

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
Катедра Фармацевтична и приложна органична химия

Констанс Емилова Русева

**Интелигентни полицивитерйонни материали с потенциално
приложение като превръзки за хронични рани**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“ по професионално направление 4.2. Химически науки
(Полимери)

Научни ръководители: доц. д-р. Елена Василева
проф. дхн Антон Апостолов

София, 2019 г.

Дисертацията съдържа 105 страници, в които са включени 24 схеми, 38 фигури, 5 таблици и 99 цитирани източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедрения съвет на катедра Фармацевтична и приложна органична химия към Факултета по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 9.12.2019 г.

Констанс Русева е била задочен докторант към катедра Фармацевтична и приложна органична химия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 28.02.2020 г. от 9.00 ч. в заседателната зала на Факултет по химия и фармация при СУ.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Отдел докторанти и СДК на Факултет по химия и фармация при СУ – София, бул. Джеймс Баучер 1, ет. 1.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Констанс Емилова Русева

**Интелигентни полицивтерийонни материали с потенциално приложение
като превръзки за хронични рани**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“ по професионално направление 4.2. Химически науки
(Полимери)

**Научни ръководители: доц. д-р. Елена Василева
проф. дхн Антон Апостолов**

Председател на научното жури: доц. д-р Лъчезар Костадинов Христов

Научно жури:

доц. д-р Лъчезар Костадинов Христов
проф. дхн Антон Атанасов Апостолов
проф. дхн Георги Стефанов Георгиев
проф. дхн Петър Димитров Петров
доц. д-р Виолета Атанасова Митова

Използвани съкращения:

ПЦ - полицвитерйон

ПЕГДА - поли(етилен гликол) диакрилат

ПСБ – полисулфобетаин

ГКТР – горна критична температура на разтваряне

ДСК – диференциална сканираща калориметрия

ЕДТА - етилендиаминтетраоцетна киселина

0.1 ПСБ – полисулфобетаин, съдържащ 0.1 mol. % ПЕГДА

0.5 ПСБ – полисулфобетаин, съдържащ 0.5 mol. % ПЕГДА

1 ПСБ – полисулфобетаин, съдържащ 1 mol. % ПЕГДА

2 ПСБ – полисулфобетаин, съдържащ 2 mol. % ПЕГДА

3 ПСБ – полисулфобетаин, съдържащ 3 mol. % ПЕГДА

ПКБ – поликарбоксібетаин

4ПКБ – поликарбоксібетаин, съдържащ 4 mol.% ПЕГДА

5ПКБ – поликарбоксібетаин, съдържащ 5 mol.% ПЕГДА

6ПКБ – поликарбоксібетаин, съдържащ 6 mol.% ПЕГДА

7ПКБ – поликарбоксібетаин, съдържащ 7 mol.% ПЕГДА

МПО - миелопероксидаза

РСН - равновесна степен на набъбване

СН – степен на набъбване

МПО – миелопероксидаза

ВPM – взаимнопроникваща полимерна мрежа

G` - модул на съхранение

G`` - модул на загуби

Биологични термини:

in vitro изследване - изследване, което се извършва с небιологичен материал

ex vivo изследване - изследване, което се извършва с биологичен материал от организма във външна среда

in vivo изследване - изследване, което се провежда в живи организми

L929 - миши фибробласти от подкожна съединителна тъкан

VJ-5ta – човешки фибробластни клетки

фибробласти – клетки на съединителната тъкан

фиброцит – силно диференцирана клетка, изграждаща фибробласта, която е неспособна да се дели

макрофаг – клетка, извършваща фагоцитоза (обезвреждане на патогени)

фиброза - патологичен процес, който се изразява в повишено разрастване на съединителна (фиброзна) тъкан, нарушаваща структурата на тъканите и органите

колагеназа – ензим, разграждащ пептидните връзки в колагена

миелопероксидаза (МПО) - ензим, произвеждан от левкоцити (бели кръвни клетки), който генерира реактивни кислородни видове с цел унищожаване на чужди частици

лимфоцит – клетка, която осъществява вродения имунитет на организма

плазмоцит – клетка, която произвежда антитела и участват в изграждането на имунната система.

моноцит – сравнително голяма клетка, която извършва фагоцитоза. Моноцитите съставят около 2-8% от общия брой на левкоцитите.

ексудат – излята при възпаление от стените на малките съдове течност

log CFU (colony-forming unit) – брой жизнеспособни бактерии в единица обем

Subtilisin DY – протеолитичен ензим, разграждащ протеини

I. Увод

При нарушаване целостта на кожата и формирането на рана, една от първите мерки, които се вземат е поставянето на превръзка върху раната. От една страна, превръзката изпълнява ролята на защитна бариера, като предпазва организма от навлизането на външни патогени, а от друга страна тя участва в поддържането на нормалната физиологична среда, като по този начин подпомага естествения процес на заздравяване на раната. Превръзките за рани могат да бъдат обикновени текстилни превръзки, като те имат само бариерни (защитни) функции. Напоследък, обаче, в практиката все повече навлизат функционалните превръзки за рани – те не само защитават организма от патогени, но и внасят допълнителна функционалност, която има за цел да осигури и/или ускори процеса на заздравяване. Изборът на превръзка за рана зависи от вида и състоянието на самата рана, тъй като раните имат различна патофизиология и лечението им изисква индивидуален подход. Раните, които не проявяват склонност към заздравяване в рамките на по-дълъг период от време (от няколко седмици до години), се определят като хронични. Хроничните рани могат да се получат при неподходящо първично лечение или продължаваща инфекция на една акутна рана. В повечето случаи, хроничните рани са последния етап на прогресивна тъканна деструкция, предизвикана от венозни, артериални или метаболитни нарушения, тумори и др. Тяхното лечение е трудно, отнема ресурс, както човешки, така и финансов, и представлява истинско предизвикателство. Освен това, то изисква комплексен подход, ясно дефиниране на патофизиологията на процеса и индивидуална терапия.

„Интелигентните“ хидрогелни превръзки за рани все още са в етап на навлизане в областта на лечение на хронични рани, като те имат интересни свойства, които биха могли да доведат до ползи в лечението на хроничните рани. От гледна точка на тяхното „интелигентно“ поведение те могат да послужат като:

- „сензори“, които индикират настъпващи промени в раната
- системи, които едновременно улавят настъпващите промени в раната и реагират по адекватен начин на тях
- системи, които позволяват пасивен транспорт на вещества и молекули.

Интелигентното поведение на цвитерйонните полимери е обект на интерес от страна на учените в последните години, тъй като освен „традиционните“ чувствителости към промени в температурата и рН, цвитерйонните полимери притежават и сол-чувствителост. Така, тези полимери предоставят уникална възможност за разработване на материали, които могат да откликват едновременно на промени в три „биологични“ стимула. Именно тази възможност, неизследвана и неизползвана досега в литературата, е в основата на настоящата дисертация, като тази работа едновременно демонстрира и експлоатира тази уникална черта на полицивитерйоните чрез изследване на техния потенциал като превръзки за хронични рани.

Настоящата дисертация има за цел да демонстрира потенциала на интелигентни цвитерйонни полимерни мрежи на основата на поли(сулфобетаин меткарилат), поли(карбоксибетаин меткарилат) и тяхната взаимнопроникваща полимерна мрежа (ВПМ) като материали за лечение на хронични рани. Изборът на конкретните полимери бе направен с цел те да придадат на новополучените материали подходящи свойства, свързани със способността им да реагират адекватно на динамично променящите се физиологични параметри в раната, като едновременно с това запазват своята биосъвместимост. От друга страна, концепцията за полимерна мрежа позволява да бъде осъществяван контрол върху тяхната гъстота, която играе важна роля в процесите, свързани с почистване на раните и пасивния транспорт на вещества.

Задачите, които бяха поставени с оглед постигането на целта са:

1. Да се синтезират единични мрежи от ПСБ и ПКБ
2. Да се охарактеризират ПСБ и ПКБ единични мрежи
 - физико-механични свойства на ПСБ и ПКБ мрежи
 - интелигентно поведение на ПСБ и ПКБ мрежи (температурна, рН и сол- чувствителност)
 - биологично отнасяне на ПСБ и ПКБ мрежи (инхибираща способност спрямо миелопероксидаза и колагеназа, антибиофилмобразуваща способност, цитотоксичност и *in vivo* биосъвместимост)
 - натоварване на алкална протеаза *Subtilisin DY* в ПСБ и ПСК хидрогелове и изследване на нейната активност
4. Да се синтезира взаимнопроникващи полимерни мрежи (ВПМ) от ПСБ и ПКБ
5. Да се изследват и сравнят свойствата на ВПМ ПКБ/ПСБ с тези на единичните ПСБ и ПКБ мрежи
 - интелигентно поведение на (температурна, рН и сол-чувствителност)
 - биологичното отнасяне (антибиофилмобразуваща способност, цитотоксичност)

II. Резултати и дискусия

II.1. Синтез на единични мрежи от ПСБ и ПКБ

Мрежи от ПСБ бяха получени чрез свободна радикалова полимеризация на сулфобетаин метакрилат (СБМА, 1М воден разтвор) с инициатор $K_2S_2O_8$ (0.1 mol.% спрямо мономера) и в присъствието на омрежващ агент поли(етилен гликол) диакрилат (ПЕГДА) ($M_n \sim 575$), чиито концентрации бяха варираны (Таблица 1). Реакцията на полимеризация протече при температура $60^\circ C$ в рамките на 6 h, давайки крайните полимерни мрежи (Таблица 1).

Таблица 1. Състав на ПСБ мрежи, получени при използването на различна концентрация на омрежващ агент ПЕГДА.

означение на ПСБ мрежа	ПЕГДА (mol.%)
0.1ПСБ	0.1
0.5ПСБ	0.5
1ПСБ	1
2ПСБ	2
3ПСБ	3

ПКБ мрежи бяха получени по аналогичен начин (Таблица 2). Накратко, към 1 М разтвор на КБМА в смесен разтворител етиленгликол/етанол/ H_2O (обемно съотношение 3:1:1) бе добавено различно количество от омрежващия агент ПЕГДА (Таблица 2). Към получените разтвори бяха прибавени 0.665 mol.% $Na_2S_2O_5$ и 1.445 mol.% $(NH_4)_2S_2O_8$, които иницират радикаловата полимеризация на КБМА. Полимеризацията на КБМА протече при $60^\circ C$ за 15 h.

Таблица 2. Състав на ПКБ мрежи, получени при използването на различна концентрация на омрежващ агент ПЕГДА.

Обозначение на проба	ПЕГДА (mol. %)
4ПКБ	4
5ПКБ	5
6ПКБ	6
7ПКБ	7

Синтезираните ПСБ и ПКБ мрежи бяха пречистени от нереагиралите изходни вещества чрез измиване в дейонизирана вода. За целта промивните води бяха сменяни веднъж дневно и проверявани с УВ спектрофотометър.

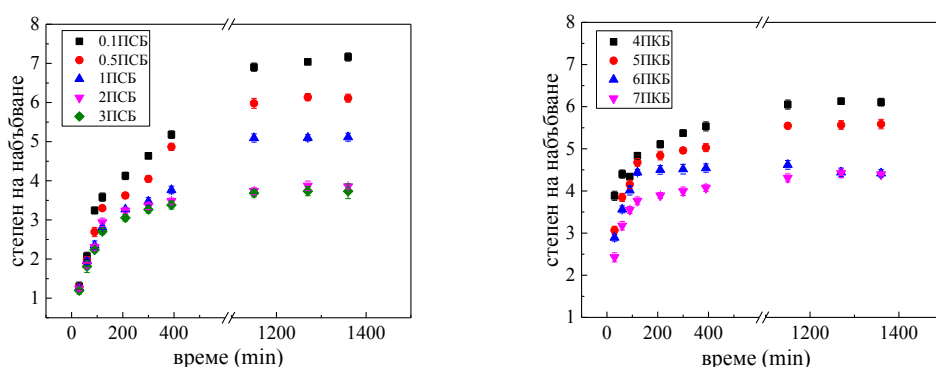
II.2. Изследване на потенциала на ПСБ и ПКБ хидрогелове като материали за лечение на хронични рани

II.2.1. Кинетика на набъбване на единични мрежи от ПСБ и ПКБ

Набъбването и свиването на полимерните хидрогелове е тяхна важна отличителна характеристика. По-високото водно съдържание в полимерната матрица обуславя по-високи нива на пропускливост и по-добра

биосъвместимост. Концентрацията на омрежващия агент играе ключова роля върху способността на хидрогелите да набъбват, тъй като тя определя гъстотата на полимерната мрежа. Колкото по-ниска е концентрацията на омрежващия агент при получаване на полимерната мрежа, толкова по-рехова е тя и съответно притежава по-голям потенциал да абсорбира течост, т.е. набъбва повече.

За да проверим качествено как концентрацията на омрежващия агент влияе върху гъстотата на ПСБ и ПКБ мрежи, изследвахме тяхната кинетика на набъбване във вода при стайна температура (Фиг. 1А и 1Б). И при двата типа полимерни мрежи се наблюдава бързо нарастване на тяхната СН през първите 3 часа от началото на експеримента. В случая на ПСБ (Фиг. 1А), след 6-тия час способността на мрежите да набъбват постепенно намалява. 16 часа след началото на експеримента, всички ПСБ хидрогелове достигат своята РСН.



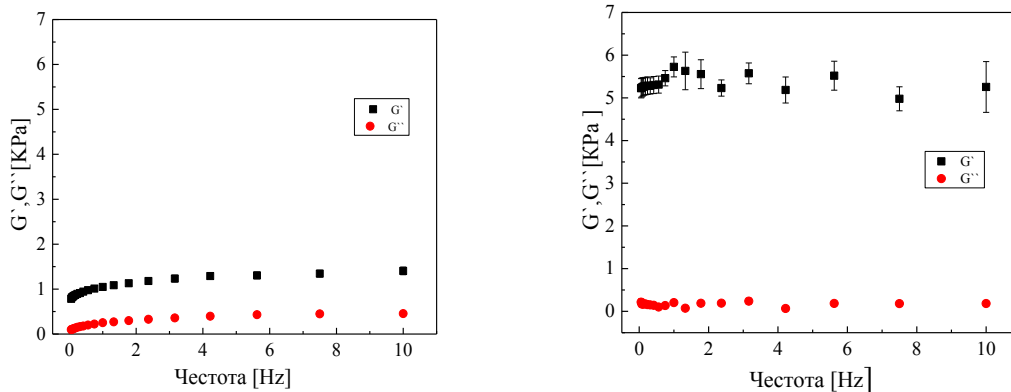
Фигура 1. Кинетика на набъбване на: (А) ПСБ и (Б) ПКБ мрежи във вода

Поведението на ПКБ мрежите е сходно с това на ПСБ, с тази разлика, че те достигат своята РСН за по-кратко време. Най-слабо омрежените хидрогелове (4ПКБ и 5ПКБ) достигат своята максимална способност да набъбват за ~ 8 часа, докато хидрогелите с най-гъста мрежа (6ПКБ и 7ПКБ) - за ~2 часа (Фиг. 1Б). Причина за това е по-високата концентрация на омрежващия агент ПЕГДА, използвана за получаване на ПКБ мрежите в сравнение с ПСБ. Опитите да се получат стабилни ПКБ мрежи, които запазват целостта си при набъбване, при по-ниски от 4 mol.% ПЕГДА се увенчаха с неуспех.

За ПСБ и ПКБ мрежите, способността им да набъбват във вода намалява плавно с увеличаване концентрацията на ПЕГДА (Фиг. 1А и Б). Следователно, СН на ПСБ и ПКБ може да бъде успешно контролирана чрез количеството на използвания омрежващ агент.

II.2.2. Реология на ПСБ и ПКБ хидрогелове в тяхната РСН

След достигане на своята РСН, ПСБ и ПКБ хидрогелите запазват стабилни формата и размера си. Това се вижда от извършените реологични измервания (Фиг. 2 и 3), а именно - модулът на съхранение G' е с поне един порядък по-голям от модула на загубите G'' , т.е. $G'/G'' > 10$, за всички ПЦ мрежи. Освен това, модулът на срязване не зависи от честотата в диапазона от 1 до 10 Hz (Фиг. 3).

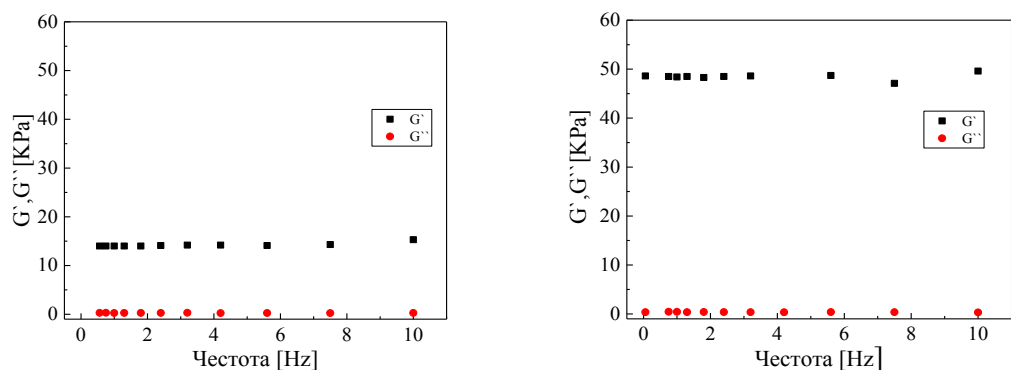


0.1ПСБ

3ПСБ

Фигура 2. Модул на съхранение (G') и модул на загуби (G''), измерени при напрежение на срязване за ПСБ хидрогелове в тяхната РСН.

