

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»**

На правах рукописи

Иванова Нина Михайловна

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРЕКОВОЙ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КЕРАТОПЛАСТИКЕ**

Специальность:

05.11.17 Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научные руководители:

д. ф.-м. н.

профессор В. Ф. Пичугин

д. ф.-м. н.

профессор Ю. Ю. Крючков

Томск – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1. Литературный обзор.....	11
1.1. Этиопатогенез буллезной кератопатии.....	11
1.2. Принципы лечения буллезной кератопатии.....	12
1.2.1. Хирургические методы лечения.....	13
1.2.2. Полимерные материалы в кератопластике.....	14
1.2.3. Полимерные материалы в лечении буллезной кератопатии	15
1.2.4. Использование клеточной терапии	16
1.3. Использование биорезорируемых материалов в медицине.....	20
1.4. Полилактид	21
1.5. Трековые мембраны и основные принципы их получения	24
1.6. Полимерные трековые мембраны и перспективы их использования в кератопластике	26
1.7. Выводы по 1 главе.....	28
Глава 2. Материалы и методы исследования	29
2.1. Плёнки полилактида	29
2.2. Трековые мембраны на основе плёнки полилактида	29
2.5. Методы изучения физических свойств материалов на основе полилактида...	34
2.5.1. Растровая электронная микроскопия	34
2.5.2. Атомно-силовая микроскопия	34
2.5.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	35
2.5.4. Исследование смачиваемости и свободной энергии поверхности	36
2.5.5. ИК-спектроскопия.....	37
2.5.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния.....	38
2.5.7. Оптическая спектроскопия в видимом диапазоне света.....	39

2.5.8. Методика исследования механических характеристик плёнки полилактида	39
2.6. Определение среднего диаметра пор и проницаемости ТМ методом “точка пузырька”	40
2.7. Ускоренная деградация плёнки полилактида	41
2.7.1. Анализ молекулярно-массовых характеристик плёнки полилактида ...	42
2.8. Исследование цитотоксичности полученных мембран	43
2.9. Медико-биологические исследования <i>in vivo</i>	43
2.10. Методы статистической обработки экспериментальных данных.....	46
Глава 3. Структурные особенности и физико-химические свойства плёнки полилактида	48
3.1. Морфология поверхности плёнки полилактида по данным РЭМ	48
3.2. Морфология поверхности: шероховатость плёнки полилактида.....	49
3.3. Контактный угол смачивания и поверхностная энергия плёнки полилактида	52
3.4. Исследование структуры и молекулярного состава плёнки полилактида методами комбинационного рассеяния света и ИК спектроскопии.....	53
3.5. Теплофизические свойства и степень кристалличности полимерных плёнок полилактида	56
3.6. Исследование оптических свойств плёнки полилактида	57
3.7. Механические свойства плёнки полилактида	58
3.8. Определение влияния особенностей строения плёнки полилактида на процесс биodeградации	60
3.9. Изменения молекулярной массы плёнки полилактида	61
3.10. Выводы по 3 главе.....	63
Глава 4. Получение и исследование трековых мембран на основе плёнки полилактида	64

4.1. Облучение тяжёлыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ плёнки полилактида	64
4.2. Травление исходной плёнки полилактида.....	66
4.2.1. Травление плёнки полилактида после облучения тяжёлыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$	69
4.2.2. Оценка диаметра пор трековых мембран на основе плёнки полилактида, полученных на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$	71
4.3. Исследование структуры и свойств биорезорбируемой трековой мембраны на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$	74
4.4. Трековые мембраны, полученные облучением плёнки полилактида ионами $^4\text{He}^{2+}$	86
4.5. Исследование структуры и свойств биорезорбируемой трековой мембраны на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$	90
4.6. Сравнительный анализ трековых мембран на пучках ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$..	98
4.7. Результаты исследования цитотоксичности полученных мембран.....	100
4.8. Биосовместимость разработанной биорезорбируемой трековой мембраны на основе плёнки полилактида на биологических моделях <i>in vivo</i>	102
4.9. Выводы к 4 главе	114
Перечень принятых сокращений	116
Благодарности.....	117
Список литературы	118
Приложение А Акт внедрения в учебном процессе результатов диссертационной работы.....	135
Приложение Б Акт внедрения в научную деятельность результатов диссертационной работы.....	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы диссертационной работы.

Буллезная кератопатия является ведущей причиной корнеального слабовидения на территории Российской Федерации в течение последних лет. В основе заболевания лежит нарушение функции эндотелиального слоя роговицы, что способствует развитию отека роговой оболочки, снижению зрения, появлению рецидивирующих эрозий и выраженного болевого симптома. Методы консервативного и хирургического лечения данного заболевания, предложенные на сегодняшний день, не всегда позволяют достичь эффективных и стабильных результатов.

Использование стволовых клеток, например, моноклеаров клеток крови, обладающих функциональной полипотентностью и высокой приспособляемостью, считается наиболее перспективным методом лечения. В то же время, процесс культивирования и подсаживания стволовых клеток на внутреннюю поверхность роговой оболочки с целью дальнейшего замещения эндотелиального дефекта требует использования специально разработанных подложек в связи с риском потери клеток в ходе манипуляций. Поэтому, необходимо создать шероховатую площадку для лучшей адгезии клеток и пористую структуру полимера, чтобы не ограничивать питание роговицы передней камеры глаза. Такую роль могут выполнять трековые мембраны, которые благодаря своим уникальным характеристикам, таким как возможность варьирования размеров пор и их количество на единицу площади в зависимости от функционального назначения, малая дисперсия пор по размерам, низкий уровень дефектности, высокая селективность могут создавать площадку для клеточного крепления и обеспечить питание тканей роговой оболочки.

На сегодняшний день в качестве полимерной матрицы для создания трековых мембран (ТМ) используют плёнки из поликарбоната (ПК), полиэтилентерефталата (ПЭТФ), полиимида (ПИ), полипропилена (ПП), полиэтиленафталата (ПЭНФ), фторированных полимеров (поливинилиденфторида). Каждый из указанных полимеров имеет свои преимущества и недостатки, а также отработанную

методику создания однородной пористой структуры методом ионно-трековой технологии. Однако в плане возможности применения мембраны в качестве временной клеточной подложки, указанные полимеры имеют один существенный недостаток – они нерастворимы в водной среде. В связи с этим, разработка трековых мембран (ТМ) на основе биоразлагаемых полимеров с контролируемым сроком деградации в качестве основы роста клеток, посаженных *in vivo*, и использование их для восстановления и нормализации гидратации роговицы, становится крайне актуальным направлением в медицинском материаловедении.

Цель диссертационного исследования: Получение трековой мембраны на основе полилактида как биорезорбируемого роговичного имплантата для кератопластики.

Для достижения поставленной цели в диссертации сформулированы и решены следующие **задачи:**

1. Получить биорезорбируемые тонкие плёнки на основе полилактида из раствора и изучить их структуру, физико-химические и механические характеристики.
2. Получить сквозные поры в плёнках полилактида, облученных пучком заряженных ионов ($^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$) посредством химического травления и выявить их размеры для полученных биорезорбируемых трековых мембран.
3. Исследовать морфологию поверхности и структуру полученных трековых мембран на основе плёнки полилактида, определить их функциональные характеристики.
4. Провести медико-биологические исследования полученных трековых мембран (ТМ) *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна диссертационной работы:

1. Установлена зависимость диаметра сквозных пор в биорезорбируемых плёнках полилактида толщиной $(15,5 \pm 0,5)$ мкм облучённых пучками тяжелых или легких ионов ($^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$) от времени травления (от 10 до 30 минут) в 1 молярном водном растворе гидроксида натрия температурой $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

2. Показано, что полученные при равных условиях травления (время, концентрация, температура) трековые мембраны на основе облученной плёнки полилактида пучком ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с диаметром пор 0,7 мкм и плотностью $(3,2 \pm 0,4) \times 10^6$ пор/см² обладают оптимальным коэффициентом пропускания видимой области света (выше 92%) и более высокой прозрачностью по сравнению с трековыми мембранами на основе облученной плёнки полилактида пучком ионов $^4\text{He}^{2+}$ с диаметром пор 0,56 мкм и плотностью $(0,062 \pm 0,030) \times 10^6$ пор/см².

3. Установлено, что разработанные биорезорбируемые трековые мембраны на основе плёнки полилактида не оказывают цитотоксического действия, биоинертны, что позволяет использовать их в качестве материала имплантата для кератопластики в доклинических исследованиях *in vivo*.

Теоретическая значимость работы заключается в развитии понимания физико-химических процессов, протекающих в биорезорбируемых полимерных плёнках на основе полилактида после облучения пучком тяжелых ионов ксенона $^{132}\text{Xe}^{23+}$ или лёгких ионов $^4\text{He}^{2+}$ и последующего их щелочного травления.

Практическая значимость работы.

1. Полученные в работе тонкие плёнки на основе полилактида методом разлива применяются для выполнения научно-исследовательского проекта в НОЦ им. Б.П. Вейнберга ТПУ для изготовления мембран с целью применения их в офтальмологии. Подтверждено актом внедрения.

2. Разработана технология получения биорезорбируемых трековых мембран из плёнок полилактида посредством облучения потоком заряженных ионов ($^{132}\text{Xe}^{23+}$ с энергией 160 МэВ, $^4\text{He}^{2+}$ с энергией 28 МэВ) и последующим щелочным травлением в 1 молярном водном растворе гидроксида натрия.

3. Полученные биорезорбируемые трековые мембраны на основе плёнки полилактида могут быть использованы в качестве роговичного имплантата для кератопластики в доклинических исследованиях *in vivo*.

Методология и методы исследования. В диссертационной работе для изучения физико-химических свойств полимерной плёнки и трековых мембран на

основе плёнки полилактида применялись следующие методы исследования: растровая электронная микроскопия (РЭМ), атомно-силовая микроскопия (АСМ), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), метод сидячей капли и измерение поверхностной энергии, гель-проникающая хроматография, ИК-спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния, поропроницаемость, а также метод одноосного испытания на растяжение.

Медико-биологическое обоснование применения трековых мембран на основе полилактида в кератопластике проведено с помощью исследований *in vivo*, *in vitro*. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft).

Положения, выносимые на защиту.

1. Облучение плёнки полилактида тяжелыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с энергией 1,2 МэВ/нуклон (160 МэВ) флюенсом $3,1 \times 10^7 \text{ см}^{-2}$ формирует в материале латентные треки, травление которых в 1 молярном водном растворе гидроксида натрия позволяет получать биорезорбируемые трековые мембраны с диаметром пор от 0,6 мкм до 1,5 мкм.

2. Облучение плёнки полилактида потоком ионов $^4\text{He}^{2+}$ с энергией 7,0 МэВ/нуклон (28 МэВ) флюенсом $1,3 \times 10^{13} \text{ см}^{-2}$ с последующим травлением в 1 молярном водном растворе гидроксида натрия при температуре $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ позволяет получить поры диаметром от 0,46 мкм до 0,65 мкм.

3. При одинаковых условиях травления в 1 молярном водном растворе гидроксида натрия при температуре $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15 минут плёнок облученных разными типами ионов, получают трековые мембраны с краевым углом смачивания $\theta = 70^\circ - 73^\circ$, при этом трековые мембраны на пучке $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с диаметром пор 0,7 мкм обладают более высоким значением коэффициента пропускания света (92 – 96%) в области видимого спектра и шероховатостью 18 нм, чем трековые мембраны на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ с диаметром пор 0,5 мкм, коэффициентом пропускания света (88 – 91%) и шероховатостью 7,5 нм.

