ethylene glycol diglycidyl ether. *Materials Letters*, 62(21-22), 3656–3658. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.04.020>
209. Carvalho, D. N., Gonçalves, C., Oliveira, J. M., Williams, D. S., Mearns-Spragg, A., Reis, R. L., & Silva, T. H. (2021). Innovative methodology for marine collagen–chitosan–fucoidan hydrogels production, tailoring rheological properties towards biomedical application. *Green Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/d1gc02223g>
210. J. Karvinen, T. O. Ihalainen, M. T. Calejo, I. Jonkkari and M. Kellomaki, Characterization of the microstructure of hydrazone crosslinked polysaccharide-based

-
- hydrogels through rheological and diffusion studies, *Mater. Sci. Eng., C*, 2019, 94, 1056–1066. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.048>
211. Chai, Q., Jiao, Y., & Yu, X. (2017). Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, 3(1), 6. <https://doi.org/10.3390/gels3010006>
212. Liu, B., & Chen, K. (2024). Advances in Hydrogel-Based Drug Delivery Systems. *Gels*, 10(4), 262. <https://doi.org/10.3390/gels10040262>
213. Weiss, J. V., Salazar, L. G., & Schlenk, M. (2021). Influence of gelatin modification on the structure formation and thermal stability of hydrogels. *Scientific Reports*, 11, 2724. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82393-z>
214. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., & Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22(8), 763–768. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00236-2)
215. Michon, C., Cuvelier, G., Relkin, P., & Launay, B. (1997). Influence of thermal history on the stability of gelatin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(4), 259–264. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(97\)00024-x](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(97)00024-x)
216. Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., & Boccafroschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(10). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>
217. Suvarnapathaki, S., Nguyen, M. A., Wu, X., Nukavarapu, S. P., & Camci-Unal, G. (2019). Synthesis and characterization of photocrosslinkable hydrogels from bovine skin gelatin. *RSC Advances*, 9(23), 13016–13025. <https://doi.org/10.1039/c9ra00655a>
218. Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993–2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
219. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., & Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18(11), 1345–1360. <https://doi.org/10.1002/adma.200501612>
220. Dragan, E. S. (2014). Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal*, 243, 572–590. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.065>
221. Guvendiren, M., Lu, H. D., & Burdick, J. A. (2021). Hydrogels for therapeutic delivery: Current developments and future directions. *Biomaterials*, 268, 120557. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120557>

-
222. Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
223. I-Shenawy, A. A., Elsayed, M. M. A., Atwa, G. M. K., Abourehab, M. A. S., Mohamed, M. S., Ghoneim, M. M., Mahmoud, R. A., Sabry, S. A., Anwar, W., El-Sherbiny, M., Hassan, Y. A., Belal, A., & Ramadan, A. E. h. (2023). Anti-Tumor Activity of Orally Administered Gefitinib-Loaded Nanosized Cubosomes against Colon Cancer. *Pharmaceutics*, 15(2), 680. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020680>
224. Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328–343. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.004>
225. Paradee, N., Sirivat, A., Niamlang, S., & Prissanaroon-Ouajai, W. (2012). Effects of crosslinking ratio, model drugs, and electric field strength on electrically controlled release for alginate-based hydrogel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(4), 999–1010. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4571-0>
226. Minisy, I. M., Salahuddin, N. A., & Ayad, M. M. (2020). In vitro release study of ketoprofen-loaded chitosan/polyaniline nanofibers. *Polymer Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03385-z>
227. Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2011). Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>
228. Mercado, P., & Weinberg, G. L. (2011). Local Anesthetic Systemic Toxicity: Prevention and Treatment. *Anesthesiology Clinics*, 29(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2011.04.007>
229. Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine--pharmacobiological activity and application. *European review for medical and pharmacological sciences*, 19(7), 1321–1326
230. Hao, W., Wang, Y., Xi, Y., Yang, Z., Zhang, H., & Ge, X. (2022). Activity of chlorhexidine acetate in combination with fluconazole against suspensions and biofilms of *Candida auris*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 28(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.09.018>
231. Mulik, J., Sukumaran, S., & Srinivas, T. (2020). Factors structuring spatio-temporal dynamics of macrobenthic communities of three differently modified tropical estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110767, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110767>
232. Cooke, M. E., Jones, S. W., ter Horst, B., Moimen, N., Snow, M., Chouhan, G., Hill, L. J., Esmali, M., Moakes, R. J. A., Holton, J., Nandra, R., ... See all authors. (2018). Advanced materials structuring of hydrogels across multiple length scales for