Едновременната проява на тези две свойства потвърждава, че ПСБ и ПКБ хидрогелите притежават необходимата механична здравина, за да бъдат директно прилагани върху раната. Това ги прави удобни материали за приложение като превръзки за рани.



4ПКБ

7ПКБ

Фигура 3. Модул на съхранение (G') и модул на загубите (G''), измерени при напрежение на срязване за ПКБ хидрогелове в тяхната РСН.

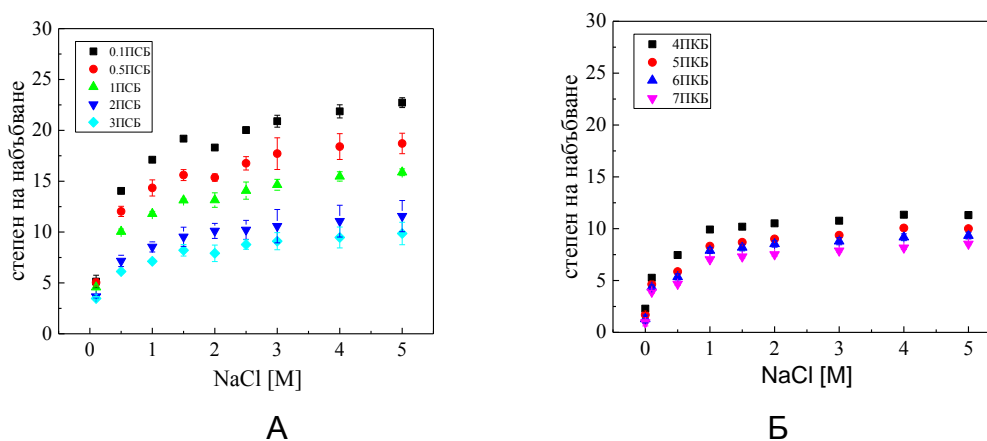
Ефектът, който гъстотата на омрежване оказва върху механичните свойства се вижда добре тук: колкото по-висока е концентрацията на ПЕГДА при получаване на съответната ПЦ мрежа толкова по-висок е G' . Следователно, гъстотата на омрежване и при двата типа ПЦ хидрогелове влияе както на способността им да набъбват, така и върху механичната им стабилност. От друга страна, степента на омрежване се очаква да оказва съществено влияние върху други важни свойства на ПЦ хидрогелите като например тяхната плътност, порьозност и клетъчна адхезия.

II.2.3. Сол-чувствителност на ПСБ и ПКБ мрежи

Безспорно най-голямото предимство на ПЦ хидрогелите като кандидати за превръзки за рани е способността им да набъбват повече в солеви разтвори, отколкото в чиста вода. Така, те проявяват т. нар. антиполиелектролитен ефект. В дестилирана вода макромолекулите на ПСБ са силно нагънати поради

образуването на т. нар. цип клъстери. Добавянето на нискомолекулен електролит към водния разтвор на ПЦ екранира дипол-диполните взаимодействия в тези клъстери и води до тяхното разрушаване. Тъй като цип клъстерите играят ролята на физична мрежа, тяхното разрушаване води до освобождаване на макромолекулите, увеличаване на тяхната подвижност и оттам определя по-високата СН на ПЦ в солеви разтвори.

На Фиг. 4 е представена зависимостта на СН на двата типа ПЦ мрежи като функция от концентрацията на нискомолекуления електролит (в случая е използван NaCl) във водните разтвори, в които са набъбвани ПЦ мрежи. Получените зависимости за ПСБ и ПКБ илюстрират много добре антиполиелектролитния ефект на двата типа ПЦ хидрогелове. В резултат на увеличаване на концентрацията на NaCl се разрушават все повече и повече цип клъстерите, характерни за ПЦ мрежи, а това води до увеличаване на степента на набъбване.



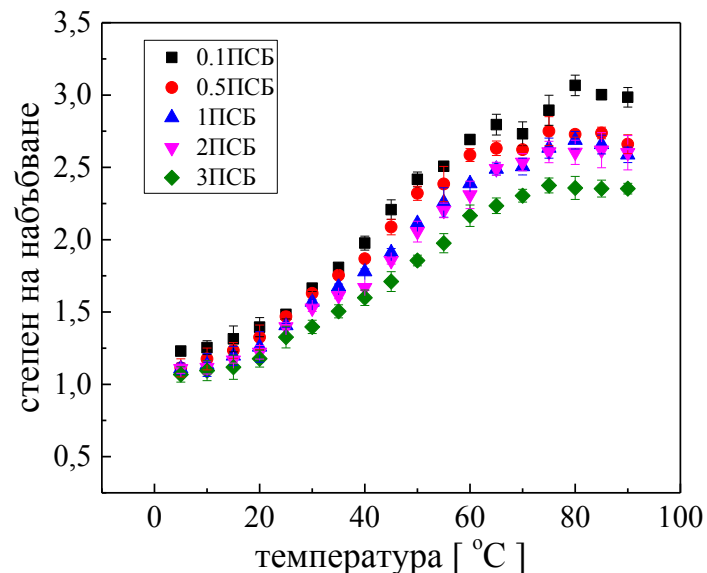
Фигура 4. Зависимост на степента на набъбване на (А) ПСБ и (Б) ПКБ мрежи от концентрацията на NaCl.

При по-високи концентрации на NaCl, СН достига плато, определено от факта, че ПЦ имат и химични напречни връзки, които ограничават увеличаването на обема на двете полимерни мрежи. Използваните концентрации на NaCl в този експеримент надхвърлят многократно солевата концентрация в тъканните течности (0.15M). Те са използвани за да представят пълния потенциал на двете ПЦ мрежи по отношение на тяхното антиполиелектролитно поведение. Наблюдаваният антиполиелектролитен ефект, обаче, разкрива потенциала на двете ПЦ мрежи като превръзки за лечение на силно ексудирани рани, които са предизвикателство за използването в момента превръзки за рани. Последните са обикновено на базата на неутрални полимери или полиелектролити и затова не са способни да абсорбират отделящия се обилно ексудат.

II.2.4. Температурна чувствителност на ПСБ мрежи

Полисулфобетаините са термочувствителни полимери, проявяващи горна критична температура на разтваряне (ГКТР). Тяхната термочувствителност, аналогично на сол-чувствителността им е определена от способността на страничните цвитерйонни групи да формират цип-кълстери. Тяхната

температурна чувствителност зависи от гъстотата на химичната им мрежа, доколкото последната възпрепятства образуването на връзките на фичината им мрежа, а именно цип клъстерите. Ето защо, за очакване бе, че различната гъстота на химичната мрежа в ПСБ, разработени в настоящата дисертация, ще повлияе върху тяхната температурна чувствителност. На Фиг. 5 е показана температурната чувствителност на степента на набъбване на ПСБ мрежи с различна гъстота на мрежата във вода.



Фигура 5. Степен на набъбване на ПСБ мрежи във вода като функция от температурата.

СН не се променя при температури от 3 до 20°C, но след 20°C започва плавно да се повишава. В температурния интервал от 20 до 80 °C СБ всички ПСБ мрежи увеличават линейно степента си на набъбване с повишаване на температурата, което е в съответствие с факта, че линейните ПСБ проявяват ГКТР. В този температурен интервал става постепенното разрушаване на цип клъстерите в ПСБ хидрогелове и постепенното освобождаване на макромолекулите вследствие на разграждането на ПЦ физична мрежа.

При по-висока температури, а именно над 80°C, СН отново достига плато, определено от наличието и на химично омрежване в ПСБ хидрогелове. Височината на това плато е в съответствие с гъстотата на дадената ПСБ мрежа - колкото по-рехва е мрежата, толкова по-висока стойност на СН съответства на това плато. Достигнатото плато на СН на ПСБ хидрогелове показва, че всички те са достигнали максималната си степен на набъбване, ограничена от наличието на ковалентни напречни връзки (Фиг 5).

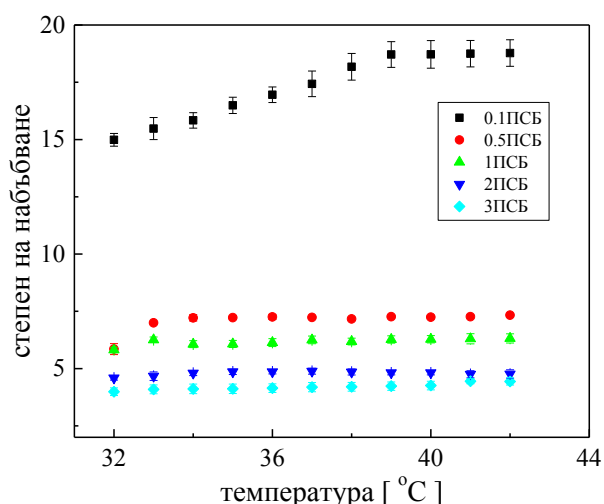
Температурната чувствителност на ПСБ хидрогелове, както вече бе отбелязано, се дължи на факта, че повишаването на температурата предизвиква разрушаване на физичната мрежа (цип клъстерите) на полимера, поради което той набъбва повече. Ефектът, който температурата оказва върху способността на ПСБ да набъбват, намалява с увеличаване на броя на напречните химични връзки, т.е. с увеличаване на концентрацията на омрежващия агент ПЕГДА. Това поведение много добре съответства на

результатите, получени за кинетиката на набъбване на същите тези ПСБ хидрогелове във вода при стайна температура (Фиг. 1).

II.2.5. Температурна чувствителност на ПСБ мрежи в симулирана тъканна течност

Демонстрираната температурна и солева чувствителност на ПСБ мрежите са две свойства, които са пряко свързани с потенциалното им приложение в лечението на рани. От една страна, отделяния от раната ексудат е солеви разтвор (с 0.15M концентрация на соли в него), а от друга страна, раната се лекува при температурата на човешкото тяло 37°C. Ето защо, интерес представляваше какво е поведението на ПСБ хидрогелвоете при едновременно действие на двата външни стимула – солева концентрация и температура. Така, за да се поставят ПСБ хидрогелове в условия, максимално наподобяващи условията на човешкото тяло, бе изследвана способността им да набъбват в симулирана тъканна течност в температурен интервал непосредствено около температурата на човешкото тяло.

Степента на набъбване на ПСБ хидрогелове в симулирана тъканна течност в температурния интервал от 32 до 42 °C е представена на Фиг. 6. Отново се проявява влиянието на гъстотата на химичната мрежа върху способността на ПСБ мрежите интелигентно да откликват на промяната в двата външни стимула – солева концентрация и температура. Най-слабо омреженият хидрогел (0.1ПСБ) набъбва в най-голяма степен в симулирана тъканна течност при промяна на температурата. Пр това, той линейно увеличава степента си на набъбване до 39°C, след което поради ограничителния ефект на химичната си мрежа достига плато. СН за 0.1ПСБ в изследвания температурен интервал нараства с 4, а в сравнение с останалите полимери мрежи, тази ПСБ мрежа показва почти 4-кратно по-голяма СН при 40°C в сравнение с най-гъстата мрежа – 3ПСБ (Фиг. 6).



Фигура 6. Зависимост на степента на набъбване на ПСБ мрежи в симулирана тъканна течност като функция от температурата.

Повишаването на локалната температура на раната е класически признак за инфекция на раната и може да се използва като ранен индикатор на хронифицирането ѝ, далеч преди да се забележат очевидни промени във външния вид на раната. От друга страна, ако температурата на мястото на раната е по-ниска от нормалната температура на тъканите, това показва възможна некроза. По този начин, температурната промяна може да позволи по-ранно откриване и диагностициране на инфекция при хронични рани, както и да предупреди за некроза в „леглото“ на раната (wound bed). В това отношение, хидрогелните превръзки, които реагират на промени в температурата биха могли да помогнат за качествено откриване на възникнал проблем с раната чрез промяна на своя обем и/или промяна на специално отпечатана марка. Когато локалната температура се повиши, което е индикация за възпаление на раната, те ще увеличат обема си, и ако тази промяна е линейна функция на температурата както при 0.1ПСБ ($y=1.036+0,439x$, $R=0,964$) то това би спомогнало за ранно предизвестие на проблем с раната. От друга страна, когато температурата спадне, което е индикация за евентуална некроза, превръзките (или маркировката) ще се свият. Тези промени в обема, заедно с прозрачността на ПСБ хидрогелите, което позволява пряк поглед върху състоянието на раната без да се маха превръзката, могат да осигурят по-добър мониторинг и контрол върху процеса на зарастване на хроничните рани.

СБ на останалите ПСБ хидрогелове също нараства с повишаване на температурата, но това увеличение не е толкова значително, колкото при 0.1ПСБ (Фиг. 6). Това се дължи на факта, че с увеличаване концентрацията на ПЕГДА в хидрогела се увеличава гъстотата на химичната мрежа, при което се затруднява формирането на физичната мрежа. Повишаването на температурата води до разкъсване именно на физичните връзки, вследствие на което хидрогела набъбва. Следователно, колкото по-малък е броят на физичните връзки, толкова по-малко ще увеличи хидрогела своята СН с увеличаване на температурата. Едновременно с това и по-гъстата химична мрежа ще определи също по-малка възможност за набъбване. Независимо от това, СН на всички ПСБ мрежи в симулирана тъканна течност е няколко пъти по-голяма в сравнение с тази, получена в дестилирана вода, което е илюстрирано на Фигура 7 чрез директно сравняване на двете криви в един и същ температурен интервал. Фигура 7 дава ясна илюстрация как едновременното действие на двойната чувствителност на ПСБ се отразява върху поведението на ПСБ хидрогелите. Сравнението между набъбването във вода и набъбването в разтвор на Кокубо, имитиращ солевата концентрация и съдържание на тъканната течност, показва как всички ПСБ хидрогелове увеличават способността си да абсорбират изкуствена тъканна течност неколкократно в сравнение с чиста вода.

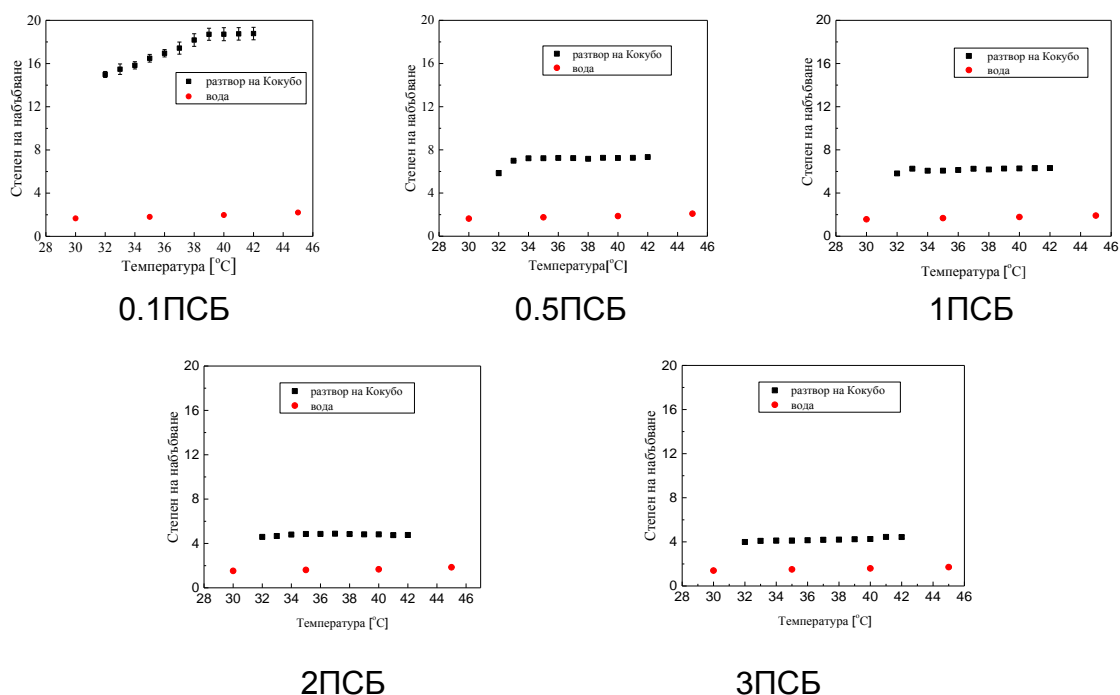
По този начин успешно е демонстрирано едновременното влияние на температурата и йонната сила върху способността на ПСБ хидрогелове да абсорбират телесни течности, което доказва техния отличен потенциал като превръзки за обилно ексудиращи рани.

II.2.6. Способност на ПСБ и ПКБ хидрогелове да увеличават размерите си при набъбване във физиологичен разтвор

Едно от най-важните предимства, които ПСБ и ПКБ, биха могли да предоставят като превръзки за рани, е способността им да набъбват и увеличават размера си, вместо да се свиват, при абсорбирането на раневи ексудат. На Фиг. 8 е показана промяната в обема на две от изследваните ПСБ мрежи, а именно 2ПСБ и 4ПКБ хидрогелове.

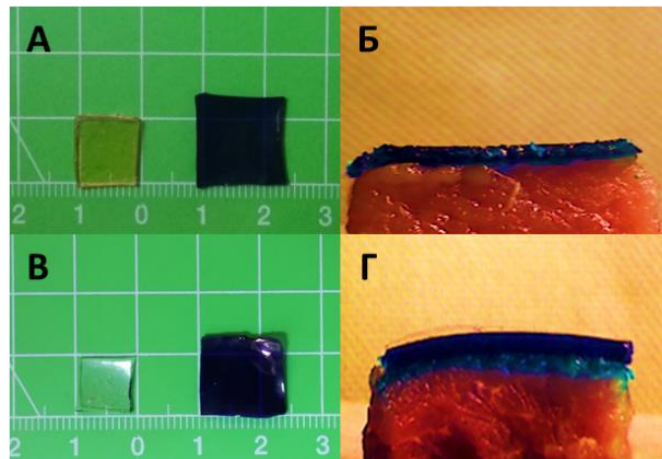
Двете сухи мрежи бяха оставени да набъбнат за 3 min във физиологичен разтвор на метиленово синьо (0.15 M NaCl), след което бе установено, че те увеличават линейните си размери с около ~ 25%.