4. Трековые мембраны, полученные при облучении плёнки полилактида ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$ с последующим травлением в 1 молярном водном растворе

гидроксида натрия при температуре $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$, не оказывают цитотоксического действия на изолированную культуру лейкоцитов крови и могут быть использованы для проведения статистически достоверных исследований *in vivo* в качестве материала имплантата для кератопластики.

Достоверность результатов обеспечивается использованием современного оборудования и методов исследования, их физико-технической и медико-биологической обоснованностью, согласованием экспериментальных результатов с литературными данными и отсутствием противоречий между полученными данными и результатами других авторов.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены при личном участии автора. Им же осуществлены: выбор методов решения поставленных задач, подготовка полимерных плёнок и разработка трековых мембран, проведение и анализ полученных результатов экспериментальных исследований, апробация результатов на международных конференциях. Постановка задач и анализ результатов выполнены совместно с научным руководителем и соавторами опубликованных работ.

Реализация результатов работы. Результаты работы были использованы при выполнении научно-исследовательских работ по договору ГПХ № 21787 от 26.10.2018 по проекту ВИУ-НОЦ Б.П. Вейнберга-210/2018, а также внедрены в учебный процесс Инженерной школы ядерных технологий, НОЦ Б.П. Вейнберга ТПУ при изучении дисциплины «Плазменные технологии в биологии и медицине» в разделе «Использование ускорителей заряженных частиц в онкологии и для создания мембран» студентами специальности «14.03.02 Ядерная физика и технологии».

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы обсуждались во время представления устных докладов на следующих конференциях: Международной научно-технической молодежной конференции «Перспективные материалы конструкционного и функционального назначения» (Россия, г. Томск, 2020); Eighth International conference on radiation in various fields of research. Virtual conference, (Herceg Novi, Montenegro, 2020); Международной

конференции «Перспективные материалы с иерархической структурой для новых технологий и надежных конструкций» (Россия, г. Томск, 2019), 14th International Conference "Gas Discharge Plasmas and Their Applications" GDP 2019 (Russia, Tomsk, 2019), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Россия, г. Томск, 2018, 2019, 2020), International conference «Materials science of the future: research, development, scientific training (MSF'2019)» (Russia, Nizhni Novgorod, 2019), VIII Международной молодежной научной школе-конференции «Современные проблемы физики и технологий» (Россия, г. Москва, 2019).

Публикации. Результаты диссертационной работы изложены в 21 научных публикациях, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК России, 6 статей в журналах, входящих в базу данных SCOPUS и Web of Science.

Структура и объём диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка используемых источников, включающего 154 наименования. Полный объём работы – 136 листов машинописного текста, в том числе 65 рисунков и 12 таблиц.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Этиопатогенез буллезной кератопатии

На сегодняшний день одной из актуальных проблем здравоохранения во всем мире являются болезни глаз. Согласно опубликованным данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на октябрь 2019 г., от различных нарушений зрения страдает не менее 2,2 миллиардов человек, из которых 39 миллионов поражены слепотой [1]. Ведущими причинами нарушения зрения являются миопатия, глаукома, катаракта, травмы и повреждения роговицы [2, 3].

На территории Российской Федерации распространённой причиной слабосвидения является глаукома, вторичная эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы (ЭЭД) и буллезная кератопатия. Согласно современным представлениям, в развитии буллезной кератопатии существенную роль играют первичные и вторичные процессы дегенеративного и инфекционного характера роговой оболочки, травмы, а также осложнения после хирургического вмешательства при лечении катаракты и глаукомы [4]. В основе заболевания

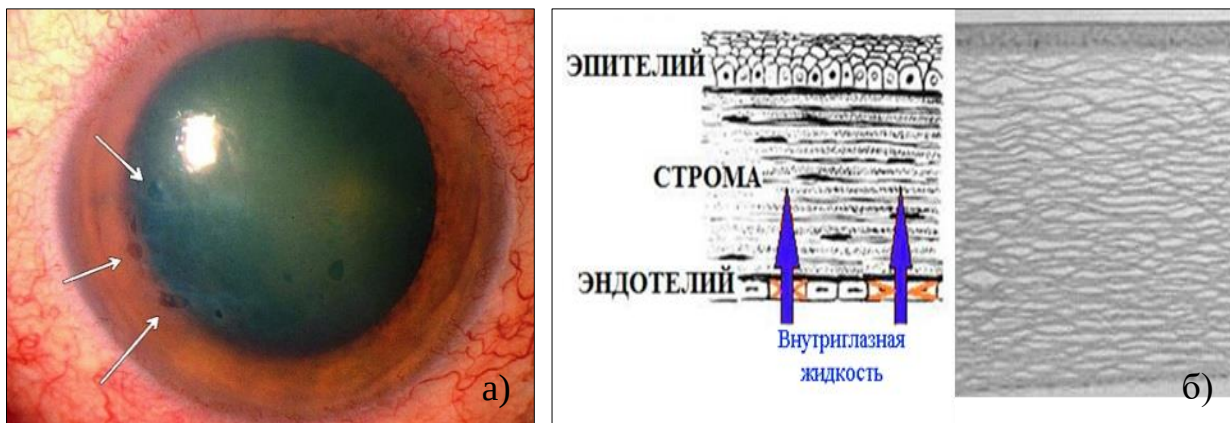


Рисунок 1.1 – Отёк и булла роговой оболочки больного с буллезной кератопатией (а) и механизм протекания болезни (б)

лежит нарушение функционирования эндотелиальной оболочки роговицы, что, в свою очередь, приводит к пропитыванию стромы внутриглазной жидкостью,

распространению отека и, как следствие, нарушению прозрачности роговицы и снижению зрения (рисунок 1.1). С течением времени на передних эпителиях возникают шероховатости и буллы, что сопровождается болезненностью и светобоязнью (роговичный синдром) [5].

1.2. Принципы лечения буллезной кератопатии

Лечение буллезной кератопатии является крайне сложной задачей и во многом определяется причиной и стадией заболевания [6], что объясняет все многообразие предлагаемых методов терапии. На сегодняшний день различают консервативные и оперативные методы лечения, а также их комплексное использование.

Консервативное лечение приемлемо только на начальных стадиях заболевания. Оно включает в себя:

- 1) использование мягких гидрофильных контактных линз - способствует эпителизации роговицы, купированию болевого синдрома [7];
- 2) роговичный кросслинкинг - способствует укреплению роговичного вещества, «склеиванию» роговичных волокон путем катализации естественных окислительных процессов в присутствии рибофлавина (витамин В₂) с помощью ультрафиолетового излучения [8-9];
- 3) лазерное излучение - способствует созданию фиброцеллюлярной мембраны, которая обеспечивает более плотную адгезию эпителия и устраняет буллезные изменения [10] (следствием воздействия лазерного излучения является изменение клеточного матрикса в поверхностных слоях стромы);
- 4) антиоксиданты, антигипоксанты, гипертонические капли и мазь (Muro 128, 5%) витамины и т.д. для улучшения обменных процессов в роговице [6, 11, 12].

Однако медикаментозное лечение является нестабильным и не устраняет причину заболевания, а только замедляет её развитие. Это обусловлено низкой пролиферативной активностью клеток эндотелиального слоя и быстрым ростом необратимых дистрофических процессов в роговице из-за избыточной гидратации, что приводит к ее повторному помутнению [13]. Тем не менее использование

данной терапии рекомендуется в качестве дополнения к более эффективным хирургическим методам лечения, так как их совместное воздействие способствует быстрому восстановлению после хирургических манипуляций.

1.2.1. Хирургические методы лечения

Хирургическое лечение направлено на устранение причины заболевания и восстановление прозрачности роговицы и по большей части носит трансплантационный характер.

На сегодняшний день в зависимости от глубины удаления измененной роговицы выделяют 4 основные группы метода проведения кератопластики:

- сквозная – удаляются все слои роговицы;
- послойная – удаляются передние или задние слои роговицы на необходимую глубину (например, задняя криопексия роговицы (ЗКР) и т.д.) [13];
- послойно-сквозная – удаляются слои разного диаметра как передней, так и задней частей роговицы;
- межслойная – роговица расслаивается, и в полученный роговичный карман помещается донорский трансплантат (например, интрастромальная имплантация амниотической мембраны) [14-15].

Несмотря на огромное количество методов лечения буллезной кератопатии, сквозная кератопластика является наиболее эффективным способом восстановления остроты зрения. Она включает в себя замену паталогически изменённого эндотелия роговицы реципиента на здоровую роговицу донора (умершего человека), которая является единственным материалом, способным прижиться прозрачно и вернуть зрение больному. Такая пересадка тканей называется аллотрансплантацией и требует качественного донорского материала [16]. Однако забор, заготовка, условия хранения качественного биологического материала являются сложно решаемой задачей в трансплантации роговицы во всем мире, поскольку имеют ряд ограничений как в юридическом, так и в медицинском плане. На сегодняшний день процесс пересадки роговицы и роговичных лоскутов

должен соответствовать правилам и условиям, установленным законом Российской Федерации от 22 декабря 1992 г. N 4180-1 "О трансплантации органов и (или) тканей человека".

С целью упрощения и улучшения процесса восстановления зрения, научные группы вместе с офтальмологами занимаются поиском и разработкой искусственных материалов на основе полимеров для дальнейшего применения в качестве кератоимплантатов.

1.2.2. Полимерные материалы в кератопластике

Первые упоминания полимерных материалов в кератопластике относятся к середине 60-х годов XX века. Испанский офтальмолог Барракер Монер и его команда впервые использовали аллопластическую линзу из целлоидина во время интрастромальной имплантации. Однако возникновение у пациентов помутнений роговой оболочки в послеоперационный период и выраженной неоваскуляризации роговицы сделало использование целлулоидных линз в офтальмологии невозможным [17].

Исследования новых материалов для разработки искусственной роговицы глаза, а также поиски оптимальной техники проведения операций продолжились и в последующие годы. Это способствовало появлению различных искусственных трансплантатов на основе различных материалов (например, лейкосапфир, силикон, полиметилметакрилат (ПММА), различные виды пластмасс, и т.д.) [18, 19, 20]. Тем не менее, полученные результаты и вызываемые вмешательством осложнения показали, что необходимо учитывать ряд факторов, таких как проницаемость, диаметр, толщину имплантатов и глубину их погружения для предотвращения некроза роговой ткани и экстррузии имплантата [21, 22].

В период с 1982 по 2007 год российскими и зарубежными учеными был опубликован ряд работ по применению гидрогелиевых линз. Было показано, что полимерный материал обладает хорошей биосовместимостью, высокой пластичностью и низкой инертностью, но послеоперационный период выявил

случаи экструзии, помутнения полимера и малопрогнозируемый рефракционный эффект. Также чрезмерной «мягкости» материала, вызывала затруднения во время имплантации кератоимплантанта, что привело к ограничению их применения. [17, 23, 24, 25, 26].