- biomedical applications. *Advanced Materials*, 30(13), 1705013. <https://doi.org/10.1002/adma.201705013>
233. You, G., Niu, G., Long, H., Zhang, C., & Liu, X. (2020). Elucidation of interactions between gelatin aggregates and hsian-tsao gum in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 319, 126532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126532>
234. Lin, L., Xie, J., Liu, S., Shen, M., Tang, W., & Xie, M. (2017). Polysaccharide from *Mesona chinensis*: Extraction optimization, physicochemical characterizations and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.040>
235. Meka, V. S., Sing, M. K., Pichika, M. R., Nali, S. R., Kolapalli, V. R., & Kesharwani, P. A. (2017). A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discovery Today*, 22(11), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.007>
236. Grover, C. N., Cameron, R. E., & Best, S. M. (2012). Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.028>
237. Wang, C.-S., Virgilio, N., Wood-Adams, P. M., & Heuzey, M.-C. (2018). A gelation mechanism for gelatin/polysaccharide aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 79, 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.016>
238. Lin, D., Xiao, L., Wen, Y., Qin, W., Wu, D., Chen, H., Zhang, Q., & Zhang, Q. (2021). Comparison of apple polyphenol-gelatin binary complex and apple polyphenol-gelatin-pectin ternary complex: Antioxidant and structural characterization. *LWT*, 148, 111740. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111740>
239. Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11), 3279–3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>
240. Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
241. Maikovich, O., Pasetto, P., Nosova, N., Kudina, O., Ostapiv, D., Samaryk, V., & Varvarenko, S. (2025). Functional Properties of Gelatin–Alginate Hydrogels for Use in Chronic Wound Healing Applications. *Gels*, 11(3), 174. <https://doi.org/10.3390/gels11030174>.
242. Oyen M.L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews*. 2013. Vol.59. Iss. 1. P.44–59

-
243. Ning X, Huang J, A Y, Yuan N, Chen C, Lin D. Research Advances in Mechanical Properties and Applications of Dual Network Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(24):15757. <https://doi.org/10.3390/ijms232415757>
244. Khanlari, A. (2015). *Engineering hydrogels to tune mechanical properties* [Doctoral dissertation, University of Toronto]. TSpace Repository. <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/69481>
245. Dardelle, G., Subramaniam, A., & Normand, V. (2011). Determination of covalent cross-linker efficacy of gelatin strands using calorimetric analyses of the gel state. *Soft Matter*, 7(7), 3315. <https://doi.org/10.1039/c0sm01374a>
246. Rosellini, E., Cristallini, C., Barbani, N., Vozzi, G., & Giusti, P. (2009). Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(2), 447–453. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32216>
247. Teixeira, M. O., Marinho, E., Silva, C., Antunes, J. C., & Felgueiras, H. P. (2023). Pullulan hydrogels as drug release platforms in biomedicine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105066. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105066>
248. Stoica, A.E.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M. Hydrogel Dressings for the Treatment of Burn Wounds: An Up-To-Date Overview. *Materials* 2020, 13, 2853. <https://doi.org/10.3390/ma13122853>
249. Avila-Rodríguez, M., Meléndez-Martínez, D., Licona-Cassani, C., Aguilar-Yañez, J., Benavides, J., & Sánchez, M. (2020). Practical context of enzymatic treatment for wound healing: A secreted protease approach (Review). *Biomedical Reports*, 13(1), 3–14. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1300>
250. Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., & Car, J. (2016). Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0329-y>.
251. Goodarzi, H., Jadidi, K., Pourmotabed, S., Sharifi, E., & Aghamollaei, H. (2019). Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.125>
252. Rizwan, M., Peh, G. S. L., Ang, H.-P., Lwin, N. C., Adnan, K., Mehta, J. S., Tan, W. S., & Yim, E. K. F. (2017). Sequentially-crosslinked bioactive hydrogels as nano-patterned substrates with customizable stiffness and degradation for corneal tissue engineering applications. *Biomaterials*, 120, 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.12.026>