За сравнение, същият експеримент беше повторен с три налични в търговската мрежа и използвани за лечение на хронични рани превръзки за рани, а именно AQUACEL® Ag Extra™, ALLEVYN и Durasoft (Фигура 9). AQUACEL® Ag Extra™ и Durasoft се свиват след същата процедура на набъбване, докато ALLEVYN се разширява леко (Фиг. 9 А, В и Д). ALLEVYN е широко рекламирана в момента като едиснтвената превръзка, която увеличава, а не намалява размера си след абсорбция на раневи ексудат.



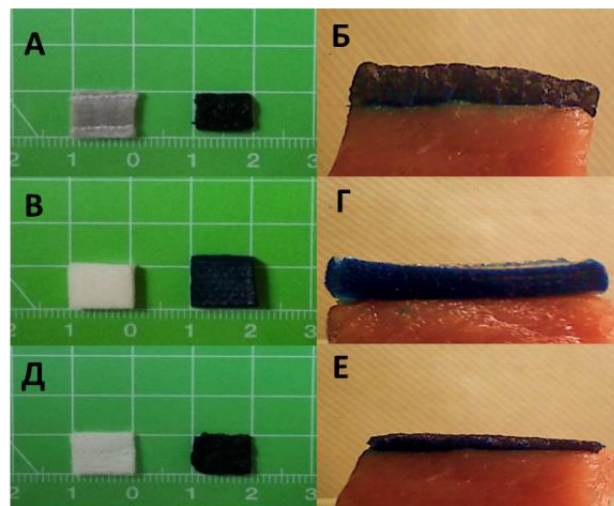
Фигура 7. Сравнение между СН на ПСБ хидрогелове при набъбване във вода (●) и в разтвор на Кокубо (■) в температурния интервал 30 – 42°C.

Сравнението между ПСБ и ПКБ хидрогелове (Фигура 8) и ALLEVYN (Фигура 9), обаче, демонстрира по-голяма способност за набъбване на ПСБ мрежи, като по този начин те осигуряват по-добър комфорт на пациента. Свиването на превръзката на раната от една страна причинява болка и дискомфорт на пациента, а от друга нарушава процеса на заздравяване на раната. Така, способността на ПСБ хидрогелове да набъбват и увеличават размерите си във физиологичен разтвор е важно тяхно свойство с оглед приложението им като превръзки за обилно ексудирани рани.



Фигура 8. Набъбване на (А) 2ПСБ и (В) 4ПКБ хидрогелове за 3 min в разтвор на метиленово синьо във физиологичен (0.15M NaCl). Прилепване на хидрогеловите на 2ПСБ (Б) и 4ПКБ (Г) върху имитиращ рана материал.

ПЦ хидрогеловите притежават още едно предимство с оглед планираното им приложение, а именно способност да покриват плътно раната. Когато превръзката не покрива плътно раната, се създават празни пространства с благоприятни условия (топлина и влага), които увеличават риска от развиване на биофилм. Празните пространства между раната и превръзката представляват ниши, в които бактериите могат да колонизират лесно. Ето защо, превръзките за рана трябва да следват плътно извивката на раната, без да залепват за нея.



Фигура 9. Набъбване на (А) AQUACEL® Ag Extra™, (В) ALLEVYN Adhesive, Smith & Nephew и (Д) DURAFIBER, Smith & Nephew за 3 min в разтвор на метиленово синьо във физиологичен разтвор (0.15 M NaCl). Прилепване на (Б) AQUACEL® Ag Extra™, (Г) ALLEVYN Adhesive, Smith & Nephew и (Д) DURAFIBER, Smith & Nephew върху имитиращ рана материал.

На Фигура 8Б и Г са представени снимки на ПСБ и ПКБ хидрогелове, които прилепват плътно за парче месо, което със своята неравна повърхност

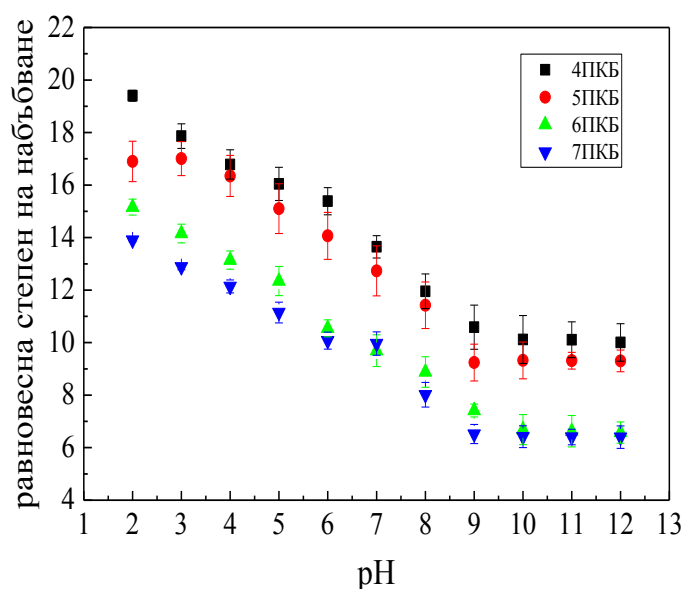
имититра донякъде рана. За сравнение, подобни експерименти бяха направени и с трите превръзки за рани, налични в търговската мрежа, които не успяват така плътно да следват извивките на месото (Фиг. 9 Б, Г и Е).

В рамките на дисертацията не са правени експерименти с цел доказване на способността на ПЦ хидрогелове да не залепват за раната, т.е. демонстриране на ниската им биоадхезия. Причината е, че в литературата има вече много подобни изследвания, потвърждаващи това им свойство, което ги прави още по-желани като превръзки за рани, защото смяната на превръзката няма да е свързана с болка, както и с нарушаване на целостта на заздравяващата тъкан.

II.2.7. рН чувствителност

Изменението на pH на средата е очаквано да влияе върху способността на ПКБ хидрогелове да набъбват, тъй като те съдържат $COOH$ групи. Докато карбоксилните групи могат да се депротоират или протонират в зависимост от pH на средата, то третичните R_3N^+ групи в състава на ПКБ са нечувствителни към pH . По този начин, промяната на pH в действителност води до обратима трансформация на ПКБ от поликатион в полицвистерйон и обратното.

Степента на набъбване на ПКБ мрежи с различна степен на омрежване беше изследвана в pH диапазона от 2 до 12 при стайна температура (Фиг. 10). Всички ПКБ проби намаляват степента си на набъбване постепенно при повишаване на pH от 2 до 9 (Фиг. 10).



Фигура 10. Зависимост на степента на набъбване на ПКБ като функция от pH при 25 °C.

В алкална среда при $pH > 9$, не се наблюдава по-нататъшна промяна в РСН на ПКБ, т.е. достига се плато. Причината за това поведение на ПКБ хидрогелове е, че в кисела среда, при $pH < 4.5$ ($pK_a^{COOH} = 4.5$), карбоксилните групи са протонирани и ПКБ се държи като поликатион поради постоянния положителен заряд на $-R_3N^+$ групи.

При това възникват електростатични сили на отблъскване между съседните $-R_3N^+$ групи, водещи до набъбване на ПКБ хидрогелове. Постепенното повишаване на pH на средата води до увеличаване на броя на депротонираните карбоксилни групи и до постепенната трансформация на ПКБ от поликатион в полицвистерйон. При това, ПКБ хидрогелите започват постепенно да се свиват поради, от една страна, намаляване на силата на електростатично отблъскване между $-R_3N^+$ групи, а от друга страна – формирането на цип клъстери, определени от дипол-диполните взаимодействия между цвистерйонните фрагменти в страничните вериги на ПКБ.

При $pH > 9$ се достига до най-ниската степен на набъбване на ПКБ и тя остава постоянна дори при повишаването на pH до 12. Тази постоянна стойност се дължи на факта, че всички $COOH$ групи са депротонирани, т.е. всички странични вериги имат цвистерйонна структура и всички те участват в образуването на цвистерйонни клъстери. Така, след $pH > 9$ в ПКБ хидрогел са се формирали всички възможни физични възли, които са причинили наблюдаваното на Фигура 10 свиване и тъй като техният брой вече не се променя, остава постоянен, степента на набъбване също престава да зависи от pH .

Промяната в общия нетен заряд на ПКБ хидрогелите - от положителен до неутрален с увеличаване на pH , се очаква да промени тяхната антибактериална активност. Добре известно е, че кватернерните амониеви групи придават антибактериална активност, докато ПЦ проявяват способност да не позволяват образуване на биофилм върху тяхната повърхност. Така, с повишаване на pH и преход от положителен към неутрален нетен заряд, ПКБ хидрогелите „превключват“ своята антибактериална активност в антибиофилм-образуваща активност. Докато pH на акутните рани е около 7 (~7.15), то pH на хроничните рани достига до 8.5. Така може да се заключи, че при хронифицирането на една рана, т.е. превръщането на раната от акутна в хронична, промяната на pH която съпровожда този преход може да накара ПКБ хидрогелите да променят подобаващо своята биоактивност. Антибактериалната активност е важна при лечение на акутните рани, тъй като там е необходимо да не се позволи на външни патогени да попаднат през раната в организма. За разлика от тях, при хроничните рани важна е антибиофилм образуващата способност, тъй като хроничните рани са податливи на формиране на бактериални биофилми, които от своя страна са много трудни за премахване.

Всички ПКБ хидрогелове демонстрират висока способност да абсорбират напр. раневи ексудат, тъй като в зависимост от плътността на мрежата си те могат да набъбнат 6 до 11 пъти над собственото си тегло в pH интервала от 7.15 до 8.5 (Фиг. 10). Това поведение е точно противоположно на поведението на превръзките за рани на базата на полиелектролити, които са широко застъпени в момента на пазара – последните не набъбват, а напротив – свиват се в солеви разтвори.

Влиянието, което степента на омрежване на ПКБ хидрогелите оказва върху тяхната степен на набъбване като функция от pH съответства на

резултатите, получени за кинетиката на набъбване (Фиг. 1). Най-силно омрежената ПКБ проявява най-ниска способност да набъбва.

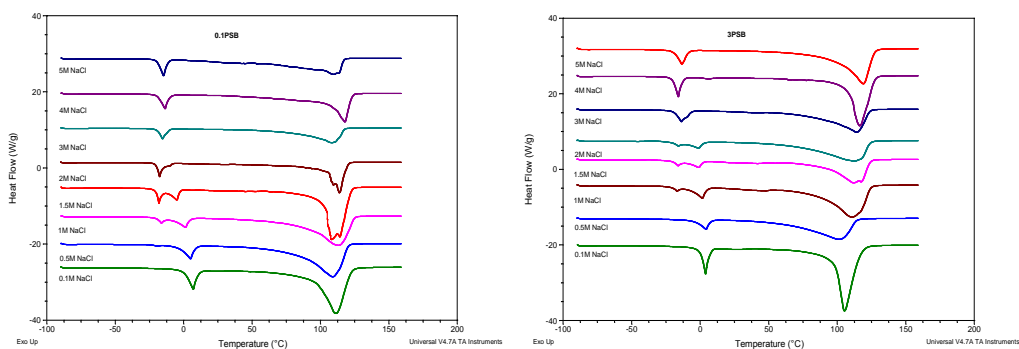
II.2.8. Свързана и несвързана вода в ПСБ и ПКБ хидрогелове в зависимост от концентрацията на солевия (NaCl) разтвор в който е набъбнал хидрогела

Набъбването е процес, при който разтворителят (напр. вода) прониква в полимера чрез дифузия. Проникването на водата води до промени в структурата на полимерите поради способността на водните молекули да нарушават междумолекулните взаимодействия, които вече съществуват между полимерите молекули, а едновременно с това да се свързват с хидрофилните сегменти на полимерните вериги посредством водородни връзки. Ето защо, в хидрофилните полимери се срещат два вида водни молекули. Първият тип е така наречената незамръзваща (свързана) вода, която кристализира при много по-ниска температура от 0°C. Тази по-ниска точка на замръзване се дължи на взаимодействието на водата с полимера. Вторият тип е замръзващата или (свободна, несвързана) вода, която замръзва при 0 °C. Биосъвместимостта на полицивтерийоните и в частност на ПСБ и ПКБ хидрогелове често се обяснява с голямото количество свързана вода, което се съдържа в тях. Именно тя прави повърхността им много "мека" и "нежна" за протеините, вследствие на което те запазват своя конформация и по този начин не адсорбират върху повърхността на ПЦ материали. Това е едно от най-честите обяснения за много ниската неспецифична белтъчна адсорбция на ПСБ повърхности.¹ Като кандидати за превръзки за рани с отлична биосъвместимост, ПСБ и ПКБ мрежи не трябва да залепват за раната. Поради тази причина, бе определено количеството на свързаната и несвързана вода в двата типа ПЦ хидрогелове.

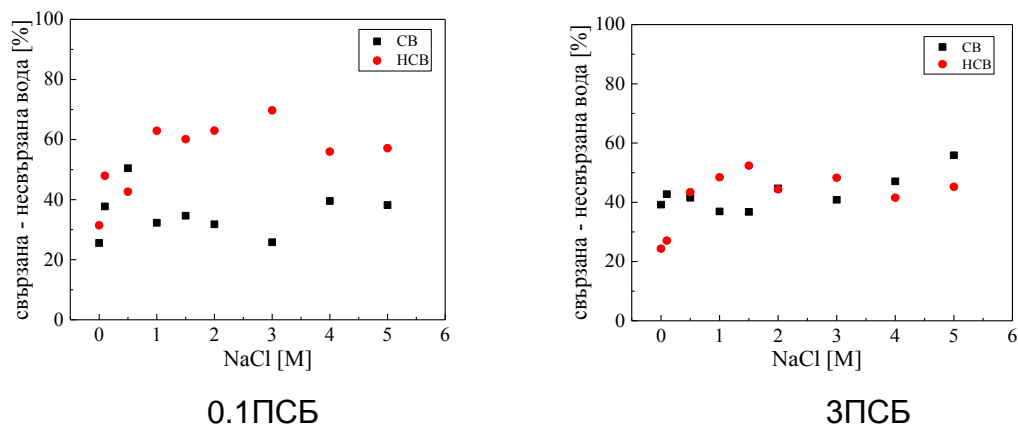
Термичните свойства на най-слабо и най-силно омрежените ПСБ (0.1ПСБ и 3ПСБ) и респективно ПКБ (4ПКБ и 7ПКБ) хидрогелове, оставени да набъбнат до РСН в дестилирана вода и във водни разтвори на NaCl с концентрации от 0.1М до 5М, бяха изследвани с помощта на ДСК. Получените термограми са представени на Фигура 11. От пиковете на замръзване на водата (около 0°C), в изследваните хидрогелове бяха определени количествата свързана и несвързана вода в двата типа ПЦ мрежи. Освен това бяха построени зависимостите на количеството свързана и несвързана вода от концентрацията на NaCl. Резултатите са показани на Фигура 12А и Б.

Резултатите показват, че двата ПСБ хидрогела свързват около ~ 40% от абсорбираната от тях вода като количеството на свързаната и несвързана вода в хидрогелите не показва ясна зависимост от концентрацията на солта. Очаквано, по-рехавата ПСБ мрежа, 0.1ПСБ, има по-високо съдържание на несвързана вода, именно поради по-голямата си способност да набъбва, тъй като има по-малък брой напречни ковалентни връзки в сравнение с 3ПСБ.

¹ Y. Chang, S.-C. Liao, A. Higuchi, R.-C. Ruaan, C.-W. Chu, W.-Y. Chen, A Highly stable nonbiofouling surface with well-packed grafted zwitterionic polysulfobetainefor plasma protein repulsion, Langmuir 24 (10) (2008) 5453–5 458, <https://doi.org/10.1021/la800228c>.



Фигура 11. Термограми, получени с ДСК, на ПСБ хидрогелове 0.1ПСБ и 3ПСБ, намиращи се в тяхната РСН във водни разтвори на NaCl с различни концентрации.

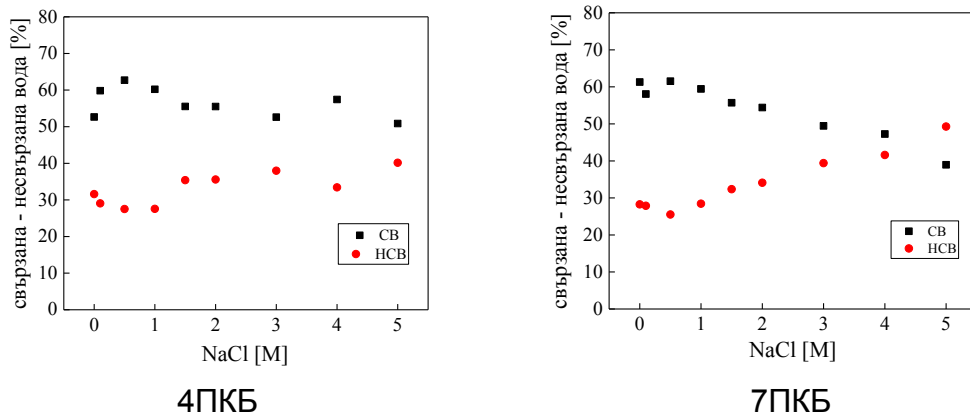


Фигура 12. Зависимост на количеството на свързана и несвързана вода от концентрацията на NaCl за най-рехавата и най-гъсто омрежената ПСБ мрежи.