В 2014 г. Ю. А. Шустеров, принимая во внимание предыдущие недостатки модификации гидрогеля, получил имплантат из полиуретана с 38% влагосодержанием, предварительно обработав его в низкотемпературной газоразрядной плазме. Достоинствами данного материала являются высокая биосовместимость, эластичность, прозрачность, отсутствие ярко выраженной воспалительной реакции и неоваскуляризации. Однако отсутствие данных наблюдения в послеоперационный период в течение продолжительного времени ставит под вопрос перспективность применения данного материала [27].

1.2.3. Полимерные материалы в лечении буллезной кератопатии

На сегодняшний день анализ литературных источников и научных публикаций показал, что, несмотря на все разнообразие упомянутых полимерных материалов, применяемых в кератопластике, лишь немногие работы направлены на изучение внедрения искусственных материалов в клиническое лечение буллезной кератопатии. Так в 1997 г. врачи-офтальмологи М.М. Дронов и В.С. Каранов разработали трансплантат для лечения буллезной кератопатии на основе желатиновой плёнки толщиной 3 – 5 мкм. В 3%-й водный раствор желатина (ПО "ТАсма", Казань) внедряли NNN"N" тетраизопропорксиметилдиамид малоновой кислоты (ЛИКИ – 19) и сушили при температуре 20°C и относительной влажности 65% на подложке миллипорового фильтра "Владипор", применяемой в качестве опоры. Полученные прозрачные плёнки помещали в 70%-й этанол для стерилизации и длительного хранения [28]. Операцию осуществляли методом послойной кератопластики. Желатиновую линзу помещали на дно образованного роговичного ложа, вырезанного с помощью трепана, а затем фиксировали узловыми швами 10/00. На начальном этапе послеоперационный период протекал

без осложнений, однако необходимость обязательного удаления швов привела к индуцированному астигматизму роговицы за счет формирования рубца, а также выявило снижение качества зрения [29, 30].

В 2009 г. И. Б. Дружинин в целях обеспечения барьера между влагой передней камеры и тканями роговицы использовал гидрогелевый диск. После имплантации интраокулярной контактной линзы из сополимера гидрогеля («Конкор», г. Вологда), края роговичного тоннельного разреза самогерметизировались. Тем не менее, высокая гидрофильность и большая толщина диска 0,1 мм не позволяла уменьшить или предотвратить излишнюю гидратацию стромы роговицы [30].

Таким образом, несмотря на перспективность использования полимерных материалов в лечении буллезной кератопатии, необходимо крайне осторожно подходить к выбору полимерных материалов и методам терапии, учитывая все недостатки.

1.2.4. Использование клеточной терапии

Стоит заметить, что учёные пытаются найти альтернативные пути лечения и замену категоричного хирургического вмешательства и трансплантации донорской ткани. На данный момент активно развивается новейшее направление медицины – клеточная и тканевая инженерия. Так на территории РФ контроль и регистрация проведения доклинических и клинических исследований с использованием стволовых клеток регламентируется федеральным законом от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Мультипотентные стромальные клетки, выращенные в пробирке, все более успешно применяют в медицинской практике (онкологии, стоматологии и т.д.) [31], также ведутся исследования в области восстановления роговой оболочки глаза. В качестве источника аутологичных (собственных для человека) стволовых клеток у взрослого организма в основном служат костный мозг, жировая ткань и периферическая кровь. Кроме того, для восстановления поврежденной ткани роговицы используют клетки, полученные из склеро-роговичного лимба [32-39].

Лимб роговицы представляет собой границу шириной 1,0 – 1,5 мм между прозрачной роговицей и склерой. В лимбальной нише, состоящей из коллагеновой соединительной ткани, содержатся эпителиальные стволовые клетки (СК) [32 - 35]. Клетки получают путем биопсии в области лимба, помещением полученного биоптата площадью 1 – 2 мм² в питательную среду, дальнейшим культивированием на подложке (до 3000 СК) и трансплантацией [36]. Основным преимуществом использования лимба в качестве источника эпителиальных стволовых клеток является его доступность [32]. Однако применение данного метода ограничивается технической сложностью процесса, малым количеством стволовых клеток лимба и стоимостью. Кроме того, необходимо проводить большой срез ткани лимба здорового глаза, что, в случае двустороннего характера, заболевания становится невозможным.

Костный мозг представляет собой губчатую ткань (фиброзную и кроветворную), находящуюся внутри крупных костей организма (например, грудине, костях таза, рёбер и т.д.), содержащую большое количество полипотентных стволовых клеток. Первые упоминания о лечении поврежденной поверхности роговицы с использованием амниотической мембраны с культивированными на её поверхности клетками (плотность 1×10^5 клеток/см²), полученными из костного мозга здорового донора, встречаются в трудах китайских ученых под руководством Y. Ma (2006 г.) [37]. Согласно исследованиям, клетки фибробластов и амниотическая мембрана не оказывают терапевтического эффекта, однако позволяют реконструировать сильно поврежденную поверхность роговицы, а также избежать иммунорецепцию и иммунное отторжение. К аналогичным заключениям пришли группы учёных под руководством S. Gu в 2009 г [38] и H. Liu в 2012 г. [39].

В 2007 г. ученые из Китая X. W. Liu и J. L. Zhao выявили способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга трансдифференцироваться в эндотелиальные клетки роговицы *in vivo* [40]. В ходе эксперимента желатиновые мембраны с высаженными на них культивированными аутологичными МСК имплантировали в роговицу глаза кроликов, у которых

предварительно был нарушен эндотелиальный слой. В послеоперационный период наблюдалось улучшение прозрачности и толщины роговицы, а также снижение плотности трансплантируемых клеток. Результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что трансплантированные МСК дифференцировались в однослойные клетки неправильной формы с обильным количеством микроворсинок и широким межклеточным пространством. Однако, несмотря на все преимущества, костный мозг нельзя рассматривать в качестве идеального источника стволовых клеток. Во-первых, он содержит лишь ограниченное количество клеток (в 5 мл от 2500 СК до 6000 СК), которые могут демонстрировать снижение как пролиферативной, так и дифференцировочной способности с увеличением возраста донора [41]. Во-вторых, забор костного мозга проводят под общей анестезией, что в некоторых случаях, таких как некорректная работа анестезиолога, или нарушение рекомендаций врача, может вызывать непредусмотренные негативные эффекты (дыхательная недостаточность, рвота и т.д.) во время процедуры, или уже после пробуждения донора. В-третьих, поиск совместимого донора может стать сложно решаемой задачей. Поэтому ученые продолжают искать альтернативные источники аутологичных взрослых стволовых клеток, которые можно получать в больших количествах под местной анестезией и с минимальным дискомфортом.

Жировая ткань – это разновидность соединительной ткани, содержащая плотно прилегающие друг другу жировые клетки-адипоциты. В 2004 г. команде ученых под руководством Р.А. Zuk удалось установить, что из 300 мл жировой ткани (ЖТ) человека, полученной методом липосакции, можно получить до 20×10^6 мультипотентных стволовых клеток. Это стало началом новой исследовательской волны в области применения стволовых клеток, полученных из жировой ткани, в регенерации и восстановлении тканей, например, регенерации сердечно-сосудистой ткани, восстановлении костей/хрящей, реконструкции мочевых путей и т.д. [42].

Исследование возможности применения клеток ЖТ в регенерации стромы роговицы *in vivo* было проведено командой ученых во главе с F. Arnalich-Montiel в 2009 г. В результате первой серии экспериментов, направленных на исследование стволовых клеток ЖТ на биосовместимость и их иммуногенность, было выявлено, что клетки оставались биологически активными до 10 недель после трансплантации, сохраняя прозрачность роговицы. Вторая серия экспериментов показала, что клетки способны дифференцироваться в несколько видов клеток (кератоциты, остеобласты, и т. д.) и через 12 недель после трансплантации СК ЖТ в строму роговицы они приобрели морфологию, сходную с морфологией кератоцитов (фибробластов) [43]. Однако исследователи выделяют некоторые ограничения применения СТ из ЖТ в клинической практике, связанные с методикой получения. Так, применяемые в разделении биологического субстрата, аспирированного из организма донора, стерильные солевые растворы, содержащие небольшие концентрации местного анестетика и адреналина, а также ферментативные смеси, могут влиять на число и жизнеспособность СК, равно, как и на увеличение отрицательного давления в аспираторе [44].

В последние несколько лет основным источником для аутологичных трансплантаций являются стволовые клетки, выделенные из периферической крови (кровотока) [45]. Их способность подвергаться многолинейной дифференцировке позволяет применять их в лечении цирроза печени, лимфоме Ходжкина и т.д., а также при офтальмологических патологиях, например, в регенерации сетчатки глаза (синдром Сеньора-Локена) [46, 47, 48]. Забор стволовых клеток осуществляется с помощью аферезного аппарата, позволяющего изымать кровь небольшими порциями из крупных вен с фильтрацией СК и последующим возвращением оставшихся компонентов крови донору. Данная процедура не вызывает анемии, не требует анестезии и госпитализации донора. Однако недостатком метода является длительность забора (до 6 часов), в некоторых случаях процесс может быть разбит на несколько дней и вызывать побочные эффекты, схожие с гриппом (слабость, боли в костях, озноб и т.д.) [49].

Нельзя не отметить, что каждый метод или система сепарации СК имеет свои преимущества и недостатки, но объединяет их то, что активность и жизнеспособность стволовых клеток, а также успешное создание роговичного эпителия зависят от структуры (пористость, размеры пор) и материала каркаса, на котором они культивируются. В настоящее время широкое клиническое применение нашла амниотическая мембрана, которая обладает рядом недостатков, таких как ограниченная прозрачность, биологическая неустойчивость, риск заражения и т.д. Поэтому ученые продолжают исследовать альтернативные биологические, биосинтетические или полимерные подложки для трансплантации СК с целью замены амниотической мембраны [50]. Так в последнее время для доставки культивированных стволовых клеток используют скаффолды на основе полимеров, которые поддерживают рост клеток, а также обладают высокой биосовместимостью, прозрачностью и механической прочностью. Однако в скаффолдах на основе большинства полимерных материалов наблюдается неудовлетворительная регенерация клеток ввиду изменения центральных клеток, образующих некротические ядра, в то время как периферийные клетки остаются здоровыми и напоминают нативные ткани, что может быть связано с отсутствием биодеградации скаффолда [51, 52].

1.3. Использование биорезорируемых материалов в медицине

За последнее десятилетие в связи с необходимостью разработки материалов с широким спектром свойств и регулируемыми сроками деградации, возрос интерес регенеративной медицины к материалам на основе биоразлагаемых полимеров. Их уникальные свойства, такие как биосовместимость и биоразлагаемость, привели к их активному применению в лечении различных заболеваний и травм с использованием тканевой инженерии в качестве перевязочных и шовных материалов [53, 54], крепежных элементов для соединения костных отломков [55], плёночных и мембранных материалов для регенерации ран, хрящевых и костных имплантатов, а также средств для адресной доставки лекарственных препаратов в

организм человека [56]. В разработке новых полимерных изделий, способных к биоразложению, учитывается кинетика биodeградации. Наиболее важными ее компонентами являются: молекулярно-массовые характеристики (влияют не на срок деградации, а на ее кинетику), степень кристалличности (степень кристалличности замедляет срок гидролитической деградации), пористость изделия и т.д. Варьируя данными параметрами, ученые могут добиваться оптимальных сроков функционирования изделий [57].