-
253. Naomi, R., Bahari, H., Ridzuan, P. M., & Othman, F. (2021). Natural-Based Biomaterial for Skin Wound Healing (Gelatin vs. Collagen): Expert Review. *Polymers*, 13(14), 2319. <https://doi.org/10.3390/polym13142319>
254. Applications and Perspectives of Hydrogels in Veterinary Medicine. (2024). *The Pakistan Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2024.248>
255. Kesharwani, P., Bisht, A., Alexander, A., Dave, V., & Sharma, S. (2021). Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102914. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102914>
256. Jonidi Shariatzadeh, F., Currie, S., Logsetty, S., Spiwak, R., & Liu, S. (2025). Enhancing wound healing and minimizing scarring: A comprehensive review of nanofiber technology in wound dressings. *Progress in Materials Science*, 147, 101350. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2024.101350>
257. S M, A., Mani, A., Ghosh, S., & Rajaram, K. (2024). Phage embedded gelatin, alginate and gelatin/alginate-starch based hydrogels for topical bactericidal applications against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 101, 101272. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2024.101272>
258. Alberts, A., Tudorache, D.-I., Niculescu, A.-G., & Grumezescu, A. M. (2025). Advancements in wound dressing materials: Highlighting recent progress in hydrogels, foams, and antimicrobial dressings. *Gels*, 11(2), 123. <https://doi.org/10.3390/gels11020123>
259. Li, Y., Hao, D., Feng, G., & Xu, F.-J. (2023). A hydrogel wound dressing ideally designed for chronic wound care. *Matter*, 6(3), 1060–1062. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2023.01.008>
260. Sedighi, O., Bednarke, B., Sherriff, H., & Doiron, A. L. (2024). Nanoparticle-based strategies for managing biofilm infections in wounds: A comprehensive review. *ACS Omega*, 9(30), 27853–27871. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02785>
261. Whitaker, B., Barnhard, J. A., Webb, K. R., Levine, D., Green, M. M., & Vieira, M. R. (2025). The concurrent use of 2.5% polyacrylamide hydrogel and betamethasone esters for intra-articular injection is well tolerated in 10 healthy horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 263(4), 460–467. <https://doi.org/10.2460/javma.24.10.0651>
262. Moreira, T. D., Martins, V. B., da Silva Júnior, A. H., Sayer, C., de Araújo, P. H. H., & Immich, A. P. S. (2024). New insights into biomaterials for wound dressings and care: Challenges and trends. *Progress in Organic Coatings*, 187, 108118. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2024.108118>

-
263. Kuddushi, M., Shah, A. A., Ayranci, C., & Zhang, X. (2023). Recent advances in novel materials and techniques for developing transparent wound dressings. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(30), 6201–6224. <https://doi.org/10.1039/D3TB00851H>
264. Chen, S.-Q., Liao, Q., Meldrum, O. W., Guo, L., Wang, K., Zhang, S., Liu, Y., Chen, X., Zhu, J., & Li, L. (2023). Mechanical properties and wound healing potential of bacterial cellulose-xyloglucan-dextran hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 321, 121268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121268>
265. Feng, Y., Qin, S., Li, H., Yang, Y., Zheng, Y., Liu, H., Yap, W. Y., Zhou, X., & Wen, J. (2023). Composite hydrogel dressings with enhanced mechanical properties and anti-inflammatory ability for effectively promoting wound repair. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 5183–5195. <https://doi.org/10.2147/IJN.S411478>
266. Jang, J., Lee, J., Seol, Y.-J., & Jeong, Y. H. (2013). Improving mechanical properties of alginate hydrogel by reinforcement with ethanol treated polycaprolactone nanofibers. *Composites Part B: Engineering*, 45, 1216–1221. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.09.059>
267. Yang, G., Zhang, Z., Liu, K., et al. (2022). A cellulose nanofibril-reinforced hydrogel with robust mechanical, self-healing, pH-responsive and antibacterial characteristics for wound dressing applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 312. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01523-5>
268. Samaryk, V., Voronov, A., Tarnavchyk, I., Varvarenko, S., Nosova, N., Budishevskaya, O., Kohut, A., & Voronov, S. (2012). Formation of coatings with tailored properties on polyperoxide-modified polymeric surfaces. *Progress in Organic Coatings*, 74(4), 687–696. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2012.01.012>
269. Koschwanez, H. E., & Reichert, W. M. (2007). In vitro, in vivo and post explantation testing of glucose-detecting biosensors: Current methods and recommendations. *Biomaterials*, 28(25), 3687–3703. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.024>
270. Варваренко, С. М., Самарик, В. Я., Воронов, А. С., Носова, Н. Г., Тарнавчик, І. Т., Фігурка, Н. В., Дронь, І. А., Ференс, М. В., Нагорняк, М. І., Тарас, Р. С., & Воронов, С. А. (2015). Спосіб одержання кополієстерів двоосновних α -амінокислот та полієфірів гліколів. Патент на корисну модель України № 98749. Опубліковано 12.05.2015, бюл. № 9/2015