Аналогични изследвания бяха направени за най-рехавата, 4ПКБ, и най-гъсто омрежената, 7ПКБ, поликарбоксібетаинови мрежи (Фиг.13 А и Б).

При ПКБ хидрогеловите количеството свързана вода е значително по-голямо в сравнение с това при двете ПСБ мрежи и варира между 50% и 60%. Това може да бъде обяснено с по-силно изразения хидрофилен характер на ПКБ в сравнение с ПСБ – докато ПКБ са водоразтворими, ПСБ проявяват ГКТР.

При по-рехавата мрежа, 4ПКБ, количествата свързана и несвързана вода не показват ясна зависимост от степента на омрежаване, докато при по-гъстата ПКБ мрежа, 7ПКБ, количеството свързана вода намалява, а това на несвързаната вода нараства.



Фигура 13. Зависимост на количеството свързана и несвързана вода от концентрацията на NaCl за най-рехавата, 4ПКБ, и най-гъстата поликарбоксиветаинова мрежа, 7ПКБ.

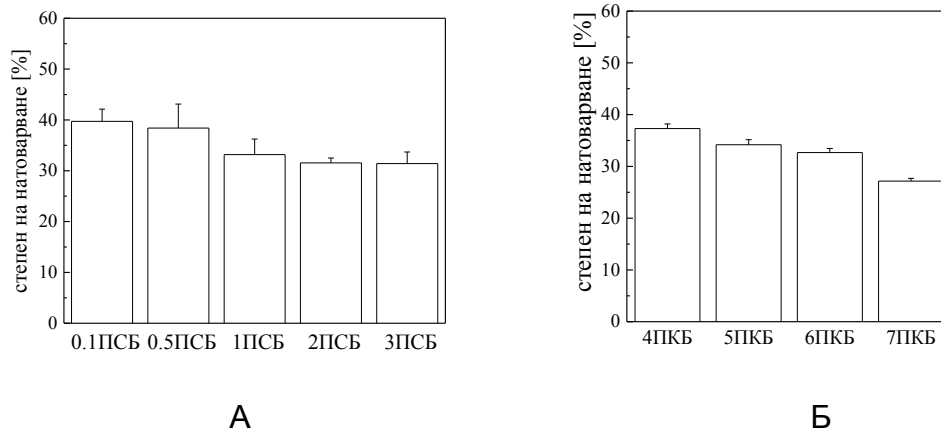
В заключение, следвайки изтъкваната в литературата връзка между количество свързана вода, която един полимерен материал има и неговата биосъвместимост, за очакване е ПКБ хидрогелите да проявяват по-добра биосъвместимост, т.е. да са по-балгоприятно възприемани в биологичните си отнасяния, отколкото ПСБ хидрогелите.

II.2.9. Абсорбция на колагеназа от ПСБ и ПКБ хидрогелове

Един от най-важните фактори, които влияят негативно и възпрепятстват процеса на зарастване на раните е високата концентрация на ензима колагеназа в хроничните рани. От една страна, колагеназата е част от процеса на ремоделиране на зарастващата рана, т.е. тя е необходима за един нормално развиващ се процес на зарастване на раната. От друга страна, обаче, нейната висока концентрация в раната води до разграждане на новосъздадената съединителна тъкан, която е част от процеса на зарастване, вследствие на което раната може да се превърне в незарастваща, хронична такава.

Два основни метода могат да бъдат използвани, за да се контролира съдържанието и активността на колагеназата: (1) абсорбиране и задържане на раневия ексудат в превръзката, като по този начин се намалява концентрацията на metalloпротеиназите и в частност на колагеназата и (2) директно инхибиране на ензимната активност.

Тъй като ПЦ мрежите набъбват значително в солеви разтвори, за очакване бе ефективната абсорбция на раневия ексудат да доведе до намаляване на концентрацията на колагеназа в раната. Ето защо, бе изследвана степента на абсорбиране/натоварване на колагеназа в ПСБ и ПКБ мрежи (Фиг. 14). С увеличаване на гъстотата на двата типа ПЦ мрежи (т.е. с увеличаване на концентрацията на ПЕГДА, Фиг.14), степента на натоварване на колагеназа в тях намалява. Така, най-рехавата полисулфобетаинова мрежа (0.1ПСБ) успява да абсорбира ~40 % от колагеназата в разтвор, докато за най-гъстата, 3ПСБ, мрежа този процент намалява до ~33.



Фигура 14. Степен на натоварване с колагеназа на : (А) – ПКСБ и (Б) – ПКБ хидрогелове

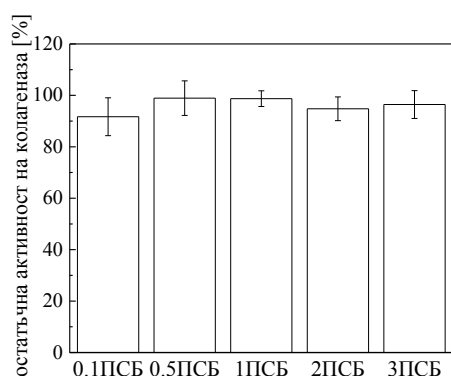
Абсорбцията на колагеназа от ПКСБ мрежите се контролира както от тяхната способност за по-значително набъбване в солеви разтвор, така и от тяхната температурна чувствителност. Тъй като експериментът бе проведен в условия, доближаващи се до тези на човешкото тяло (рН=7.4 и 37°C), двата параметъра – солева концентрация и температура действат в една посока, а именно да увеличават способността на ПКСБ мрежите да набъбват повече и по този начин да отнемат по-ефективно част от наличната в разтвора колагеназа (Фиг. 14А).

Аналогични резултати бяха получени и за абсорбцията на колагеназа от ПКБ хидрогелове (Фиг. 14А). Отново, по-гъстата полимерна мрежа води до по-малко количество абсорбиран/натоварен ензим. Най-слабо омреженият хидрогел (4ПКБ) абсорбира ~ 38% от наличната в изходния разтвор колагеназа, докато най-силно омреженият (7ПКБ) е в състояние да абсорбира ~ 29% от ензима. Тук отново двойната чувствителност на ПКБ хидрогелове – солева и рН, увеличават способността им да абсорбират ензима.

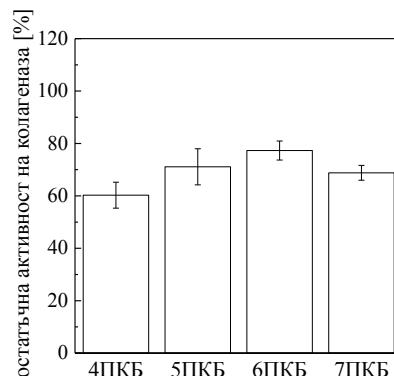
В заключение, концентрацията на колагеназа в раната може да бъде ефективно контролирана чрез вариране степента на омрежаване на ПКСБ и ПКБ хидрогелове.

II.2.10. *In vitro* определяне на инхибиращата способност на ПКСБ и ПКБ хидрогелове спрямо колагеназа

Способността на ПКСБ и ПКБ хидрогелове да инхибират директно колагеназата беше тествана както *in vitro*, така и *ex vivo*. *In vitro* изследванията показват, че колагеназата запазва ~ 97% от първоначалната си активност след инкубиране с ПКСБ хидрогелове (Фиг. 15А). В случая на ПКБ хидрогелове процентът на остатъчна ензимна активност варира слабо в рамките на експерименталната грешка в интервала 60÷75% (Фиг. 15Б).



А

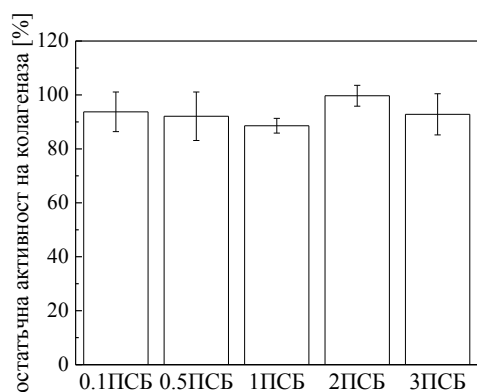


Б

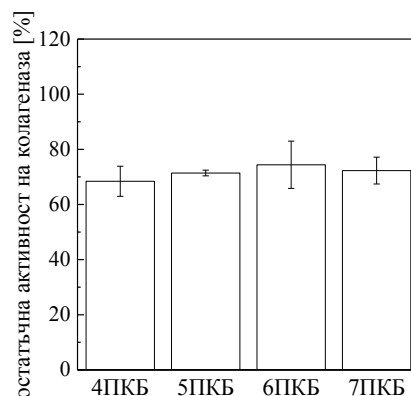
Фигура 15. *In vitro* изследване на активността на колагеназа след инкубиране с (А) – ПСБ и (Б) – ПКБ хидрогелове.

II.2.11. *Ex vivo* определяне на инхибиращата активност на ПСБ и ПКБ хидрогелове спрямо колагеназа в раневия ексудат

Ex vivo изследването имитира в най-голяма степен реалното състояние на хроничните рани, тъй като до този момент няма надеждни, базирани на животни модели, за изследване на хроничните рани. Проведените *ex vivo* изследвания потвърдиха описаните по-горе *in vitro* експериментални резултати, а именно, че ПСБ хидрогелове не инхибират общата протеолитична активност на раневия ексудат, взет от пациент с варикозна язва на крака (Фиг. 16А). За разлика от тях, ПКБ хидрогелове инхибират до ~30 % общата протеолитична активност на раневия ексудат (Фиг. 16Б).



ПСБ



ПКБ

Фигура 16. *Ex vivo* определена обща протеолитична активност на раневия ексудат след инкубиране с ПСБ и ПКБ хидрогелове.

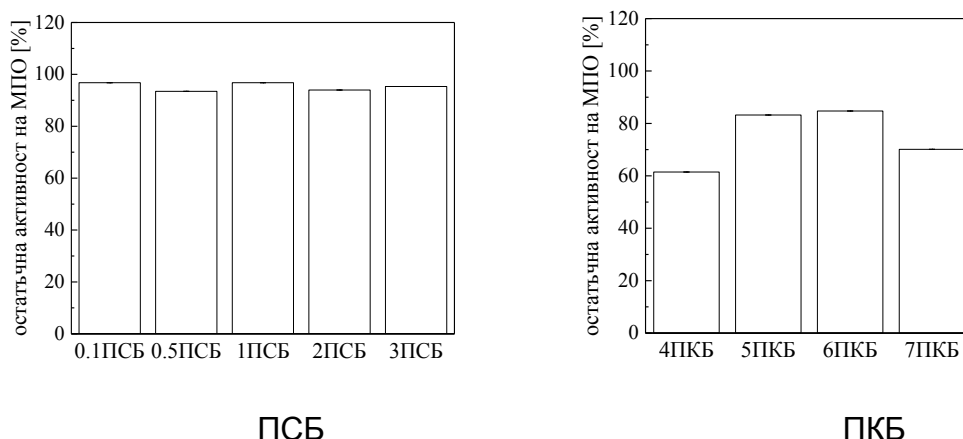
Получените резултати показват, че и двата ПЦ хидрогела успешно запазват активността на протеолитичните ензими, както *in vitro*, така и *ex vivo*, като слабия инхибиращ ефект на ПКБ хидрогелите засега не може да бъде обяснен. Следователно, ПСБ и ПКБ мрежи могат да бъдат ефективно използвани като превръзки за хронични рани, тъй като те ефективно ще редуцират концентрацията на колагеназа и/или протеолитичните ензими в

раната чрез абсорбция с поетия от тях ексудат, без при това да намалят значително активността на оставащите в раната ензими. По този начин, те осигуряват възможност за протичане на ремоделиране на новообразуваните съединителни тъкани, което е част от заздравителния процес на раната, тъй като не инхибират чувствително ензимната активност. Резултатите от *ex vivo* експериментите показват, че двата типа полимерни мрежи остават ефективни дори в реалните условия на хронична рана, където много компоненти на ексудата могат допълнително да повлияят върху тяхната ефективност.

II.2.12. *In vitro* и *ex vivo* определяне на инхибиращата активност на ПСБ и ПКБ хидрогелове спрямо миелопероксидаза (МПО)

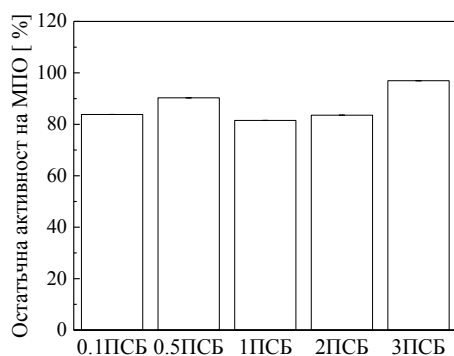
Аналогични експерименти бяха проведени, за да се провери как ПСБ и ПКБ хидрогелите повлияват върху активността на МПО. Високите концентрации на произведените от действието на МПО защитни вещества могат да доведат до разрушаване на растежните фактори и естествените инхибитори на матричните металопроотеинази (протеолитичните ензими, които са с високо съдържание в хроничните рани), като по този начин водят до хронифициране на раната.

Получените резултати са в съгласие с тези, описани по-горе за колагеназата. ПСБ хидрогелите демонстрират *in vitro* незначително инхибиране на МПО (Фиг. 17А). *Ex vivo* резултати показват по-голяма степен на инхибиране в сравнение с *in vitro*, но МПО запазва повече от 80% от своята активност (Фиг. 18А).

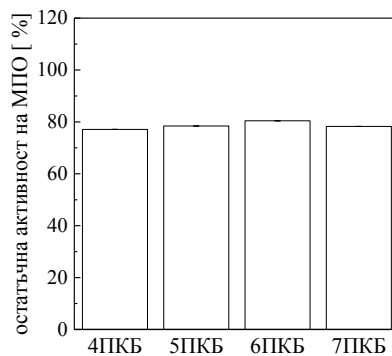


Фигура 17. *In vitro* определена остатъчна активност на МПО след инкубиране с ПСБ и ПКБ хидрогелове (определените грешки на измерванията имат незначителни стойности).

ПКБ хидрогелите, от своя страна, отново редуцират активността на МПО от 20 до 40%, в зависимост от плътността на мрежата и при двата проведени експеримента – *in vitro* и *ex vivo* (Фиг. 17Б и 18Б).



ПСБ



ПКБ

Фигура 18. *Ex vivo* определена МПО остатъчна активност след инкубиране с ПСБ и ПКБ хидрогелове (определените грешки на измерванията имат незначителни стойности).

II.2.13. Способност на линеен ПСБ да свързва Ca^{2+} и Zn^{2+}

Бе направен опит за изясняване на причината за различната инхибираща способност на ПСБ и ПКБ хидрогелове спрямо колагеназа и МПО. За целта, бе изследвана способността на ПСБ хидрогелове да свързват Zn^{2+} и Ca^{2+} атоми. Zn е металът в активния център на колагеназата, а калция бе използван като еталон за сравнение, тъй като е един от йоните с най-висока концентрация в човешкото тяло и присъства във всички телесни течности. Според резултатите, представени в Таблица 5, линейният ПСБ демонстрира по-силна способност да свързва Zn^{2+} , отколкото Ca^{2+} йони.

Установено бе, че линейният ПСБ е в състояние да свърже 3 пъти по голямо количество Zn^{2+} йони, отколкото Ca^{2+} йони (Таблица 3).

Таблица 3. Афинитет на линеен ПСБ да свързва Ca^{2+} и Zn^{2+} йони.

Ион	Ca^{2+}	Zn^{2+}
Количество, свързано с линейния ПСБ	$100.3 \pm 0.3 \text{ mg/g}$ полимер	$310.7 \pm 0.6 \text{ mg/g}$ полимер

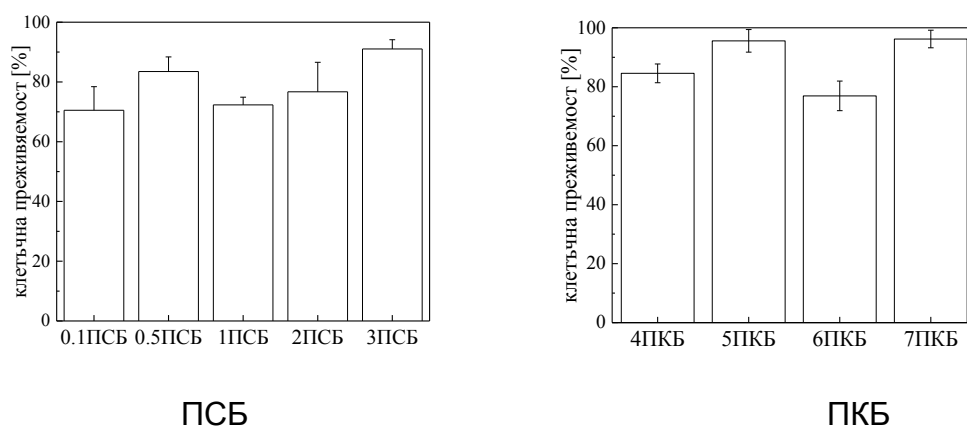
Въпреки тази силно изразена склонност за свързване на ПСБ с Zn^{2+} в сравнение с Ca^{2+} , ПСБ хидрогелове на практика почти не повлияват протеолитичната активност на колагеназата както *in vitro*, така и *ex vivo*. Липсата на инхибиращ ефект на ПСБ мрежи върху активността на колагеназата е в съответствие с предишни резултати, при които бе доказано, че ПЦ имат дори стабилизиращ ефект върху протеазите. По този начин, може да бъде направено заключението, че афинитетът на ПСБ хидрогелове към свързването на Zn^{2+} йони се компенсира от присъщата им способност да стабилизират ензимите. Крайният резултат от тези два противоположно действащи ефекта е липсата на инхибиращ ефект на ПСБ мрежите спрямо колагеназната активност.