Ещё одним существенным преимуществом биорезорбируемых изделий перед их неразлагаемыми аналогами является отсутствие необходимости повторного хирургического вмешательства для их извлечения. Однако биорезорбируемые материалы и изделия, имплантируемые для временного восполнения того или иного дефекта ткани или органа в организме и оказывающие лечебное действие, должны подвергаться биодеструкции одновременно с замещаемыми новыми тканями. По этой причине необходимо, чтобы процесс биоразложения протекал с определенной скоростью, а продукты деградации своевременно выводились из организма.

На сегодняшний день наиболее применяемыми биорезорбируемыми материалами в медицине являются материалы на основе полилактида. Первые упоминания о применении материалов из полилактида в качестве сосудистых стентов и хирургических нитей относятся к 1966 г. Тогда же группа ученых под руководством R.K. Kulkarni провела исследования в области биораспределения и реакции тканей организма, в ходе которых было выявлено, что материал на основе полилактида не обладает токсичностью, не вызывает воспалительных процессов, деградирует до молочной кислоты и выводится из организма в виде углекислого газа и воды [58, 59].

1.4. Полилактид

Полилактид $(C_3H_4O_2)_n$ (полимолочная кислота или поли (3,6-диметил-1,4-диоксан-2,5-дион)) - сложный биоразлагаемый, термопластичный, алифатический

полиэфир, мономером которого является молочная (2-гидроксипропионовая) кислота (рисунок 1.2), за последние 50 лет нашедший широкое клиническое применение в медицине благодаря особой структуре и высокой биосовместимости.

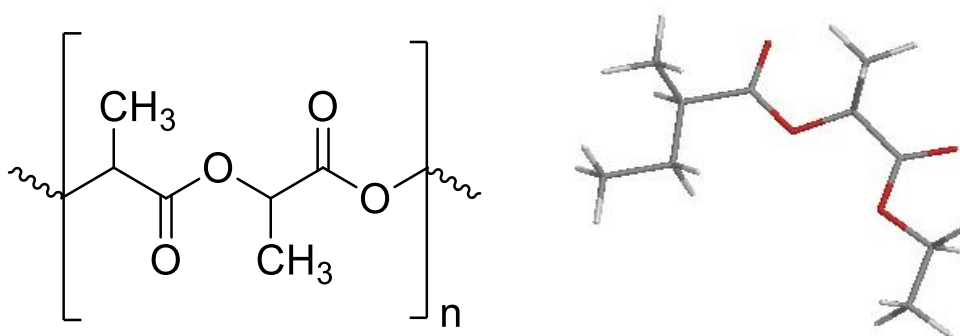


Рисунок 1.2 – Структурная формула полилактида

Мономер полилактида является хиральной молекулой и существует в виде двух L- и D-стереоизомеров. Изменяя относительное содержание L- и D-форм в полилактиде, можно получить требуемые физические свойства и класс материалов. Так, полимеры, полученные из оптически активных L- и D- мономеров, являются полукристаллическими, а рацемическая смесь (50% D и 50% L) образует поли (D, L-лактид), представляющий собой аморфный полимер (таблица 1.1). Как правило,

Таблица 1.1 – Физическо-химические свойства полилактида [60]

Свойства	Размерность	Значения
Молярная масса	г/моль	$(72)_n$
Плотность	г/см ³	1,290\1,248 (кристаллический\аморфный)
Температура плавления	°C	170 – 180, (100 % L-ПЛА) 220 (L,D-ПЛА стереок.)
Температура размягчения	°C	50
Твердость (по Роквеллу)		R70-R90
Относительное удлинение при разрыве	%	3,8
Прочность на изгиб	МПа	55,3
Прочность на разрыв	МПа	57,8
Температура стеклования	°C	55-65

наличие кристаллической фазы придает полимерам повышенную жесткость и прочность [60], что делает материал привлекательным для применения его в качестве резобируемого шовного материала, костных пластинок, брюшных сеток, стентов, скаффолдов для регенерации тканей и других биорезорбируемых имплантатов. Аморфные полимеры находят свое применение в офтальмологии в качестве подложек, микросфер, скаффолдов и других систем лекарственной доставки с контролируемым высвобождением [61 – 68].

Как неоднократно упоминалось ранее, полилактид относится к классу биоразлагаемых полимеров. Разрушение полилактида происходит за счет разрыва основных или боковых цепей путем гидролиза сложноэфирных связей. Скорость биоразложения зависит от множества факторов, таких как молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение, температура плавления и стеклования, кристалличность, форма и размер изделия, а также окружающая среда, в которой он подвергается разложению [69].

Таблица 1.2 – Биомедицинские изделия на основе полилактида

Полилактид		
	Поли(L-лактид)	Поли(D,L-лактид)
Структура	Частично кристаллический	Аморфный
Молекулярная масса, г/моль	100-300	-
Сроки деградации	50% за 12 – 24 года	100 % за 12 – 16 месяцев
Применение в медицине	Крепежные изделия для остеосинтеза, восстановление связок, шовные якоря, стенты	Шовные нити, микросферы, скаффолды для регенерации тканей, нетканые материалы для ожоговых и раневых повязок

Более того, существенное влияние на скорость разложения полилактида оказывает стереоизомерное соотношение L/D в лактатных звеньях. Известно, что уменьшение стереоизомерного соотношения приводит к увеличению кристалличности полилактида, в результате чего значительно снижается деградация полимера. Данные знания имеют первостепенное значение в разработке трековых мембран, скаффолдов и других медицинских изделий на основе

полилактида (таблица 1.2), где требуется индивидуальная скорость деградации наряду с адекватными механическими свойствами [70, 71].

1.5. Трековые мембраны и основные принципы их получения

Анализ источников научных публикаций по применению биоразлагаемых полимеров в регенеративной медицине в качестве подложек для стволовых клеток и доставки лекарственных средств за последние годы указывает на то, что потребность в мембранных системах возрастает. Необходимость создания тонких мембран с контролируемым диаметром пор, высокой степенью селективности и способностью к растворению приводит к разработке новых материалов и технологий их получения. На сегодняшний день лишь трековые мембраны обладают наиболее подходящим набором характеристик, включающим в себя малую дисперсию пор по размерам, низкий уровень дефектности, а также параметры (размер, форму, плотность пор) которые можно варьировать в зависимости от функционального назначения.

Трековые мембраны – это полимерные плёнки толщиной 10 – 25 мкм, подвергнутые бомбардировке высокоэнергетическими ионами ксенона (Xe), криптона (Kr), неона (Ne) или гелия (He), пробивающими её насквозь и обладающими большой удельной потерей энергии (МэВ/мкм) [71, 72, 73].

Процесс формирования трековой мембраны из полимерного материала состоит из двух основных стадий. Первая стадия - формирование трека тяжёлого иона, так называемого «латентного трека» (ЛТ) (рисунок 1.3), который в момент образования состоит из трех частей: сердцевины, оболочки и неизмененного материала. Сердцевина трека образуется в результате прохождения ускоренных многозарядных ионов через плёнку и взаимодействия их с электронами материала, передачи части кинетической энергии, ионизации и возбуждения атомов среды взаимодействия. Вторичные электроны в результате прохождения тяжёлого иона вызывают радиационные дефекты в сердцевине трека – зоне наибольшей концентрации возбуждённых и ионизированных атомов. Оболочка трека

формируется за счет вторичной ионизации или высокоэнергетических δ -электронов. Степень деструкции в оболочке трека и его сердцевине различны, так как связи основной цепи и боковых групп полимерного материала рвутся, тем самым формируя меньшую плотность материала в сердцевине трека на 10% [71, 73, 74], что объясняет избирательность травления. Таким образом, после облучения в плёнке появляются треки, которые являются каналами радиационного повреждения, имеющими вид локализованных в поперечном направлении ($\sim 10 - 100$ нм) сплошных протяжённых дефектов структуры. Данные треки не являются порами, так как не имеют сквозных отверстий. Для получения сквозных пор используется процесс химического травления в избирательном травителе, относящийся ко второй стадии формирования ТМ.

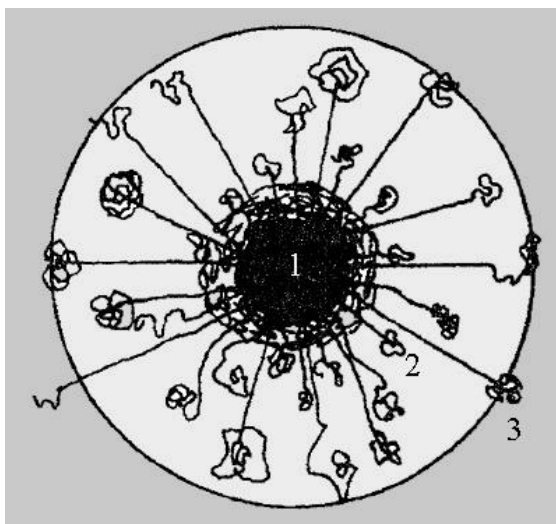


Рисунок 1.3 – Поперечное сечение латентного трека, где 1 - сердцевина, 2 - оболочка, 3 - неизменная плёнка

Травление – взаимодействие жидкой агрессивной среды (щелочной или кислотной) с полимерным материалом и последующей реакцией химической деструкции макромолекул. Процесс состоит из следующих фаз [75]: диффузия активного вещества к поверхности полимерного материала, адсорбция активного компонента на поверхности образца, проникновение активного компонента, химическая реакция активного компонента с полимером, диффузия продуктов

деструкции к поверхности полимера, десорбция продуктов с поверхности. В сложноэфирных полимерах химическая реакция протекает с разрывом сложноэфирных связей, отщеплением молекул и образованием на поверхности карбоксильной и гидроксильной групп, определяющих отрицательный электрический заряд поверхности материала [76, 77]. С целью контроля селективности травления, проводят предварительную сенсibilизацию треков ультрафиолетовым (УФ) облучением, что позволяет увеличить избирательность травления в десятки раз [76, 77].

1.6. Полимерные трековые мембраны и перспективы их использования в кератопластике

Для получения трековых мембран используют полимерные плёнки на основе полиэтилентерефталата (ПЭТФ), поликарбоната, полипропилена (ПП), полиэфира [78] и т.д. Применение особых приемов облучения ионами, сенсibilизации и химического травления позволяет улучшить внутреннюю “архитектуру” ТМ и расширить спектр их применения. Так самарскими офтальмологами совместно с учеными из Объединенного Института Ядерных Исследований было предложено использовать трековые мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) толщиной 10 мкм в офтальмологии в роли эксплантодренажа для хирургического лечения вторичной глаукомы [79]. Модифицирование поверхности ТМ осуществлялось в плазме ВЧ-разряда. Материал был апробирован на 30 кроликах породы Шиншилла и 134 пациентах с вторичной глаукомой (разрешение на проведение клинических исследований № 01-26718/06 от 28.12.2009). Созданный дренаж не обладал местно-раздражающим, сенсibilизирующим действием и соответствовал требованиям, предъявляемым к изделиям, постоянно контактирующим с внутренней средой глаза [80]. Но как известно, хирургия роговицы отличается от хирургии глаукомы [81] в силу анатомического строения и физиологии роговой оболочки, обменные процессы в ней осуществляются за счет расположенной вокруг роговицы сосудов перикорнеальной петливой сети и внутриглазной жидкости передней камеры [82].