В заключение, може да бъде обобщено, че ПСБ хидрогелове проявяват по-слаб инхибиращ ефект (дори липсата на такъв) спрямо колагеназа и МПО в

in vitro и в ex vivo условия в сравнение с ПКБ хидрогелове, които демонстрират частичен инхибиращ ефект. Тези резултати донякъде противоречат на определеното двойно по-голямо количество свързана вода в ПКБ хидрогелове в сравнение с ПСБ хидрогелове, което бе очаквано да доведе до по-благоприятни биологични взаимодействия на ПКБ спрямо ПСБ. Инхибиращият ефект на ПКБ не е свързан с механичното отстраняване на колагената чрез нейната абсорбция, тъй като и двата типа хидрогелове показват сравними степени на натоваване с колагеназа. И двата типа ПЦ хидрогела, обаче, могат да бъдат успешно прилагани като превръзки за хронични рани, които са способни да контролират концентрацията и активността на два ензима, характерни за хроничните рани, каквито са колагеназа и МПО.

II.2.14. Цитотоксичност на ПСБ хидрогелове спрямо ембрионални фибробластни клетки на мишка

Двата ПЦ типа хидрогелове бяха тествани за своята цитотоксичност и срещу фибробластни клетки, линия VJ-5ta (ATCC® CRL-4001™) с AlamarBlue. Резултатите, представени на Фигура 20 показват, че 70 % от клетките остават живи след 24 часа контакт с ПСБ хидрогелове, докато при ПКБ хидрогелове този процент варира в интервала 75 ÷ 97% в зависимост от гъстотата на мрежата. Така, и двата типа ПЦ хидрогелове могат да бъдат определени като нецитотоксични.



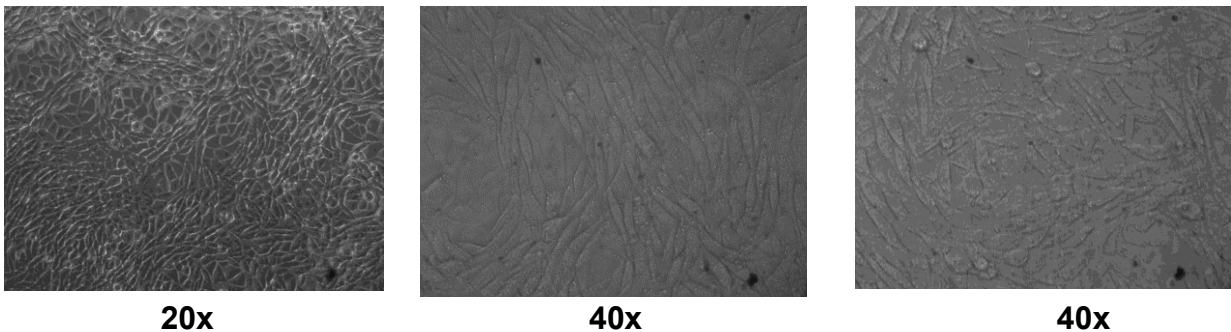
Фигура 19. Цитотоксичност на (А) ПСБ и (Б) ПКБ хидрогелове определена спрямо фибробластни клетки, линия VJ-5ta.

От Фигура 19 се вижда, че клетъчната преживяемост при двата типа хидрогелове не зависи от тяхната степен на омрежване. Възможно обяснение на този резултат е, че освен биомиметичната цвитерйонна структура на ПСБ, модулът на съхранение на всички изследвани проби е ~1 kPa (Фиг. 28). Тази стойност е сравнима с механичните характеристики на повечето тъкани на тялото, като напр. мозък, нерви, черен дроб, мазнини, отпуснат мускул, тъкан на млечната жлеза и др. Приблизително еднакви механични свойства на ПЦ хидрогелове с тези на тъканите на тялото е друг ключов фактор, който предопределя високата жизнеспособност на клетките и нецитотоксичността на изследваните полимери.

В заключение двата типа ПЦ са нецитотоксични и могат да бъдат използвани като материали за превръзки за рани.

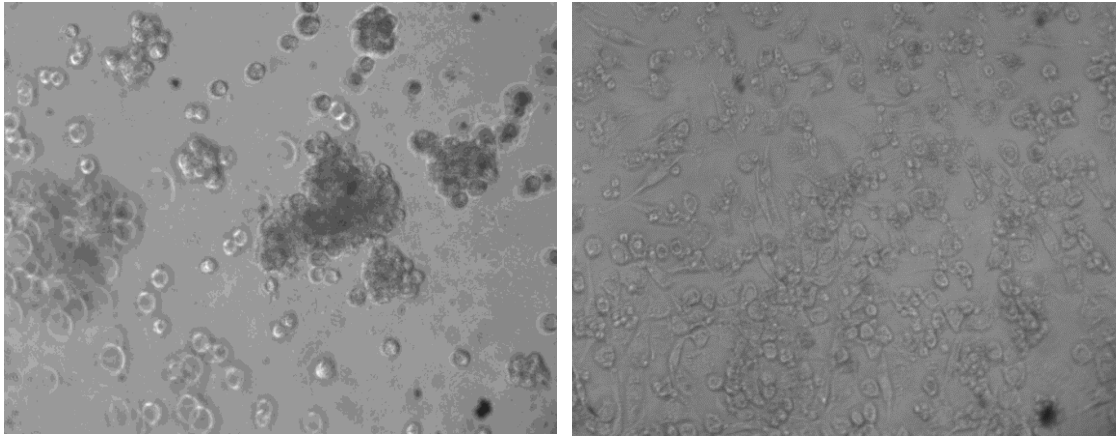
II.2.15. Определяне на патологични изменения в ембриални фибробластни клетки на мишка, инкубирани с ПСБ хидрогелове

Влиянието на ПСБ хидрогелове върху клетъчната морфология бе изследвано чрез светлинна микроскопия, използвайки две групи клетки – миши ембрионални фибробласти, клетъчна линия L929, отглеждани в отсъствието на ПСБ (празна проба, Фиг. 20) и L929 клетки, отглеждани върху 0.1ПСБ и 0.5ПСБ хидрогелове (Фиг. 21). Микроскопските изображения (Фиг. 20) ясно показват способността на клетките в отсъствие на полимер да прилепват върху повърхността на плаката и да образуват монослое. Клетките в монослой имат удължена вретенообразна форма, характерна за фибробластите и образуват още по-плътен монослой поради добрата им адхезия към повърхността на плаката (Фиг. 20).

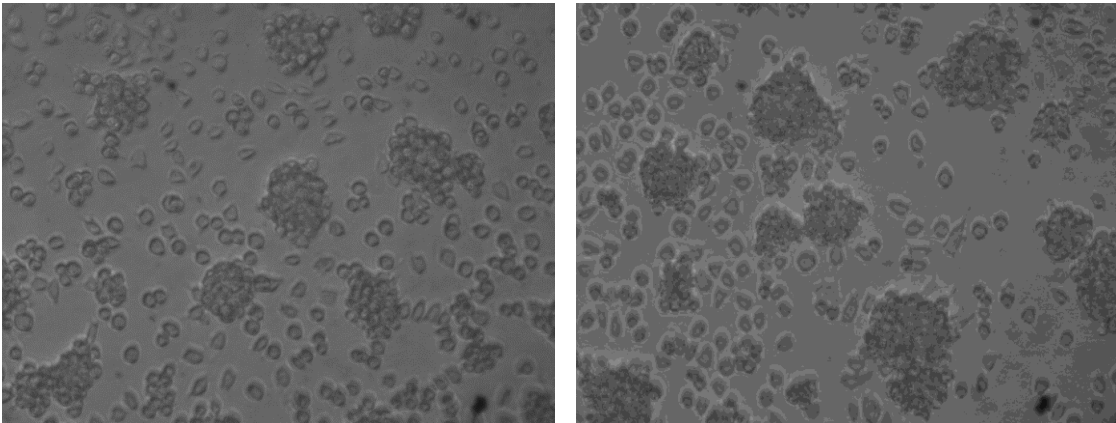


Фигура 20. Оптични микроскопски снимки на ембрионални миши фибробластни клетки L929, отглеждани за 72 часа върху 48-ямяква плака (снимките са направени върху различни части от пробата). Под снимките е указано увеличението.

За разлика от тях, клетките, отглеждани върху 0.1ПСБ и 0.5ПСБ (Фиг. 21) не адхезират по тяхната повърхност. Те запазват кръглата си форма, като образуват струпвания (кълъстери), а не монослое. Така, липсата на промяна на формата на клетките в присъствие на 0.1ПСБ хидрогелове и склонността им да образуват кълъстери, показват, освен, че ПСБ хидрогелове не провокират клетъчна смърт, също така, че ПСБ хидрогелове имат ниска биоадхезия – клетките не адхезират върху тяхната повърхност. Отстраняването на клетъчния монослой адхезирал върху повърхността на плаката (празната проба) бе трудоемко, като за целта пробата беше третирана в продължение на 4-5 min с разтвор, съдържащ ЕДТА и трипсин. От друга страна, клетките върху повърхността на 0.1ПСБ и 0.5 ПСБ са само частично прикрепени върху нея, което позволи лесното им отделяне.



0.1 ПСБ



0.5 ПСБ

Фигура 21. Оптични микроскопски снимки на L929 клетки, отгледани върху 0.1 ПСБ и 0.5 ПСБ хидрогелове (увеличение 20х).

II.2.16. Способност на ПСБ и ПКБ хидрогелове да инхибират бактериален растеж

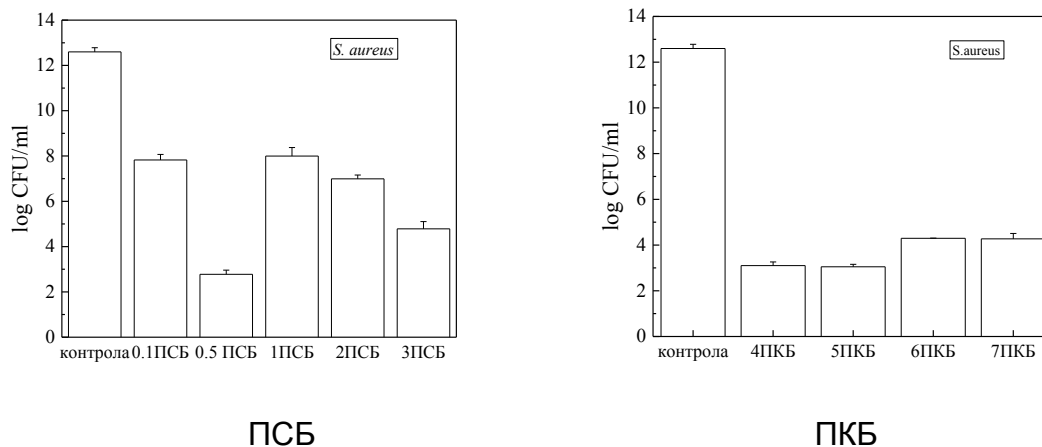
Материалите, притежаващи способност да предотвратяват бактериалната адхезия и образуването на бактериални биофилми (антибиофилмообразуваща активност) са особено подходящи за превръзки за хронични рани, тъй като последните предоставят идеална среда за формирането на биофилми. Обикновено, повърхности, които предотвратяват адсорбцията на протеини и клетъчната адхезия, също така проявяват антибиофилмообразуващи свойства, въпреки че такава връзка не винаги е валидна.² Известно е, че ПЕГ и ПСБ възпрепятстват както протеиновата адсорбция, така и формирането на биофилми.³

Антибиофилмообразуващата способност на двата типа ПЦ хидрогелове бе тествана със *S. Aureus*. ПСБ хидрогелите инхибират образуването на колонии от *S. aureus* в сравнение с контролата от силикон (Фиг. 22). Силиконът сам по себе си не подкрепя образуването на биофилми и е използван като материал за превръзки за рани. Освен това той не залепва за влажни повърхности,

² N. Cioffi, M. Rai, Nano-Antimicrobials: Progress and Prospects, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012, p. 34.

³ Y. Chang, S.-C. Liao, A. Higuchi, R.-C. Ruaan, C.-W. Chu, W.-Y. Chen, A Highly stable nonbiofouling surface with well-packed grafted zwitterionic polysulfobetaine for plasma protein repulsion, Langmuir 24 (10) (2008) 5453–5458, <https://doi.org/10.1021/la800228c>.

осигурява лесна и безболезнена смяна на превръзката и предотвратява формирането на белег.

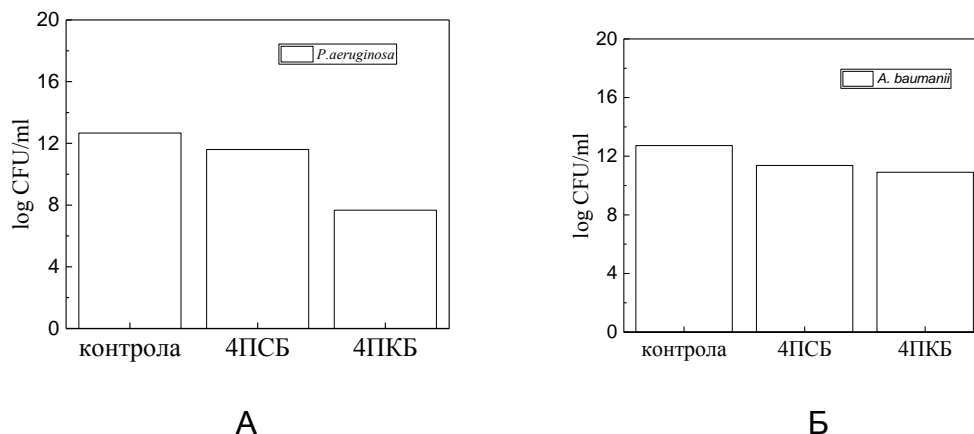


Фигура 22. Способност на PCSB и PKB хидрогелове да инхибират обрзуването на биофилм от *S. aureus*.

Аналогично на PCSB, всички изследвани PKB мрежи демонстрират инхибиране на растежа на биофилма на *S. aureus* върху техните повърхности в сравнение със силикона (Фиг. 22), като този ефект при тях е по-силно изразен в сравнение с PCSB. Както вече бе споменато, поведението на ПЦ в биологични условия е тясно свързано със способността им да свързват вода. Това само по себе си води до формирането на хидратационен слой, възпрепятстващ адхезията на протеини и бактерии. Демонстрираната от PCSB и PKB хидрогелове по-добра способност да инхибират растежа на *S. aureus* в сравнение с тази на силикона, е друго важно тяхно предимство като превръзки за лечение на хронични рани.

Способността на PCSB и PKB хидрогелове да инхибират растежа на *S. aureus* беше стимул да бъдат проведени аналогични изследвания, използвайки други бактериални щамове, срещани в хроничната рана и способни да формират биофилми. За целта бяха подбрани *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Резултатите отново показват, че PKB хидрогела демонстрира най-значителна инхибираща активност спрямо двата щам бактерии (Фиг. 23). От друга страна, 4PCSB хидрогела инхибира по-значително растежа на *P. aeruginosa* и на *A. baumannii*, в сравнение с контролата (в този случай тя е просто разтвор на бактериите (Фиг.23)).

4PCSB и 4PKB инхибират в по-малка степен растежа на *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, отколкото този на *S. aureus*. Но при всички изследвани щамове ПЦ хидрогелове проявяват антибиофилм образуваща способност спрямо бактериите, срещани в раните.



Фигура 23. Способност на ПСБ и ПКБ хидрогелове да инхибират растежа на (А) *P. aeruginosa* и (Б) *A. baumannii*.

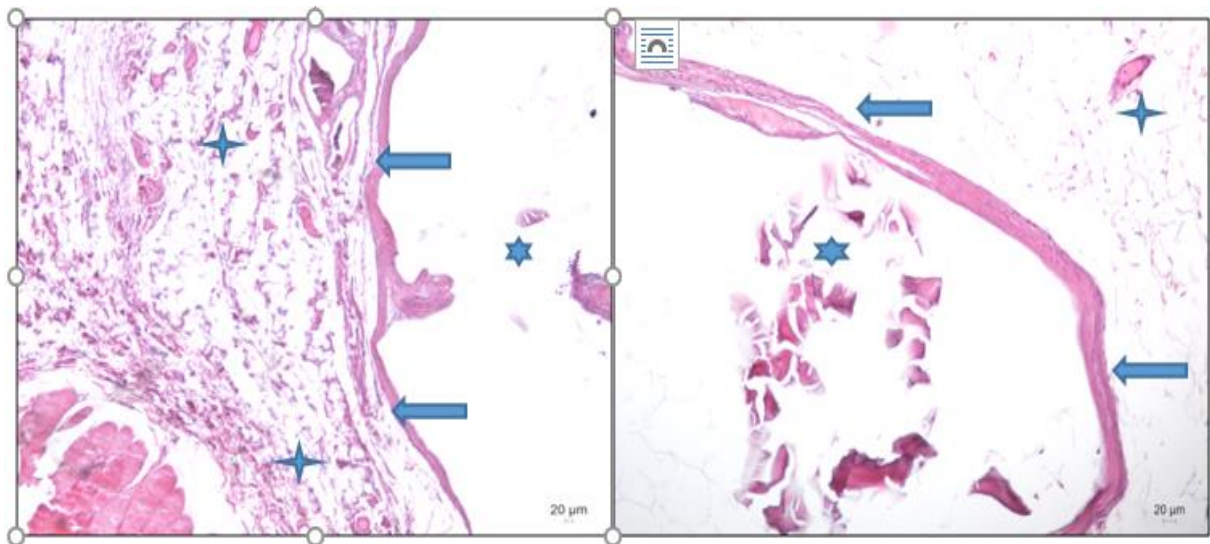
II.2.17. *In vivo* оценка на биосъвместимостта на ПСБ и ПКБ хидрогелове след имплантиране в мишки

Липсата на цитотоксичност и способността да инхибират бактериален растеж на ПСБ и ПКБ хидрогелове бяха допълнени с проведените *in vivo* изследвания върху тяхната биосъвместимост.

Две ПСБ мрежи (1ПСБ и 2ПСБ) бяха имплантирани в плъхове и резултатите от проведените хистологични изследвания са представени съответно на Фиг. 25 и Фиг. 26.

Макроскопските наблюдения на мястото около имплантираните ПСБ мрежи разкриват протичането на оздравителен процес, съпътстван от регенерация на кожата и тъканите при всички тествани животни. Около имплантираните ПСБ хидрогелове се наблюдават обичайни дермални и хиподермални структури, струпвания на мастна тъкан и колагенови влакна, характерни за процесите на заздравяване. В близост до повърхността на двата ПСБ хидрогела (1ПСБ и 2ПСБ) се наблюдават тънки влакнести капсули, съставени от колагенови влакна, фибробласти и фиброцити. Тяхното формиране се дължи на слабо изразена реакция на организма спрямо чуждото тяло. Забелязва се малка разлика в дебелината на капсулите при двата хидрогела. Колагеновите влакна са подредени успоредно едно спрямо друго, образувайки снопове. Част от влакната са хиализирани без да се наблюдават други изменения. В някои периферни влакнести тъкани и около имплантираните материали се забелязва неоваскуларизация на капилярен ендотел (Фиг. 24 и Фиг. 25).

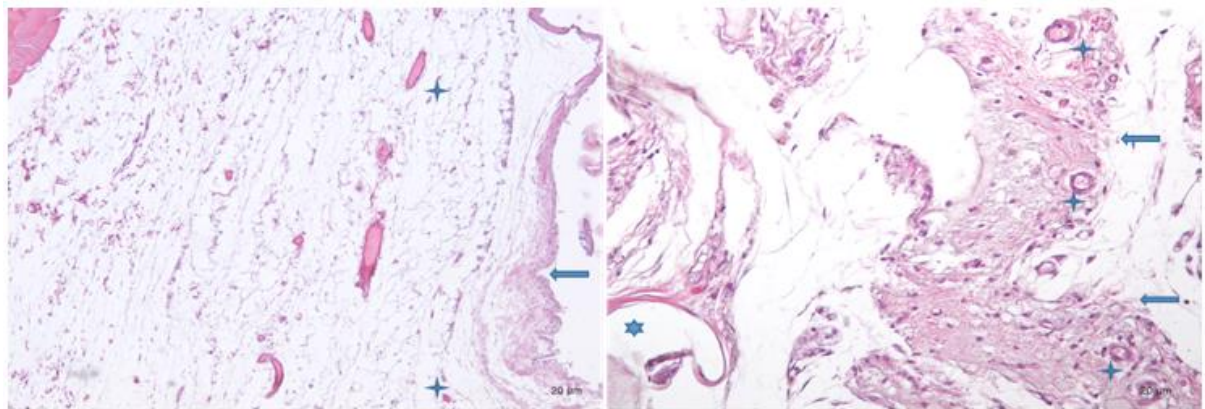
Диаметрите на новосформираните капиляри варират. Това най-вероятно се дължи на различна продължителност на времето, в което се формират. В близост до мястото, в което са имплантирани хидрогелове, се забелязват лимфоцити. Като отговор на имунната система спрямо ПСБ хидрогелове се срещат новосформирани макрофаги. Въпреки всичко не се срещат многоядрени гигантски клетки и не се забелязва повторна абсорбция и ремоделиране на имплантираните хидрогелове.



А

Б

Фигура 24. 1ПСБ хидрогел: Формиране на тънка фиброзна капсула (синя стрелка) и капиляри (звезда с четири лъча) в периферията на влакнестите тъкани и около имплантираните хидрогелове (звезда с шест лъча). А и Б показват различни области от мястото на имплантиране (Hematoxiline&Eosine, Н&Е, оцветени).



А

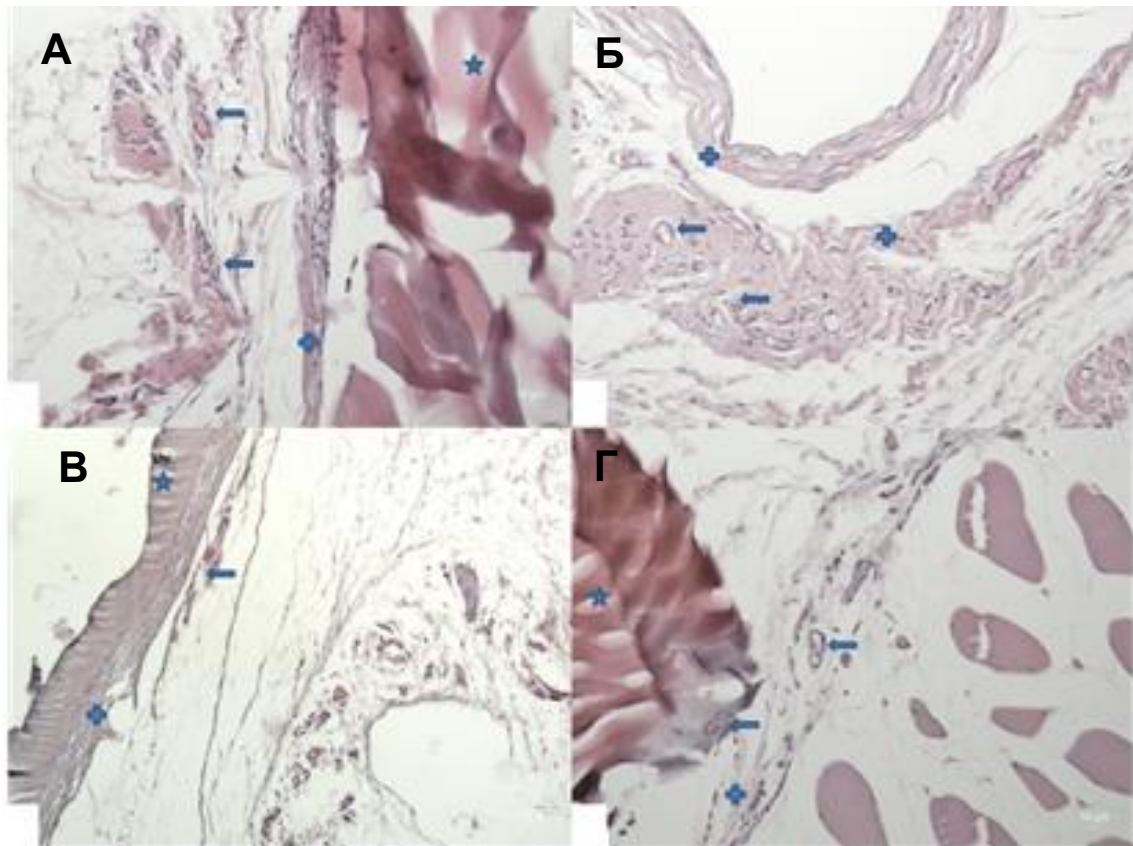
Б

Фигура 25. 2ПСБ хидрогел: (А) Умерена фиброза, при която се формират фиброзна капсула, ретикулярни нишки, съдържащи фибробласти (стрелка), и капиляри (звезда с четири лъча). (Б) Многобройни ендотелни клетки на новосформираните капиляри (звезда с четири лъча), намиращи се в непосредствена близост до имплантирания 2ПСБ (звезда с шест лъча).

Хистологията на тъканите в мястото на имплантиране на ПКБ хидрогелове са представени на Фигура 26. Имплантираните ПКБ хидрогелове (6ПКБ и 7ПКБ, звезда с пет лъча, Фиг. 26) стимулират образуването на тънки влакнести капсули. В последните се откриват фибробласти, фиброцити (■) и капиляри, чиито размери варират. Клетките, които се срещат са предимно фиброцити. Порядко се откриват лимфоцити, моноцити и плазмени клетки. Не се забелязва повторна абсорбция и ремоделиране на имплантираните хидрогелове. Прави

впечатление, че имплантираните ПКБ хидрогелове запазват своите начални размери. Липсват признаци на токсичност.

Формирането на фибозна капсула и нови кръвоносни съдове е резултат от реакциите на взаимодействие между ПЦ хидрогелове и съседните тъкани. Подобни резултати от проведени *in vivo* изследвания на други материали , , са оценени като индикация за добрата поносимост на организма към имплантите и са определени като нормална реакция на съседните тъкани, изпълняващи важна роля в процеса на зарастване на раната.



Фигура 26. (А и Б) Имплантиран 6ПКБ (звезда с пет лъча (А)) стимулиращ формирането на двуслойна тънка влакнеста капсула (■), в която се наблюдават фибробласти и фиброцити. Наличие на капиляри и други по-малки кръвоносни съдове (стрелка);(В и Г) Имплантиран 7ПКБ (звезда с пет лъча) стимулиращ формирането на тънка влакнеста капсула, в която се наблюдават фибробласти, фиброцити и множество капиляри и по-малки кръвоносни съдове.

Четири изследвани ПЦ хидрогела показват добра биосъвместимост и отговарят на първия и втория критерий на ISO 7405, което позволява ПСБ и ПКБ хидрогелове да бъдат класифицирани като материали, които: (1) не предизвикват нежелана реакция (т.е. образува се фибозна капсула в отсъствие на лимфоцити и плазмоцити) и (2) предизвикват лека нежелана реакция (наблюдават се фибозна капсула, лимфоцити и плазмоцити) до

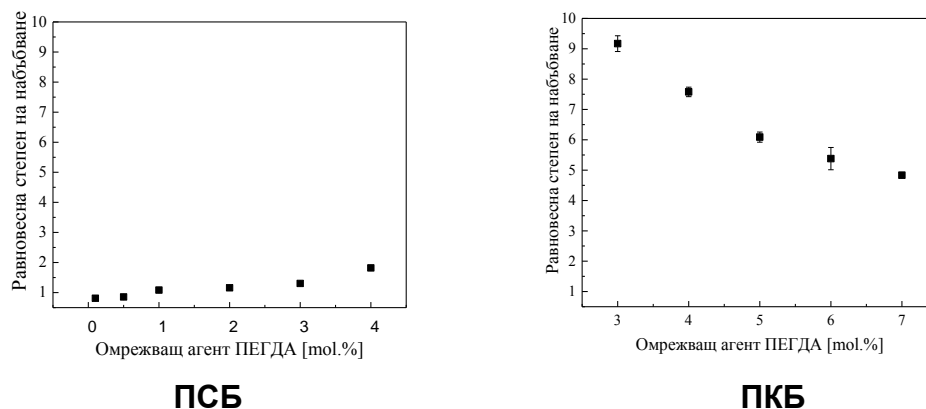
умерена реакция (образува се фиброзна капсула в присъствието на макрофаги, полиморфонуклеарни левкоцити, лимфоцити и плазмоцити).

В заключение ПЦ хидрогелове не демонстрират токсичност, което потвърждава доброто им приемане от организма и те са определят като биосъвместими материали.

II.3. Разработване на натоварени със Subtilisin DY хидрогелове на ПКБ и ПСБ с цел прилагането им като функционални превръзки за почистване на некротизиралата тъкан в хронични рани

II.3.1. РСН на единични мрежи от ПСБ и ПКБ

Следвайки процедурата за синтез на единични ПЦ мрежи, бяха получени нов сет от ПСБ и ПКБ хидрогелове, като те бяха предназначени за получаване на функционални превръзки за почистване на хронични рани. На Фигура 27 е представена зависимостта на РСН на тези мрежи от концентрацията на омрежващия агента, ПЕГДА. За ПКБ мрежите, очаквано, с увеличаването на концентрацията на ПЕГДА, тяхната РСН намалява. За ПСБ мрежите, обаче, се наблюдава слаба тенденция на нарастване. Тази тенденция може да се обясни, като се вземат предвид хидрофилността на ПЕГДА и температурната чувствителност на ПСБ мрежите – те проявяват поведение тип ГКТР с увеличаване на температурата. Макромолекулите на ПСБ при температура под ГКТР (~ 40÷50°C) са в свито състояние поради образуването на цвитерйонни цип клъстери, като последните играят ролята на термочувствителните физични възли.



Фигура 27. Зависимост на РСН на хидрогелове от ПСБ и ПКБ във вода от концентрацията на омрежващия агент ПЕГДА.

Включването на много гъвкави, дълги ($M_n \sim 575$, т.е. 10 етиленгликол мономерни единици) и хидрофилни напречни връзки от ПЕГДА нарушава частично способността на ПСБ да формира цип клъстери, т.е. формирането на химична мрежа пречи отчасти на формирането на физична мрежа от ПСБ. Ето защо, ПСБ хидрогелове леко увеличават способността си да набъбват във вода при стайна температура – защото по-големите сегменти от ПСБ веригите са свободни да набъбват и ПСБ хидрогелове се разширяват при увеличаване на концентрацията на ПЕГДА. Колкото по-висока е концентрацията на ПЕГДА, толкова по-силно е влиянието ѝ върху способността за набъбване на ПСБ хидрогелове. По този начин увеличаването на концентрацията на омрежващия

агент води до увеличаване на хидрофилността, както и до разпадане на физичната мрежа на ПСБ.

Сравнението между СН на ПСБ и ПКБ показва няколко пъти по-висока способност за набъбване на последната в сравнение с първата. По този начин може да се заключи, че при ПКБ физичните възли (т.е. цвистерйонните клъстери) са значително по-малък брой в сравнение с ПСБ. Това заключение е в съгласие с докладвания от Shao и сътрудници⁴ по-голям брой и по-дълъг живот на цвистерйонни клъстери в полисулфобетаини в сравнение с поликарбоксібетаините. Според авторите, причината е, че полисулфобетаините притежават катионни и анионни групи, които са по-близки един до друг по своята плътност на заряда в сравнение с катионните и анионните групи в поликарбоксібетаините. По този начин, склонността на цвистерйонните групи да образуват клъстери (физични възли) в ПСБ е по-висока в сравнение с тези в ПКБ и в резултат на това се образуват по-малко междуверижни цвистерйонни асоциати в ПКБ в сравнение с ПСБ. По-ниската склонност на ПКБ да формира физична мрежа определя липсата на температурна чувствителност за този ПЦ.

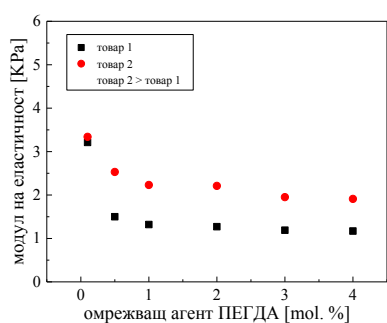
Омрежването с ПЕГДА ограничават способността за набъбване на ПКБ, т.е. води до намаляване на РСН (Фигура 27). Химичната мрежа контролира поведението при набъбване на ПКБ, за разлика от случая на ПСБ, където ролята на физичната мрежа е преобладаваща.

II.3.2 Модул на еластичност на ПСБ и ПКБ хидрогелове, определен чрез контактната теория на Херц в тяхната РСН

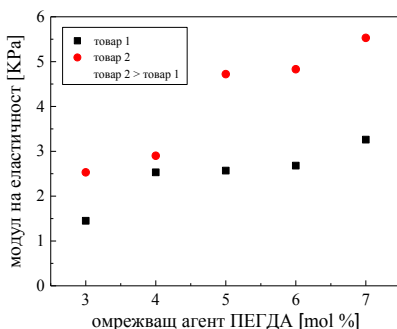
Зависимостта на модула на еластичност на ПСБ и ПКБ хидрогелове от концентрацията на ПЕГДА потвърждава изводите, направени от степента им на набъбване във вода (Фиг. 28). Известно е, че модулет на еластичност на дадена мрежа зависи от броя на химическите и/или физичните връзки в мрежата. При ПСБ хидрогелове, модулет на еластичност намалява с увеличаване концентрацията на омрежаващия агент (Фиг. 28). Тази тенденция е в унисон с разрушаването на физичните възли в състава на ПСБ с вкарването на ПЕГДА.

От друга страна, ПЕГДА формира напречни химични връзки, което води до увеличаването на гъстотата на ПКБ мрежите поради химичното им омрежване с ПЕГДА, придружено от увеличаване на техния модул на еластичност (Фиг. 28). Увеличаването степента на омрежване на ПКБ хидрогелове ограничава от една страна тяхната степен на набъбване, а от друга води до увеличаване на техния модул на еластичност (Фиг. 28).

⁴ Q. Shao, L. Mi, X. Han, T. Bai, S. Liu, Y. Li, S. Jiang "Differences in Cationic and Anionic Charge Densities Dictate Zwitterionic Associations and Stimuli Responses"; dx.doi.org/10.1021/jp503473u; J. Phys. Chem. B 2014, 118, 6956–6962



ПСБ

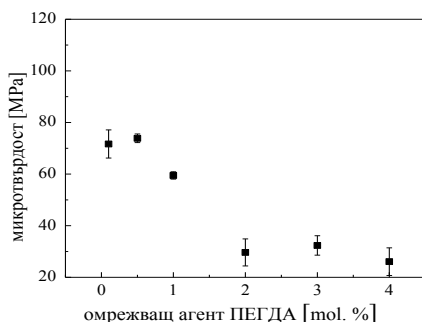


ПКБ

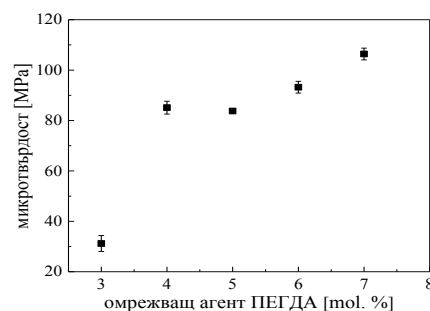
Фигура 28. Модул на еластичност, определен чрез контактната теория на Херц за ПСБ и ПКБ хидрогелове в тяхната РСН.