В связи с этим, имплантат должен обладать избирательной проницаемостью жидкости в целях поддержания обменных процессов роговой оболочки. С этой задачей с высокой вероятностью может справиться трековая мембрана на основе матрицы полимера.

В 2014 г. группа ученых из Томского политехнического университета предложила использовать ТМ на основе плёнок из полиэтилентерефталата (ПЭТФ), сформированных методом розлива из раствора с диаметрами пор 0,4 мкм и плотностью 5×10^6 пор/см², в кератопластике [83]. И уже в 2015 г. совместно с сотрудниками кафедры офтальмологии Сибирского государственного медицинского университета разработала метод барьерной кератопластики с применением полимерных трековых мембран. Согласно полученным результатам трековая мембрана, предварительно обработанная низкотемпературной плазмой, имплантированная в инстромальный роговичный «карман» в глубоких слоях роговицы, позволяет снизить отек ткани и восстановить прозрачность роговицы [84], тем самым подтверждая перспективность использования полимерных мембран.

Несмотря на большое количество работ, посвященных применению полимерных трековых мембран (ПЭТФ, поликарбонат (ПК)) в медицине, информация о получении ТМ из биорезорбируемых плёнок на основе полилактида, сформированных наиболее распространенным методом розлива из растворов, применяемых в разработке имплантатов, в офтальмологии отсутствует [65, 85]. Метод розлива позволяет получать плёнки определенной толщины, что способствует улучшению прозрачности мембран [86]. Спецификой такой методики получения плёнок является различная шероховатость сторон за счет высыхания раствора в чашках Петри в контакте с атмосферой с одной стороны (внешняя сторона) и с поверхностью чашки с противоположной стороны, формируя внутреннюю сторону плёнки более гладкой [85]. В этой связи, исследование биорезорируемых полимерных материалов на основе полилактида в роли полупроницаемых мембран для «подсаженных» *in vivo* клеток, физико-химических

свойств материала (например, смачиваемость и свободная поверхностная энергия, которые могут затруднять реализацию проницаемости мембран) является крайне актуальной задачей для современного этапа развития медицины [87].

1.7. Выводы по 1 главе

Согласно проведённому анализу можно сделать следующие выводы:

1. Поиску и разработке новых способов лечения буллезной кератопатии способствует недостаточная эффективность традиционных методов консервативного и хирургического лечения, что приводит к широкой распространенности заболевания. Перспективным направлением для восстановления и нормализации движения внутриглазной жидкости, а также поддержания роговицы в слабо дегидрированном состоянии является использование полупроницаемых мембран. В связи с этим поиск биосовместимых и биорезорбируемых материалов является актуальной задачей.

2. Полимер молочной кислоты (полилактид) зарекомендовал себя как материал, успешно применяемый в медицине. Выбор полилактида в качестве материала для изготовления изолирующей мембраны, выполняющей роль скаффолда для доставки стволовых клеток СТ ЖТ в строму роговицы, представляется весьма перспективным. Трековые мембраны на основе полилактида могут служить оптимальным материалом для корнеального имплантата, поскольку способны обеспечивать проницаемость жидкости в роговичной ткани с целью поддержания обменных процессов, а также служить временным носителем культивированных клеток.

В результате проведенного анализа литературных источников, можно определить следующие пути решения выявленных проблем в лечении буллезной кератопатии: 1) получить плёнку из полилактида, 2) на основе плёнки полилактида получить трековую мембрану. Всё вышеизложенное позволяет определить цели и задачи исследований.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Плёнки полилактида

Исходные плёнки полилактида получали методом розлива из раствора полимолочной кислоты с молекулярным весом, $M_w = 121000$ г/моль (PURASORB® PL 10, Нидерланды) в трихлорметане (CHCl_3) (Экрос, Россия) [65, 66, 88, 89], 10 ± 1 грамм полученного 1%-ого раствора выливали в чашки Петри, которые помещали в вытяжной шкаф до полного испарения растворителя (48 часов). Сформированные полимерные плёнки извлекали из чаши с помощью пинцета и дистиллированной воды. Для удаления остаточного растворителя плёнки на 24 часа помещали в вакуумную камеру (давление 10^{-3} Торр, температура 25°C). Также были получены плёнки из 20 ± 1 грамм и 30 ± 1 грамм раствора.

Толщину плёнок определяли с помощью оптиметра «ИКВ-3»

2.2. Трековые мембраны на основе плёнки полилактида

Формирование трековых мембран осуществлялось посредством бомбардировки полимерных плёнок полилактида высокоэнергетическими ионами ксенона и гелия, пробивающими плёнку насквозь. Процесс образования трека в конденсированной среде проходит в две стадии. На первом этапе веществу передается энергия заряженной частицы. Длительность облучения выбирается исходя из необходимой плотности сквозных пор. Тормозная способность существенно определяет взаимодействие иона с веществом. Высвобождающиеся δ -электроны ионизируют вещество в треке, передавая энергию атомам и молекулам, окружающим траекторию первичной частицы. Первая стадия процесса занимает $10^{-13} - 10^{-12}$ сек. В результате непосредственного воздействия δ -электронов на вещество образуются области первичного латентного трека (см. рисунок 1.3). На второй стадии процесса, в течение $10^{-12} - 10^{-9}$ сек, в результате переноса и перераспределения энергии в области трека, устанавливается тепловое равновесие.

Передача энергии между продуктами ионизации, накопление потенциальной энергии возбужденных молекул и химически активных радикалов и люминесценция возбужденных атомов являются основными механизмами потери энергии на данной стадии. В результате облучения в плёнке образуются латентные треки, которые являются каналами радиационного повреждения, но не являются сквозными порами [90-94].

Ионы ксенона. Облучение плёнки полилактида ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ проводили на циклотроне ИЦ-100 (ЛЯР им. Г.Н. Флерова, ОИЯИ, Дубна) с максимальной энергией 1,2 МэВ/нуклон (160 МэВ) с флюенсом $3,1 \times 10^7 \text{ см}^{-2}$ [95]. Виртуальный тур по лаборатории http://flerovlab.jinr.ru/linkc/Virtual_tour/IC100/index.html. В циклотроне данного типа для облучения используется вакуумная камера с лентопротяжным механизмом. С помощью электростатического дефлектора из ускорительной камеры выводится ускоренный пучок ионов и через канал с системой для равномерной развертки пучка поступает в камеру для облучения. С помощью схемы электростатической развертки осуществляется горизонтальная развертка пучка. В качестве отклоняющего напряжения использовалось синусоидальное напряжение с частотой 300 Гц и амплитудой до 15 кВ.

Оценка глубины проникновения ионов в полимерных материалах осуществлялась с использованием компьютерной программы SRIM (в алгоритме расчета которой заложена формула Бете-Блоха), которая позволяет рассчитать потери энергии dE/dx и пробега R при прохождении иона через вещество. Известно, что полные потери энергии заряженного иона с веществом представляют собой сумму потерь энергии в ядерных и электронных взаимодействиях [96]:

$$\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{полн}} = \left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{яд}} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{эл}}, \quad (2.1)$$

Тяжёлые заряженные частицы взаимодействуют, в основном, с электронными оболочками атомов, вследствие чего наблюдается лишь незначительное отклонение от направления их первоначального движения, что обусловлено малой вероятностью столкновения частиц с ядрами. В связи с этим, при расчете потерь

энергии (формула 2.1) ядерными потерями пренебрегают, а пробеги измеряют по прямой от точки входа частиц в среду до точки их остановки.

На рисунке 2.1 приведены данные расчетов потерь энергии и проективного пробега ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ в плёнке полилактида. Согласно графическим данным, пробег ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с энергией 160 МэВ в полимере составляет величину порядка 28 мкм, что позволяет сделать вывод о том, что ионы ксенона $^{132}\text{Xe}^{23+}$ проходят сквозь образцы плёнки полилактида толщиной в 16 мкм, формируя сквозные латентные треки.

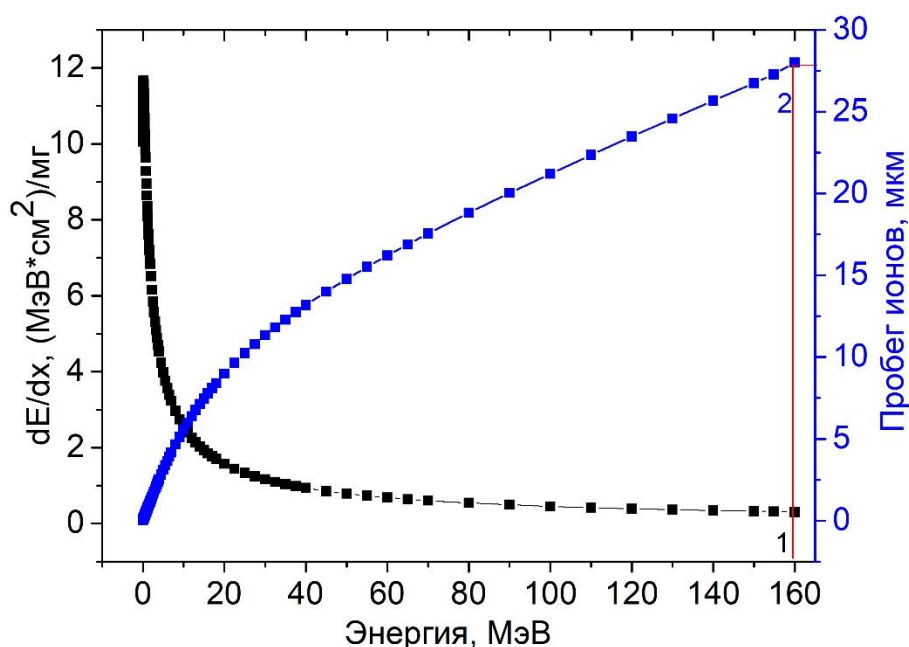


Рисунок 2.1 – Потери энергии (1) и пробег ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ (2) в плёнке полилактида

Ионы гелия. Исследуемые плёнки полилактида облучались потоком ионов $^4\text{He}^{2+}$ с энергией 7,0 МэВ/нуклон (28 МэВ) флюенсом $1,3 \times 10^{13} \text{ см}^{-2}$, ускоренных на циклотроне Р-7М ТПУ. Пучок ионов $^4\text{He}^{2+}$ диаметром 8 мм выводился в атмосферу через титановое окно (толщина 40 мкм) ускорительной камеры. Плёнка на основе полилактида толщиной 15 мкм размещалась на расстоянии 20 мм от окна. Диаметр облучения составлял 90 мм. Схема облучения приведена на рисунке 2.2. Облучение исследуемой плёнки полилактида ионами $^4\text{He}^{2+}$ проводилось при плотности тока

0,2 мкА/см². Время экспозиции для всех облучаемых плёночных образцов составляло 20 сек (при 30 сек плёнки разрушаются).

Расчет потерь энергии ${}^4\text{He}^{2+}$ в плёнке полилактида выполнялся с учетом схемы облучения, представленной на рисунке 2.2. Пучок ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ с энергией 28 МэВ проходит сквозь титановое окно и воздушный слой теряя энергию. В итоге на плёнку полилактида падают ионы с энергией 24,5 МэВ. На графике (рисунок 2.3) видно, что пробег ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ с энергией 24,5 МэВ равен 39 мкм. Таким образом, ионы ${}^4\text{He}^{2+}$ с энергией 28 МэВ легко проходят сквозь плёнку полилактида толщиной 15,5 мкм.