II.3.3. Микротвърдост на сухи мрежи от ПСБ и ПКБ

Влиянието, което степента на омрежване на ПСБ и ПКБ мрежи оказва върху микротвърдостта им е аналогично с това върху модула им на еластичност. Микротвърдостта на ПСБ мрежи намалява с увеличаване концентрацията на ПЕГДА (Фигура 29 А). Това поведение съответства с наблюдаваното намаляване на модула на еластичност (Фиг. 28) и увеличаването на степента на набъбване на ПСБ хидрогелове (Фиг. 27). То може да се обясни, както и другите две зависимости, с намаляването на присъствието на физичната мрежа на ПСБ с увеличаване концентрацията на ПЕГДА. За ПКБ, обаче, микротвърдостта нараства с увеличаване концентрацията на ПЕГДА (Фиг. 29 Б), поради нарастващия брой напречни ковалентни връзки и недотам добре застъпената фичина мрежа.



А



Б

Фигура 29. Микротвърдост на сухи мрежи на ПСБ и ПКБ.като функция от концентрацията на омрежващия агент ПЕГДА.

В заключение, резултатите, получени за трите характеристики на двете ПЦ мрежи, а именно РСН, модул на еластичност и микротвърдост показват, че увеличаването на концентрацията на ПЕГДА води до дезинтеграцията на физичната мрежа на ПСБ, което очаквано повишава нейната РСН и намалява микротвърдостта и модула ѝ на еластичност. От друга страна, при ПКБ, която проявява по-слаба склонност към образуване на физична мрежа и поради по-високите концентрации на омрежващ агент ПЕГДА, използвани за нейната

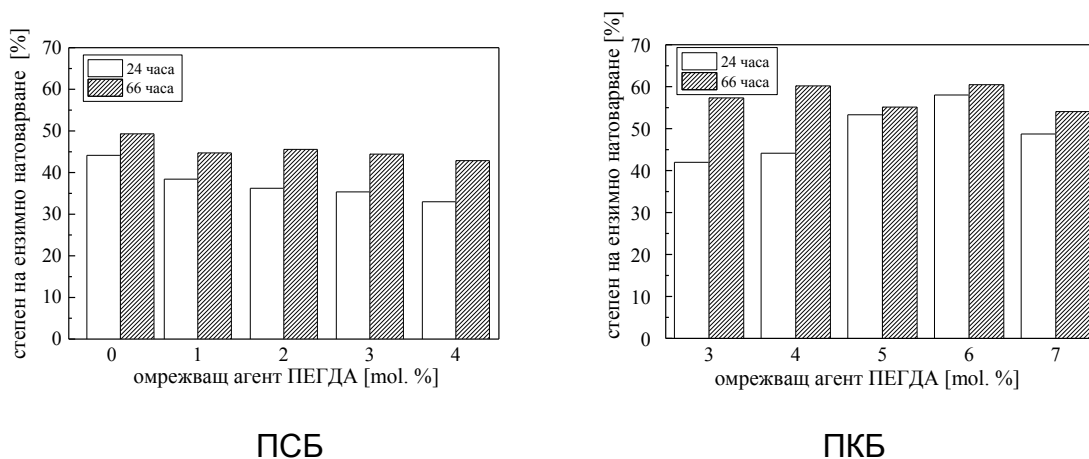
направа, се увеличава гъстотата ѝ на химично omрежване, а оттам нарастват модула на еластичност и микротвърдостта ѝ и намалява нейната РСН.

Следователно, чрез вариране концентрацията на ПЕГДА може ефективно да се контролира гъстотата на ПЦ мрежи и едновременно с това да се контролират свойствата на ПЦ хидрогелове с оглед последващото натоварване на ензим в тях.

II.3.4. Ефективност на натоварване на ПСБ и ПКБ хидрогелове със *Subtilisin DY* алкална протеаза

Охарактеризираните по-горе ПСБ и ПКБ хидрогелове бяха натоварени със *Subtilisin DY* и бе изследвана активността на натоварения в тях ензим с оглед плаираното приложение. Натоварването на ензима в ПЦ хидрогелове матрица бе осъществено чрез абсорбция на негов разтвор от сухите ПЦ мрежи. Този метод има предимството, че не променя толкова силно свойствата на имобилизиранения в полимера ензим, тъй като не налага използването на каквато и да била химична модификация.

Степента на натоварване на *Subtilisin DY* в двата типа ПЦ мрежи не зависи съществено от концентрацията на ПЕГДА, ако се използва достатъчно дълго време за натоварване (абсорбция). Максималната степен на натоварване с ензим при всички изследвани ПСБ мрежи е 45% ÷ 50%, достигната за 66 часа престой на мрежата в разтвора на ензима. За същия период от време, ПКБ мрежи демонстрират по-висока степен на ензимно натоварване - 55% ÷ 60%, което е в съгласие с тяхната по-висока хидрофилност (Фиг. 30).



Фигура 30. Степен на натоварване на *Subtilisin DY* в ПСБ и ПКБ хидрогелове.

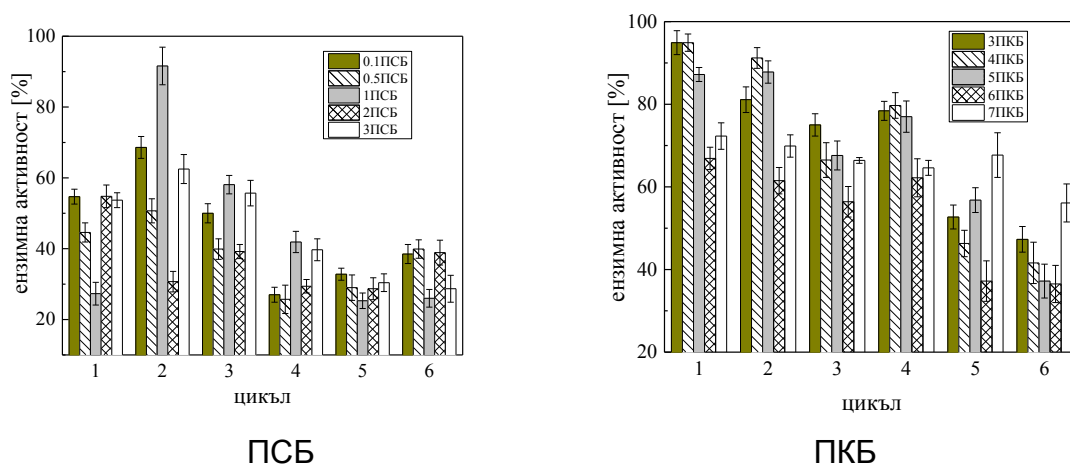
II.3.5. Ензимна активност на *Subtilisin DY* след натоварването му в ПСБ и ПКБ хидрогелове

Имобилизирането на ензими в полимерни матрици (носители) е технология, позволяваща многократното използване на ензима за по-дълъг период от време, в сравнение с приложението му в разтвор. Едновременно с това, имобилизирането предоставя възможност за по-лесното отделяне на ензима от реакционната среда. Основният проблем при имобилизирането на

ензими остава запазването на тяхната активност, което се определя в голяма степен от използваната полимерна матрица.

В настоящето изследване, *Subtilisin DY* бе имобилизиран в ПЦ хидрогелове с цел да се запази активността на ензима през целия периода на прилагане на превръзката върху раната и накрая, когато употребата ѝ вече не е необходима, т.е. раната е почистена от некротизиралата тъкан, той да бъде лесно отстранен.

И при двата типа полимерни мрежи (ПСБ и ПКБ), активността на *Subtilisin DY* постепенно намалява с всеки следващ цикъл, което е очакван резултат. В същото време, обаче, ензимът запазва висока обща активност дори в края на шестия, последен цикъл (Фиг. 31). Така например, в шестия цикъл на прилагане на субтилизина, натоварен в ПКБ, се наблюдава спад на ензимната активност до ~ 50% (Фиг. 31), докато в 1 цикъл, ензимът проявява почти 100% активност. Прави впечатление, че субтилизина, натоварен в ПКБ с най-рехавата мрежа (4ПКБ), проявява най-висока остатъчна ензимна активност - ~60%. Така, *Subtilisin DY*, натоварен в ПКБ хидрогелове, може ефективно да почиства некротизиралата тъкан в хронична рана в дълъг период от време, в който тези хидрогелове могат да бъдат прилагани като превръзки за рани.



Фигура 31. Ензимна активност на *Subtilisin DY* алкална протеаза, натоварен в ПСБ и ПКБ хидрогелове.

Активността на *Subtilisin DY*, натоварен в ПСБ, намалява от ~ 60% до ~ 30% от 1 до 6-ти цикъл на прилагането му (Фиг. 31). Разликата в активността на ензима, натоварен в ПСБ и в ПКБ може да произтича от разликата в леснотата за достъп а субстрата до натоварения в полимерната матрица ензим. Достъпът на субстрата (казеин) до ензима се очаква да е по-лесен в случая на ПКБ в сравнение с ПСБ, тъй като ПКБ мрежите са по-хидрофилни. Така, при ПСБ хидрогелове ограниченията в преноса на маса в матрицата са по-силни в сравнение с ПКБ. Ограниченията в дифузията на субстратни молекули в ПСБ матрица влияе върху максималната скорост на ензимната реакция, $V_{\text{макс}}$ (скоростта на реакцията, когато ензимът е наситен с субстрат), както и върху константата на Michaelis (концентрацията на субстрата при ниво половината от $V_{\text{макс}}$)

Основен недостатък при използването на дифузионен метод на натоварване на субтилизина е, че ензимът може да излиза извън ПЦ хидрогел във водния разтвор при осъществяване на отделните цикли. Тази възможност за физична загуба на натоварения ензим, може частично да определя наблюдаваното намаление на активността на *Subtilisin DY* в ПСБ и ПКБ хидрогелове (Фиг. 31). Въпреки това, излизането на *Subtilisin DY* извън хидрогела (превръзка за рана) и дифузията му в самата рана не се очаква да влияе отрицателно върху планираното приложение на двата типа цвитерйонни хидрогелове като превръзки за силно ексудирани рани. Излизаният от хидрогела *Subtilisin DY* ще отиде в раната, където директно ще осъществи своето действие, т.е. ще разгражда некротизирания тъкан и ще почиства раната. Това е начинът на действие на съществуващите в момента на пазара препарати за почистване на рани чрез ензимна хидролиза на некротизирания тъкан.

Ензимното почистване на рани е по-бързо и по-ефективно от автолитичното, при което се създават условия за по-нативно действие на наличните естествени ензими в самата рана да разграждат некротизирания тъкан. Препаратите за ензимно почистване на рани на пазара в момента използват ензимите като напр. колагеназа, папаин, и други протеолитични ензими за разграждане на некротизирания тъкан. Ензимното почистване се реализира най-вече чрез мехлеми, напр. такъв препарат е Santyl и гелове, напр. NexoBrid. Santyl е мехлем на основата на колагеназа, който е приложен за почистване както на хронични кожни язви, така и на силно изгорени области. Той е бързодействащ и силно селективен, тъй като разгражда само денатурирания колаген, оставяйки другите протеини незасегнати. Доказано е, че Santyl е по-ефективен по отношение на времето за заздравяване на рани, както и по отношение на клиничните и икономическите ползи в сравнение с напр. хидрогелни превръзки, които насърчават само автолитичното почистване. Тези изследвания потвърждават по-високата ефективност на протеолитичния ензим в сравнение с автолитичното почистване.

NexoBrid е под формата на прах или гел за рани, чиято функционалност се дължи на концентрат от протеолитични ензими, извлечени от стъблото на *Ananas comosus* (ананасово растение), обогатен на бромелайн. Прилага се главно за рани от изгаряне и обикновено се използва с оклузивни превръзки, които създават влажна среда за раните. Приложението на NexoBrid обаче продължава 4 часа, след което са необходими специални действия за поемане на втечените тъкани, което прави прилагането му по-сложно.

Тук е ролята на разработената от нас функционална превръзка за рани, която освен че осигурява почистващо действие чрез имобилизираните в нея ензими, може да поеме и ефективно да отнема ексудата заедно с разтворените в него продукти от протеолитичното действие на ензима.

В заключение, ПСБ и ПКБ хидрогелове, натоварени със *Subtilisin DY*, демонстрират високи нива на ензимна активност и могат да осигурят ефективно действие на протеазата дълго време, като като едновременно с това осигуряват висока степен на абсорбиране на раневия ексудат, съдържащ също продуктите от протеолитичното действие на ензима.

II.4. Синтез на ВПМ ПКБ/4ПСБ

За получаването на ВПМ 4ПКБ/4ПСБ мрежа, най-напред беше синтезирана единична 4ПКБ. За целта, към 1М разтвор на карбоксибетаин метакрилат, получен в смесен разтворител етиленгликол / етанол / H₂O (обемно съотношение 3:1:1) бяха добавени съответно 4 mol. % омержващ агент ПЕГДА, 0.665 mol.% Na₂S₂O₅ и 1,445 mol.% (NH₄)₂S₂O₈. Реакционната смес бе поставена между две стъкла, разделени със силиконов сепартор и оставена да полимеризира при 60 °C за 15 h. Така получената 4ПКБ мрежа бе пречистена от нереагиралите вещества чрез потапяне в дейонизирана вода в рамките на 2 седмици като промивните води бяха сменяни веднъж дневно.

Суха 4ПКБ мрежа беше оставена да набъбне в 1М воден разтвор на сулфобетаин метакрилат, съдържащ 4 mol. % ПЕГДА и 0.1 mol.% K₂S₂O₈ при ~5° C за 72 часа. Полимеризацията на втората мрежа протече при 60°C за 6 часа, получавайки по този начин взаимнопроникваща полимерна мрежа (ВПМ) от ПКБ/ПСБ. Нейното пречистване протече по аналогичен начин на процеса на пречистване на единичната 4ПКБ мрежа.

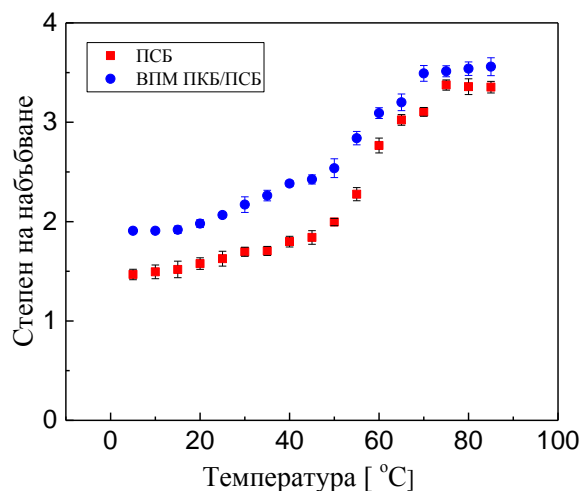
II.5. Охарактеризиране на ВПМ ПКБ/ПСБ

Известно е, че взаимнопроникващите полимерни мрежи (ВПМ) носят свойствата на полимерите, от които са получени. Това позволява получаването на полимерни материали с контролирани свойства в зависимост от приложението им. За първи път в рамките на настоящата дисертация е получена ВПМ на два ПЦ, а именно ПКБ и ПСБ. Целта бе, получената ВПМ да бъде чувствителна едновременно към три „биологични“ стимула, каквито са температурата, рН и солевата концентрация. В литературата докладваните тройно чувствителни полимерни материали са рядкост, като обикновено един от стимулите е електрично, магнитно поле или светлина.

II.5.1. Температурна чувствителност на ВПМ ПКБ/ПСБ

Както вече бе показано, единичната мрежа от ПСБ е термочувствителна и проявява поведение тип ГКТР. Ето защо, бе интересно да проверим дали ВПМ ПКБ/ПСБ също ще прояви температурна чувствителност, придадена от единия от нейните компоненти. Повишаването на температурата на водната среда, в която е поставена ВПМ води до повишаване на СН на ПКБ/ПСБ в интервала 5÷70 °C, след което се достига плато на насищане (Фиг. 32).

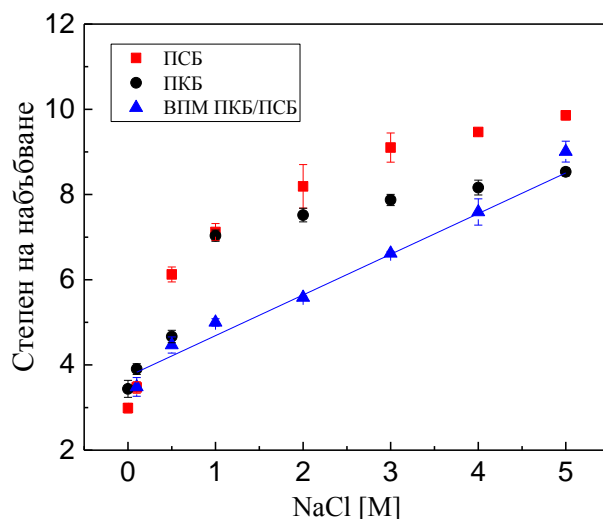
Тези данни до голяма степен следват хода на температурната чувствителност на единичната мрежа от ПСБ и потвърждават предположението, че ВПМ ПКБ/ПСБ ще проявява способност да откликва на промени в температурата на околната среда.



Фигура 32. Зависимост на степента на набъване на ВПМ 4ПКБ/4ПСБ в дейонизирана вода като функция от температурата.