Рисунок 2.2 – Схема облучения плёнки полилактида

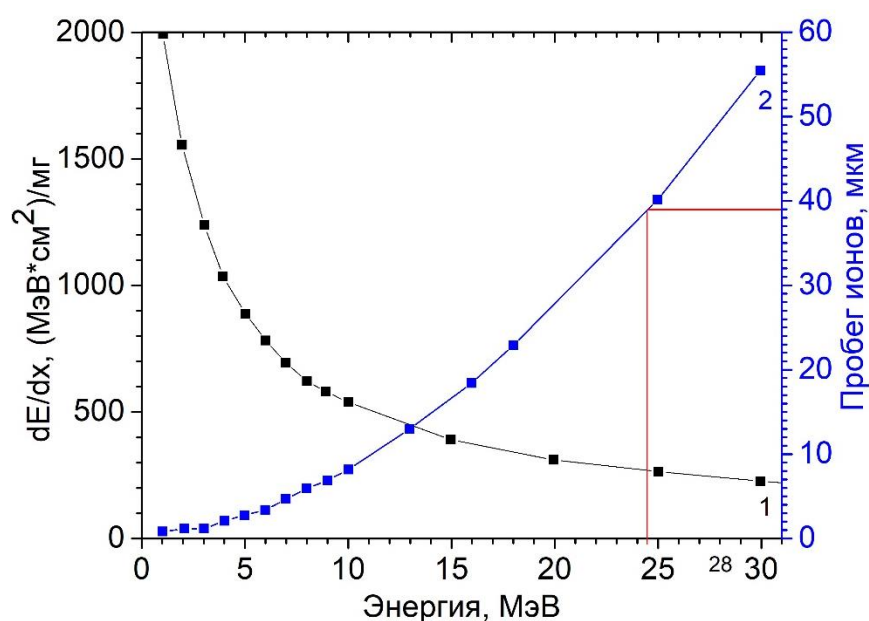


Рисунок 2.3 – Потери энергии (1) и пробег ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ (2) в плёнке полилактида

Химическое травление. Завершающим этапом формирования трековых мембран является процесс получения сквозных пор посредством химического травления в избирательном травителе [97]. Облученные плёнки помещают в специально подобранный раствор щелочи, в котором происходит протравливание деструктированного ионизацией материала преимущественно в области латентных треков с образованием сквозных пор. Для получения таких пор необходимо, чтобы скорость травления трека плёнки (v_t) всегда была выше скорости травления необлучённой поверхности (v_b). Таким образом, регулируя условия травления, можно получать поры контролируемого диаметра и формы (например, для получения пор цилиндрической формы в плёнках полилактида отношение $v_t : v_b$ должно быть 1000:1) [98].

Подготовленные для травления облучённые ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$ плёнки крепили на рамках-подложках из поливинилиденфторида (ПВДФ) с помощью двухстороннего скотча и помещали в водный одномолярный (1 М) раствор гидроксида натрия (NaOH) при температуре 44 ± 1 °C, также были проверены следующие температурные режимы: 38 ± 1 °C и 50 ± 1 °C. Время травления для плёнок, облучённых ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$: 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут. Для плёнок, облучённых ионами $^4\text{He}^{2+}$, время травления составило 5, 10, 15, 20, 25 минут. Протравленные образцы для нейтрализации реакции помещали в 0,01%-й уксусный раствор, промывали большим количеством дистиллированной воды (четырёхкратно), высушивали на воздухе и выдерживали в вакуумной камере (давление 10^{-3} Торр, температура 25 °C) в течение 24 часов при комнатной температуре. Структуру пор изучали посредством получения скола мембран, для чего готовые ТМ предварительно выдерживали в автоклаве ГПа-10 ПЗ в течение 20 мин при давлении 0,2 МПа и температуре 132 °C, после чего охлаждали до температуры жидкого азота ($-195,75$ °C) в течение 15 мин.

2.5. Методы изучения физических свойств материалов на основе полилактида

2.5.1. Растровая электронная микроскопия

Для изучения микроструктуры образцов использовали метод сканирующей электронной микроскопии, который позволяет получать изображения с высоким пространственным разрешением. Исследование проводили на растровом электронном микроскопе Hitachi TM-3000 (Япония) с разрешением 30 нм. Предварительно перед началом исследования, для улучшения качества изображений, на поверхность плёнки полилактида в течение 2 мин наносили электропроводящий слой золота (Au) с чистотой 99,9%. Съёмки проводили в аналитическом режиме, при низком вакууме, с ускоряющим напряжением 15 кВ, максимально полученное увеличение $\times 3000$.

Количественный анализ морфологических характеристик трековых мембран (средний диаметр пор, средняя плотность пор и т.д.) проводили с помощью программы ImageJ 1.38 (National Institute of Health, США). Для достоверности полученных расчётов использовали не менее 5 цифровых изображений, полученных на различных участках поверхности трековой мембраны. Для каждого набора условий проводили параллельное травление 5 образцов.

2.5.2. Атомно-силовая микроскопия

Первостепенное значение в эффективности прикрепления мезенхимальных стволовых клеток к поверхности скаффолда играет шероховатость, влияющая на их адгезию и пролиферацию [99]. Исследование рельефа поверхности плёнки и трековых мембран проводили с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) «Solver-HV» (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме работы. Для измерения применяли кантилевер марки NSG11 («NT-MDT»), радиус закругления острия иглы 10 нм. Область сканирования составляла 30×30 мкм² и 3×3 мкм². Профили шероховатости поверхности формировали в программе Gwyddion 2.49 и Origin 9.0

с точностью до 1 нм. Обработку параметров шероховатости проводили согласно ГОСТ 2789–73 и ISO 4287:1997. Для расчёта использовали не менее 10 профилей поверхности для каждой группы образцов.

Для нормирования и количественной оценки шероховатости поверхности были установлены следующие параметры: средняя шероховатость - R_a , среднеквадратичная шероховатость - R_q , максимальная высота шероховатости - R_t , средняя максимальная высота профиля - R_z , коэффициент асимметрии - R_{sk} [100-102].

2.5.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) позволяет получать данные о тепловых эффектах, протекающих в полимерных и композитных материалах, таких как: температура плавления и стеклования, степень кристаллизации, чистота, химический состав и т.д. Метод основан на непрерывной регистрации разности теплового потока между образцом и эталоном (термически стабильный материал без фазовых переходов и температурой плавления, превышающей интервал температур исследования) [103, 104].

В данной работе изучали изменение степени кристалличности плёнки полилактида и ТМ на основе плёнки полилактида, т.к. кристалличность влияет на многие свойства полимера, включая модуль упругости, жёсткость, предел прочности, удлинение при растяжении, температуру плавления [105]. Термограммы получали с использованием прибора ТГ/ДСК/ДТА термоанализатора SDTQ 600 (Thermo Electron Corp, ТПУ). Анализ ДСК проводили при следующих условиях: температурный интервал – 25 – 250 °С, скорость нагрева – 10 °С/мин, атмосфера – воздух.

Степень кристалличности ($I_{ст.кр.}$) рассчитывали по формуле [106, 107]:

$$I_{ст.кр.}(t) = \frac{(\Delta H_m)}{\Delta H_0} \times 100\%, \quad (2.2)$$

где ΔH_m – энтальпия плавления (Дж/г);

ΔH_0 – теоретическое значение теплоты плавления полилактида со 100% кристалличностью, $\Delta H_0 = 93$ Дж/г.

2.5.4. Исследование смачиваемости и свободной энергии поверхности

Исследование смачиваемости поверхности полученных материалов выполняли с помощью прибора «KRÜSS Easy Drop DSA 20». Основной величиной, характеризующей смачивание, является краевой угол (θ), который измеряли методом сидячей капли при комнатной температуре 26 ± 2 °C и влажности $50 \pm 5\%$ и определяли с помощью уравнения Юнга [108]:

$$\gamma^{sv} - \gamma^{sl} = \gamma^{lv} \cdot \cos\theta \quad (2.3)$$

где: γ^{sv} , γ^{lv} и γ^{sl} – межфазные поверхностные энергии Гиббса, соответствующие границам: твёрдое тело/газ, жидкость/газ, твёрдое тело/жидкость.

Свободная энергия поверхности (СЭП, γ), полярные (водородные связи и сильные взаимодействия, γ^P) и дисперсные компоненты (Ван-дер-Ваальсовы связи и неспецифические взаимодействия, γ^D) поверхности были рассчитаны по методу Оуэнса-Вендта-Рабел-Кэлби (ОВРК) [109]:

$$\frac{\gamma_1(\cos\theta + 1)}{\sqrt[2]{\gamma_1^D}} = \frac{\sqrt{\gamma_1^P}}{\sqrt{\gamma_1^D}} \times \sqrt{\gamma_s^P} + \sqrt{\gamma_s^D} \quad (2.4)$$

где:

$$\begin{aligned} \gamma_1 &= \gamma_1^P + \gamma_1^D \\ \gamma_s &= \gamma_s^P + \gamma_s^D \end{aligned} \quad (2.5)$$

В данной работе для расчёта СЭП методом ОВРК использовали три жидкости: деионизованную воду (θ_w°), глицерин (θ_g°), и н-гексан (θ_N). На образец наносили по 5 капель смачивающей жидкости объемом 3 мкл. Точность измерения $\pm 0,1^\circ$. Измерения проводились в течение 5 сек после осаждения капли на поверхность.

Полярность исследуемых образцов на основе полилактида определяли, как отношение полярной компоненты к ее полной поверхностной энергии [110]:

$$p = \frac{\gamma^p}{\gamma} \quad (2.6)$$

2.5.5. ИК-спектроскопия

Выявление остаточных органических растворителей и влияния процесса облучения тяжёлыми ионами и химического травления на молекулярные связи в плёнках и

Таблица 2.2 – Колебательные моды молекулы полилактида

№	Волновое число, см ⁻¹	Моды и связи	Литература
1.	3571	$\nu(\text{OH})$ free	[111]
2.	2997	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	[111]
3.	2947	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	[111]
4.	2882	$\nu(\text{CH})$	[111]
5.	1751, 1756, 1760	$\nu(\text{C}=\text{O})$	[111, 112]
6.	1454, 1452, 1456	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	[112]
7.	1384	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	[112]
8.	1365, 1368	$\delta(\text{CH}) + \delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	[111, 112]
9.	1305, 1300, 1313, 1315	$\delta(\text{CH})$ $\delta_2(\text{CH})$	[111, 112]
10.	1269, 1270	$\delta(\text{CH}) + \nu(\text{C} - \text{O} - \text{C})$	[112]
11.	1209, 1216	$\nu_{\text{as}}(\text{C} - \text{O} - \text{C}, \text{h})$	[112]
12.	1185	$\nu_{\text{as}}(\text{C} - \text{O} - \text{C}, \text{l})$	[111, 112]
13.	1130, 1132	$r_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	[111, 112]
14.	1090	$\nu_{\text{s}}(\text{C} - \text{O} - \text{C})$	[111, 112]
15.	1038, 1045	$\nu(\text{C} - \text{CH}_3)$	[111, 112]
16.	960	$r(\text{CH}_3) + \nu(\text{CC})$	[111]
17.	925	$r(\text{CH}_3) + \nu(\text{CC})$	[111]
18.	873, 875	$\nu(\text{C} - \text{COO})$	[11]1
19.	760	$\delta(\text{C} = \text{O})$	[111]
20.	740	$\delta(\text{C} = \text{O})$	[111]
21.	690, 695	$\gamma(\text{C} = \text{O})$	[111]
22.	515	$\delta_1(\text{C} - \text{CH}_3) + \delta(\text{COO})$	[111]

Примечание: колебания: s – симметричные; as – ассиметричные, r – вращательные, ν -валентные, δ -деформационные, γ -скелетные. Ассиметричная мода (C – O – C) ПМК состоит из двух компонентов: $\nu_{\text{as}}(\text{C} - \text{O} - \text{C}, \text{h})$, высокочастотное) и $\nu_{\text{as}}(\text{C} - \text{O} - \text{C}, \text{l})$, низкочастотное)

трековых мембранах на основе полилактида осуществлялось методом инфракрасной спектроскопии. Спектры получали с помощью прибора Фурье-спектрометра Cary 630 (Agilent, США) в диапазоне $650 - 4000 \text{ см}^{-1}$ со спектральным разрешением 2 см^{-1} . Исследование проводилось методом нарушенного полного внутреннего отражения с использованием приставки НВПО с алмазным кристаллом. Обработка спектров проводилась в программе OriginPro 9.1.

В таблице 2.2 представлены характерные полосы поглощения функциональных групп полилактидов, соответствующие литературным данным.

2.5.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Наиболее используемым методом исследования молекулярной структуры органических и неорганических материалов является спектроскопия комбинационного рассеяния. В основе метода лежит неупругое комбинационное (рамановское) рассеяние монохроматического света в видимом, ближнем ультрафиолетовом (УФ, $\lambda = 266 \text{ нм}$) или инфракрасном (ИК, $\lambda = 1064 \text{ нм}$) диапазонах. Это позволяет изучать колебательные, вращательные и иные низкочастотные моды исследуемого вещества в интервале значения волнового числа $2 - 4000 \text{ см}^{-1}$ [113].

Классическая экспериментальная установка состоит из следующих блоков: лазер, осветитель, монохроматор, фотоприемник и детектор. Большинство приборов используют лазер с зеленой длиной волны $\lambda = 514,5 \text{ нм}$ или $\lambda = 532 \text{ нм}$, так как в этом спектральном диапазоне фотонные детекторы наиболее чувствительны и позволяют возбуждать и собирать видимые рассеянные фотоны. Это дает возможность применять видимую оптику для работы с водными растворами и полимерами [114, 115].

Спектры комбинационного рассеяния исследуемых полимерных материалов на основе полилактида получали с использованием научно-исследовательского комплекса Centaur U HR (Nano Scan Technologies, ТПУ).

Режим съемки: длина волны лазера $\lambda = 532$ нм, время экспозиции – 30 секунд, диапазон спектра (100 – 4000) см^{-1} .

2.5.7. Оптическая спектроскопия в видимом диапазоне света

Определение оптической прозрачности плёнок и трековых мембран на основе плёнки полилактида осуществлялось методом оптической спектроскопии. Измерение коэффициентов пропускания видимого света T от длины волны λ производилось с помощью флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent technologies, США) в диапазоне длин волн 380 – 760 нм. В качестве источника излучения использовали импульсную ксеноновую лампу с длительностью импульса 2 мкс, эквивалентной мощностью до 75 кВт и частотой следования световых импульсов 80 Гц. Спектральная ширина щели 1,5 нм. Абсолютная погрешность установки длин волн монохроматора составляла 1,5 нм. Съёмку спектров пропускания проводили не менее пяти раз для каждой группы образцов.

Прозрачность рассчитывали по формуле [116]:

$$\text{Прозрачность} = -\text{Log}\left(\frac{T_{\lambda}}{h}\right) \quad (2.7)$$

где T_{600} – светопропускание (T) (%) при определенной длине волны λ (нм), h – толщина плёнки (нм).

2.5.8. Методика исследования механических характеристик плёнки полилактида

Механические свойства образцов плёнки полилактида были исследованы на универсальной испытательной установке Instron 3300 (Instron, США) в соответствии с ГОСТ 14236–81 и ГОСТ 11262–50 [117, 118]. Толщина образцов составляла 0,015 мм, ширина 10 мм, общая длина 50 мм, базовая длина 10 мм. Скорость испытания 1 мм/мин. Испытания проводились при температуре 23 ± 2 °С,

относительной влажности $50 \pm 5\%$. Для каждой группы образцов проводилось по 10 измерений, удалялись максимальные и минимальные значения, затем были рассчитаны среднее значение и отклонение.

Методом одноосного испытания на растяжение согласно ГОСТ 14236–81 и ГОСТ 11262–50 получены данные об относительном удлинении при растяжении, пределе текучести, напряжении при растяжении образцов. Модуль Юнга (E , МПа) вычислялся по формуле:

$$E = \frac{Fl}{S\Delta l}, \quad (2.8)$$

где: F – сила растяжения; S – площадь поверхности образца;

Δl – абсолютное удлинение; l – первоначальная длина.

2.6. Определение среднего диаметра пор и проницаемости ТМ методом “точка пузырька”

Среднее значение диаметра пор ТМ определяли методом «точка пузырька» на установке Porometer 1.0. (ТПУ), заключающимся в определении минимального давления газообразного азота, требующегося для прохождения через поры трековой мембраны, пропитанной этиловым спиртом (свободная поверхностная энергия $\gamma = 21,9$ мДж/м²). Схема процесса представлена на рисунке 2.4. Образцы для проведения испытания готовили в виде круга диаметром $(35 \pm 0,1)$ мм.

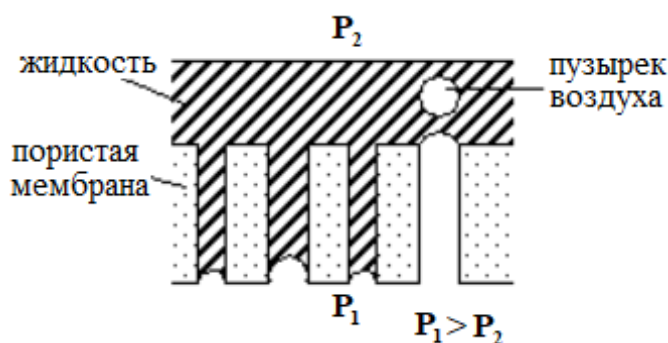


Рисунок 2.4 – Схема процесса продавливания пузырька через пору ТМ

Температура этанола 24 °С. Время вымачивания мембраны 30 минут. Скорость нарастания давления 0,002 МПа/мин при $P = 0,006 - 0,1$ МПа. За результат испытания принималось среднее арифметическое результатов трех параллельных определений минимального давления.

Диаметр пор определялся согласно эмпирическому уравнению Лапласа [119]:

$$d = 0,65/P, \quad (2.9)$$

где d – диаметр пор, мкм, P – давление, при котором наблюдается один или несколько пузырьков в центре мембраны, кгс/см².

Коэффициент 0,65 в числителе определен на основании калибровки по ПЭТФ мембранам типичной пористости (7 – 15%), толщины 10 – 12 мкм, с диаметрами пор в диапазоне 0,1 – 1 мкм. Поскольку данный коэффициент зависит от углового распределения пор, толщины мембраны, шероховатости поверхности и других факторов, формулу (1) можно применять для приближенной экспрессной оценки диаметра пор.

Метод «точка пузырька» имеет достаточно высокую погрешность в оценке среднего диаметра пор, которая, прежде всего, обусловлена допущениями о цилиндрической форме пор и абсолютной смачиваемости ($\cos\theta = 1$) мембраны. Однако описанный метод широко используется для первичной оценки мембран и проверки их целостности.

2.7. Ускоренная деградация плёнки полилактида

В работе проводили предварительный анализ механизма биodeградации плёнки полилактида. Ускоренную деградацию плёнок проводили в стерильной среде согласно ГОСТ Р ИСО 13781-2011 [120].

Подготовленные группы образцов диаметром 4 см выдерживали в вакуумной камере в течение 48 часов при температуре 25 °С, после чего проводили замер исходной массы плёнок $W_{исх}$ на аналитических весах с погрешностью 0,1 мг.

Образцы помещали в стеклянный стаканчик для взвешивания и заливали пропитывающим фосфатно-солевым буферным раствором («Росмедбио»,

pH = $7,76 \pm 0,10$) в массовом соотношении 1:30 (образец : раствор) и плотно закупоривали крышкой. Емкость помещали в термостат при постоянной температуре 70 ± 1 °C. Измерение pH раствора проводили ежедневно с помощью pH-метра pH-150МИ (разрешение: 0.01 pH). Изъятие образцов из раствора осуществляли через 6 ч, 24 ч и 168 ч после начала эксперимента. После чего полученные образцы промывали большим количеством дистиллированной воды (трёхкратно), высушивали на воздухе и выдерживали в вакуумной камере (давление 10^{-3} Торр) в течение 48 часов при комнатной температуре, после чего измеряли их массу W_t . Относительное значение потери массы ΔW рассчитывали гравиметрическим методом по формуле:

$$\Delta W = \frac{W_{\text{исх}} - W_t}{W_{\text{исх}}} \times 100\% \quad (2.10)$$

где $W_{\text{исх}}$ – исходная масса образца; W_t – масса после инкубации.

Для дальнейших исследований образцы хранились в десикаторе.

2.7.1. Анализ молекулярно-массовых характеристик плёнки полилактида

Среднюю молекулярную массу (M_w), среднечисловую молекулярную массу (M_n) и коэффициент полидисперсности (PD) образцов плёнки на основе полилактида определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) с использованием системы Agilent 1260 Infinity (Agilent technologies, США). Система оснащена колонкой Agilent PLgel 5 μm Mixed-C (300 x 7,5 mm) и рефрактометрическим детектором. В качестве элюента использовали хлороформ (ВЭЖХ, Thermo Fisher Scientific) при скорости потока 1 мл/мин. Эксклюзионное разделение проводили при температуре 40 °C, объем пробы составлял 20 мкл. Концентрация полимера в растворе составляла 0.8% масс. Калибровка хроматографической системы осуществлялась согласно полистирольным стандартам Agilent. Обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения Agilent GPC_Addon.

2.8. Исследование цитотоксичности полученных мембран

Цитотоксичность полученных мембран оценивали методом проточной цитофлуориметрии с определением процентного соотношения погибших и живых клеток, а также общего количества клеток на проточном цитофлуориметре Guava EasyCytePlus (Millipore, США) с использованием программы GuavaVia Count (Millipore, США). Для определения жизнеспособности клеток использовали мононуклеарные лейкоциты крови. Образцы материалов размерами 10 x 10 мм и толщиной 15,5 мкм, в количестве одной штуки, помещали в 24-луночный планшет и сокультивировали с клетками в количестве 1000 шт в течение 24 часов. В контрольные лунки помещали взвесь клеток без тестируемых образцов.

2.9. Медико-биологические исследования *in vivo*

Изучение влияния имплантации плёнок на основе полилактида на роговую оболочку проводили на 20 кроликах калифорнийской породы весом 2,0 – 3,0 кг, которые были разделены на 4 группы:

первая группа – 5 животных, которым моделировали буллезную кератопатию.