II.5.2. Сол-чувствителност на ВПМ ПКБ/ПСБ

Тъй като и двата компонента на ВПМ ПКБ/ПСБ проявяват сол чувствителност, бе очаквано и тяхната ВПМ да притежава такава. На Фигура 34 е представена зависимостта на СН на ВПМ ПКБ/ПСБ от концентрацията на NaCl на водните разтвори, в които ВПМ е оставена да набъбва. ВПМ, аналогично на двете единични ПЦ мрежи проявява антиполиелектролитен ефект (Фиг. 33). При най-ниската концентрация на NaCl, 0.1M, ВПМ увеличава 3.5 пъти своята маса, докато при най-високата концентрация на солта, 5M NaCl, това увеличение е 9 пъти. Набъбването на ПКБ/ПСБ хидрогел, аналогично на единичните ПЦ мрежи се дължи на разрушаването на цип-кълъстерите под влияние нискомолекулната сол, при което ВПМ набъбва.

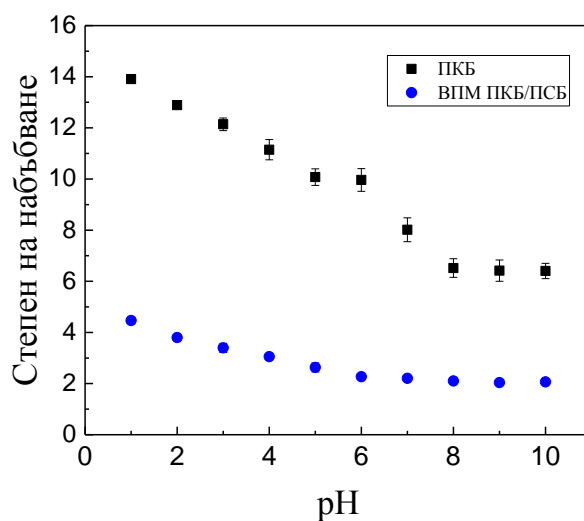


Фигура 33. Степен на набъване на ПКБ/ПСБ хидрогел като функция от концентрацията на NaCl на водните разтвори, в които ВПМ е оставена да набъбва.

За сравнение на Фигура 33 са дадени и зависимостите на СН от концентрацията на NaCl за единичните ПЦ мрежи, които изграждат ВПМ. Прави впечатление различния ход на кривите. Докато двете единични ПЦ мрежи показват криви на насищане, ВПМ показва почти линейна зависимост на своята СН от концентрацията на NaCl на водните разтвори, в които е оставена да набъбва. Така, ВПМ има по-ограничена способност да набъбва, в сравнение с единичните ПЦ мрежи. Причина за това е преплетената структура на ВПМ в сравнение с единичните мрежи – във ВПМ макромолекулите на двете съставни мрежи допълнително са оплетени помежду си, създавайки по този начин още физични възли, които от своя страна намаляват способността на ВПМ да набъбва.

II.5.3. рН чувствителност на ПКБ/ПСБ мрежи

СН на ВПМ ПКБ/ПСБ беше изследвана аналогично на тази на единичните ПКБ мрежи в рН интервала 1÷10. Тази зависимост следва хода на рН чувствителността на единичната 4ПКБ, която е съставна за ВПМ, т.е. СН е най-висока в кисела среда при рН от 1 до 6, след което достига плато на насищане. Наличието на това плато се обяснява с пълното депротониране на всички карбоксилни групи във ВПМ и възникване на същите междумолекулни взаимодействия (цип клъстери), както при единичните ПКБ мрежи (Фиг. 34).



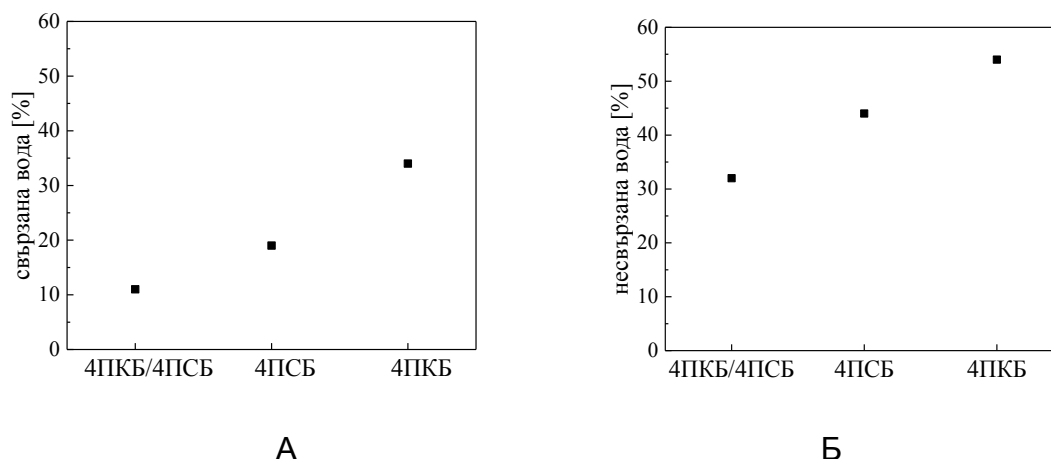
Фигура 34. рН зависимост на степента на набъбване на ВПМ ПКБ/ПСБ при 25°C.

Директното сравнение между СН на единичните ПЦ мрежи и ВПМ отново показва, че ВПМ има ограничена способност да набъбва, като обяснението е аналогично на това, дадено при сол-чувствителността – преплетената ВПМ структура. За разлика от сол-чувствителността, обаче, ходът на рН зависимостта на ВПМ е аналогичен на този за единичната ПКБ мрежа.

II.5.4. Съвързана и несвързана вода в хидрогелове на ВПМ ПКБ/ПСБ в РСН, получени при набъбване в дейонизирана вода

Способността на ВПМ ПКБ/ПСБ хидрогел, достигнал своята РСН в дейонизирана вода, да свързва вода бе изследвана с помощта на ДСК и

сравнена с поведението на хидрогелите на единичните (4ПСБ и 4ПКБ) мрежи. От получените резултати се вижда, че свързаната вода във ВПМ ПКБ/ПСБ е около ~ 11 % (Фиг. 35). Този процент е най-нисък в сравнение с получените стойностите за „свързана“ вода при 4ПСБ и 4ПКБ, съответно 22 % и 34 %.

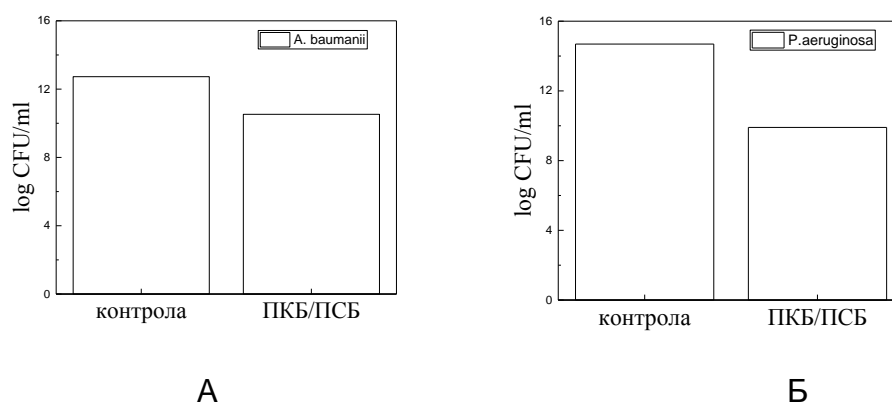


Фигура 35. (А) Свързана и (Б) несвързана вода в хидрогелове на ВПМ 4ПКБ/4ПСБ, 4ПСБ и 4ПКБ в тяхната РСН във вода.

Аналогично, количеството несвързана вода във ВПМ отово е най-ниското в сравнение с двете единични ПЦ мрежи. Причината е отново в голямата гъстота на ВПМ ПКБ/ПСБ, която абсорбира по-малко количество вода и оттам двете количества на несвързана и свързана вода са по-малки.

II.5.5. Способност на ПКБ/ПСБ хидрогел да инхибира формирането на бактериален биофилм

Способността на хидрогелите на ВПМ ПКБ/ПСБ да инхибират най-често срещаните в хроничните рани бактериални щамове бе изследвана и сравнена с тази на единичните ПЦ мрежи (Фиг. 36А и Б). И при двата бактериални щам, хидрогелите на ВПМ ПКБ/ПСБ намаляват броя на образуваните бактериални колонии в сравнение с данните, получени за контролата (празна проба без хидрогел).

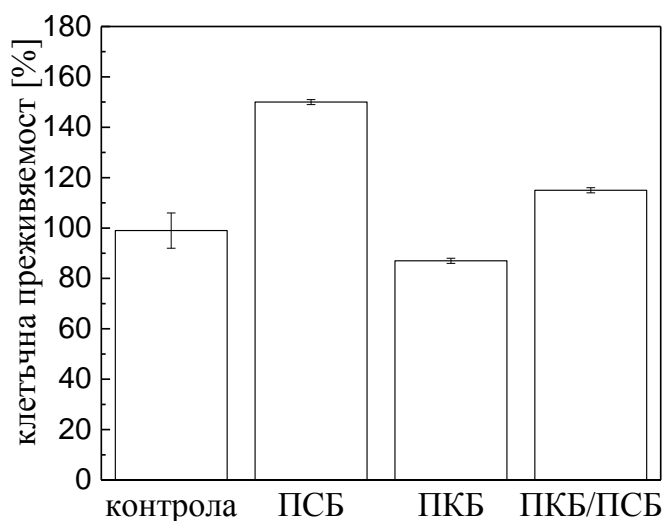


Фигура 36. Способност на ВПМ ПКБ/ПСБ хидрогел да инхибира растежа на (а) *A.baumani* и (Б) *P. aeruginosa*.

В обобщение може да се заключи, че демонстрираната от хидрогелите на ВПМ ПКБ/ПСБ способност да инхибира образуването на биофилм от изследваните два бактериални щама показва, че те успешно могат да бъдат използвани като материал за наравата на превръзка за лечение на хронични рани.

II.5.6. Цитотоксичност на ПКБ/ПСБ хидрогел

Цитотоксичността на ПКБ/ПСБ хидрогел беше изследвана и сравнена с тази на единичните ПСБ и ПКБ мрежи спрямо ембрионални клетки от клетъчната линия LEP 3, използвайки МТТ тест. Получените резултати показват, че хидрогелите на ВПМ ПКБ/ПСБ не са цитотоксични. Преживяемостта на клетките след контакт с ПКБ е ~ 85 %, докато при ПСБ и ПКБ/ПСБ е > 100% (Фиг. 37), т.е. осъществява се клетъчно делене и пролиферация.



Фигура 37. Клетъчна преживяемост на ембрионални клетки LEP 3 в присъствие на хидрогелове на ПСБ, ПКБ и ВПМ ПКБ/ПСБ, определена чрез МТТ тест.

III. Изводи

1. ПСБ, ПКБ демонстрират добър потенциал като превръзки за хронични, тъй като те успешно:
 - абсорбират раневия ексудат, като при това
 - увеличават размера си и по този начин не създават дискомфорт на пациента и не нарушават процеса на зарастване на раната
 - намаляват концентрацията на колагеназа в раната, без да
 - инхибират напълно активността ѝ, което благоприятства процеса на зарастване на раната
 - инхибират образуването на бактериални биофилми в хроничните рани
 - прилепват плътно върху раната
 - не са цитотоксични и
 - са биосъвместими
2. Subtilisin DY е успешно имобилизиран в ПСБ и ПКБ хидрогелове, при което ензимът запазва своята ензимна активност. Това позволява в перспектива разработването на нови функционални превръзки за рани, способни да почистват некротизиралата тъкан.
3. За пръв път е синтезирана ВПМ от ПКБ и ПСБ, за която бе доказано, че:
 - е едновременно чувствителна към промяна в рН, температура и солева концентрация
 - инхибира образуването на бактериален биофилм за *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*
 - не е цитотоксична.

IV. Списък с научните публикации:

1. K. Ruseva, P. Nedkov, R. Alexandrova, D. Dinev, P. Shestakova, P. Hristov and E. Vassileva
Polyzwitterionic hydrogels as wound dressings with enzymatic debridement functionality for highly exuding wounds,
Polym. Int. (2019), DOI 10.1002/pi.5867 (IF 2.352)
2. K. Ruseva, K. Ivanova, K. Todorova, M. Gabrashanska, D. Hinojosa-Caballero, Tz. Tzanov, E. Vassileva
Poly(sulfobetaine methacrylate)/poly(ethylene glycol) hydrogels for chronic wounds management,
Eur. Pol. J. (2019) 117 (2019) 391–401 (IF 3.621)
3. K. Ruseva, K. Ivanova, K. Todorova, I. Vladov, V. Nanev, Tz. Tzanov, D. Hinojosa-Caballero, M. Argirova, E. Vassileva
Antibiofilm poly(carboxybetaine methacrylate) hydrogels for chronic wounds dressings,
подадена за публикуване

V. Списък с изяви на научни форуми за периода 02.2016 - 12.2019 г.

1. К.Русева, С.Мецов, П. Шестакова, А.Апостолов, Е. Василева

„Карбоксибетаинови мономери, полимери и мрежи – синтез и охарактеризиране“

Устен доклад на XV Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Софийски университет 18 - 20 май 2016 г.

2. Русева, Б. Йерусалимова, С. Мецов, П. Шестакова, Е. Василева

“Цвитерйонни полимерни мрежи – синтез, охарактеризиране и приложение за имобилизиране на протеази ”

Устен доклад на ежегоден семинар на катедра Приложнаорганична химия, 3-5 юни 2016 г., Гьолечица, България.

3. К.Русева, С.Мецов, П.Шестакова, Е. Василева

„ Имобилизирание на протеаза в карбоксибетаинови полимерни хидрогелове“

Постер, представен на Седма научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, институт по полимери БАН, 9 юни 2016 г., София, България.

4. Ruseva, S. Metsov, P. Shestakova, E. Vasileva

„ Polyzwitterionic hydrogels for immobilization of alkaline protease“

Постер, представен на XVIII Национален симпозиум по полимери, Сесия, посветена на 80та годишнина на Професор Стойко Факиров, 28-29 септември 2016 г., София, България

5. K. Ruseva, K. Ivanova, T. Tzanov, E. Vassileva

“ Zwitterionic polymers for chronic wound management”

Poster, presented at 253rd American Chemical Society, NATIONAL MEETING & EXPOSITION, Advanced Materials, Technologies, Systems & Processes, APRIL 2-6, 2017, San Francisco, CA.

6. К.Русева, К. Иванова, Ц. Цанов, Е. Василева

„Полицвитерйонни хидрогелове за лечение на рани“

Устен доклад на XVI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Софийски университет 17 - 19 май 2017 г.

7. К.Русева, К. Иванова, Ц. Цанов, Е. Василева

„Полицвитерйонни хидрогелове като превръзки за рани“

Устен доклад представен на Научен семинар на катедра Приложна органична химия, 9-11 юни 2017, Гьолечица, България

8. К.Русева, К. Иванова, Ц. Цанов, Е. Василева

„Антибактерилна и биофилмобразуваща способност на полицвитерйони“

Постер, представен на Осма научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, институт по полимери БАН, 1 юни 2017, София, България

9. K. Ruseva, K. Ivanova, T. Tzanov, E. Vasileva

„Intelligent zwitterionic polymers as potential wound dressings”

Постер, представен на научна сесия, посветена на 130-годишнината на Софийския университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по Химия и Фармация, 23 ноември 2018 г., София, България.

10. K.Ruseva, K.Ivanova, K.Todorova, M. Gabrashanska, Tz. Tzanov, E. Vassileva

“ Smart zwitterionic hydrogels as wound dressings in chronic wound therapy”

Доклад, представен на заключителната конференция „ Chemistry Today for Tomorrow”, 1 февруари 2019 г., София, България.

11. Констанс Ружева, Катерина Тодорова, Маргарита Габрашанска, Петър Недков, Павлета Шестакова, Елена Василева

„Цвитерйонни хидрогелове с протеолитична активност за лечение на хронични рани“

Устен доклад на XVIII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, Софийски университет 15 - 17 май 2019 г.

12. Konstans Ruseva, Kristina Ivanova, Katerina Todorova, Margarita Gabrashanska, Tzanko Tzanov, ElenaVassileva

“ Stimuli-responsive zwitterionic dressings for chronic wounds management ”

Доклад, представен на Международна конференция за функционални хидрогелове за биомедицинско инженерство, 27 - 28 май 2019 г., Токио, Япония.

13. Konstans Ruseva, Kristina Ivanova, Katerina Todorova, Margarita Gabrashanska, Tzanko Tzanov, ElenaVassileva

„ Development of zwitterionic wound dressings for chronic wounds management “

Устен доклад представен на Научен семинар на катедра Приложна органична химия, 31 май – 2 юни 2019, Гьолечица, България.

14. Konstans Ruseva, Kristina Ivanova , Elena Vassileva, Tzanko Tzanov

“Potential of zwitterionic based hydrogels in chronic wound management ”

Постер, представен на Десета научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, институт по полимери БАН, 6 юни 2019 г., София, България.

15. Konstans Ruseva, Nicolas Sanson, Elena Vassileva

„Temperature and salt- responsive zwitterionic polyelectrolyte complexes“

Постер, представен на 19-ти Национален симпозиум с международно участие „Полимери 2019“, 9-12 септември 2019 г. в гр. Поморие.

16. Konstans Ruseva, Nicolas Sanson, Elena Vassileva

„Triple stimuli responsive zwitterionic polyelectrolyte complexe designed for drug delivery system“

Постер, представен на XI Научна сесия на Факултета по химия и фармация, 28.11.2019 г., София, България.