вторая группа – 5 животных, которым после моделирования буллезной кератопатии имплантировали тонкие плёнки полилактида.

третья группа – 5 животных, которым после моделирования буллезной кератопатии имплантировали трековые мембраны на основе плёнки полилактида на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с последующим наложением аутологичных мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, выделенных *ex tempore*.

четвертая группа – 5 животных, которым после моделирования буллезной кератопатии имплантировали трековые мембраны на основе плёнки полилактида на пучке иона $^4\text{He}^{2+}$ с последующим наложением аутологичных мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, выделенных *ex tempore*.

Кролики содержались в строго идентичных условиях. Осуществление экспериментов *in vivo* проводилось согласно общепринятым принципам

гуманности и этическим требованиям по работе с лабораторными животными, прописанных в нормативных документах и инструкциях министерства здравоохранения РФ и РАМН. Работа согласована локальным этическим комитетом (регистрационный номер № 7892 от 13.05.2019 г.).

Моделирование буллезной кератопатии осуществляли путем механического повреждения и удаления эндотелия роговицы одного из глаз (рисунок 2.5).

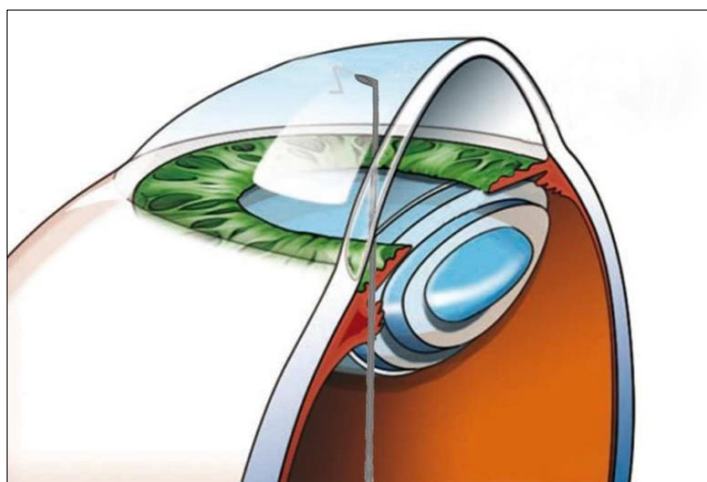


Рисунок 2.5 – Схема моделирования буллезной кератопатии

Через 2 недели после формирования патологического процесса имплантировали материал. Для этого в роговице одного из глаз формировали тоннельный надрез (1,5 мм) на 9 часах от лимба, через который в переднюю камеру имплантировали плёнку или мембрану на основе плёнки полилактида, после чего ее фиксировали одним узловым швом нитками 10/00. Для третьей и четвертой группы после имплантации материала с помощью шприца через надрез в переднюю камеру на границе внутренней поверхности роговицы и полимера вводили суспензию аутологических моноклеаров крови. Края надреза гидратировали.

Подготовка моноклеарных клеток из крови экспериментального животного осуществлялась методом фракционирования в градиенте плотности на разделяющем растворе фиколл-верографин [121]. В стерильную пробирку помещали гепаринизированную кровь в количестве 4,0 мл, после чего её

разбавляли в 2 раза физиологическим раствором хлорида натрия. Далее полученный раствор наслаивался на 3,0 мл смеси фиколл-верографина (12 частей фиколла: 5 частей верографина) (рисунок 2.6 а).

В дальнейшем пробы центрифугировали в течение 15 мин на 2000 об/мин при комнатной температуре [121]. После чего при помощи пастеровской пипетки был отобран интерфазный слой, содержащий мононуклеары и находящийся между плазмой и градиентом (рисунок 2.6 б). Для отмывки полученных клеток в пробирке

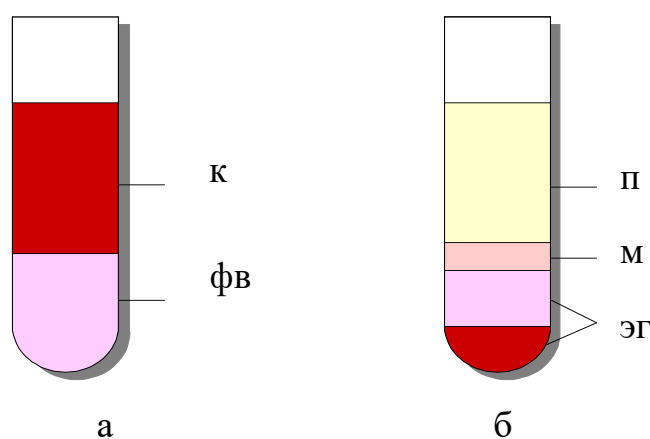


Рисунок 2.6 – Схема разделения гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов крови на градиенте плотности: а – до центрифугирования, б – после центрифугирования; к – кровь; фв - смесь фиколл-верографина; п – плазма; м - интерфазный слой мононуклеаров; эг - осадок эритроцитов и гранулоцитов [121]

смешивали отобранный слой и 1,0 мл изотонического раствора хлорида натрия, после чего смесь центрифугировали в течение 7 мин на 1500 об/мин [121]. Чистота полученных мононуклеаров составляла 96 – 98%.

В послеоперационном периоде всем животным проводили инстилляцию каплями Тобрекс (3 раза в день), Диклофенак (3 раза в день), наружный осмотр, фоторегистрацию и оптическую когерентную томографию (ОКТ) на оптическом когерентном томографе 3D OCT-1 Maestro (США). Забор материала проводился спустя 6 недель от начала эксперимента.

Для гистологического исследования энуклеированные глазные яблоки фиксировали в 12% нейтральном формалине. По истечению 24 часов объекты

исследования промывали под проточной водой, подвергали обезвоживанию, проводя через серию спиртов восходящей концентрации, просветляли в О-ксилоле и заливали в парафин. Срезы готовили на микротоме МС-1 (Россия) и окрашивали гематоксилином и эозином, альцианом синим, а также методом Ван-Гизона. Микроскопические исследования гистологических срезов проводили с использованием микроскопа МИКМЕД-6 (Россия). В качестве контроля использовали вторые, неоперированные, глаза.

Подготовка образцов для электронно-микроскопического исследования заключалась в формировании ультратонких срезов из кусочков роговицы толщиной 60 – 100 нм на “Ultratome III” (“LKB”, Швеция). Анализ ультраструктуры осуществлялся методом трансмиссионной электронной микроскопии на электронном микроскопе “JEM-100 CXII” (“JEOL”, Япония) с апертурной диафрагмой 25 – 30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Подсчет удельного объема сосудов осуществлялся при помощи окулярной сетки Автандилова на 50 точек (= 100%), для чего в десяти независимых полях зрения определялось количество определяемых структур, попадающих на строку, вычислялся удельный объем (%).

2.10. Методы статистической обработки экспериментальных данных

Анализ полученных данных проводился при помощи программы «Statistica 64». Нормальность распределения показателей проверялась при помощи закона Колмогорова-Смирнова. Выявление причинно-следственной связи между выборками осуществляли методом корреляционно-регрессионного анализа. Оценка тесноты взаимосвязи переменных величин x и y оценивалась по рассчитанным коэффициентам корреляции Пирсона (r) и детерминации (R^2). Зависимость считали сильной при $r > 0,65$ и очень сильной при $r > 0,81$ [122].

Анализ переменных, имеющих нормальное распределение, проводился с помощью t -критерия Стьюдента. При несоответствии распределения данных нормальному закону распределения применялся непараметрический критерий –

тест Манна-Уитни (p_U). Различия между группами считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,01$ [122, 123].

Глава 3. Структурные особенности и физико-химические свойства плёнки полилактида

3.1. Морфология поверхности плёнки полилактида по данным РЭМ

Важным аспектом в разработке трековых мембран на основе биорезорбируемой полимерной матрицы является использование качественного исходного материала. В связи с чем, формирование функциональной плёнки на основе полилактида из раствора методом розлива, а также изучение её первоначальной микроструктуры и морфологии поверхности является первостепенной задачей.

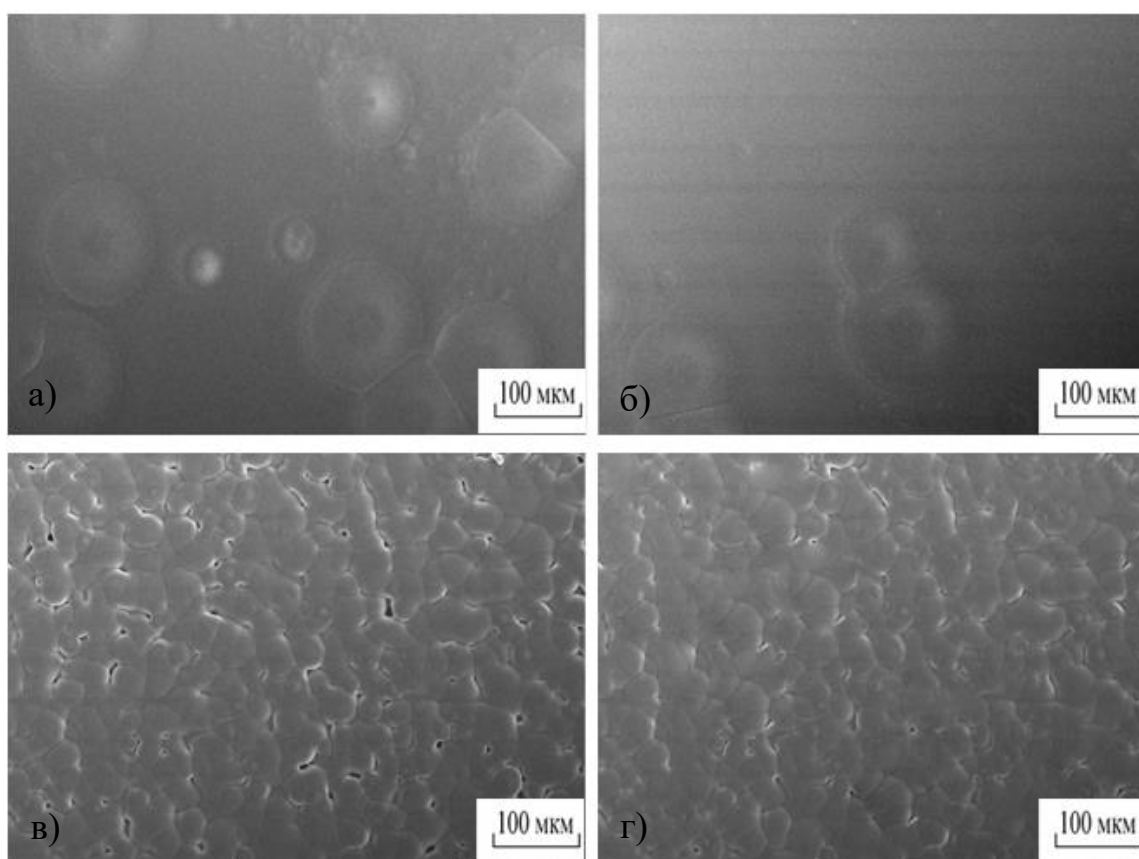


Рисунок 3.1 – РЭМ изображения поверхности плёнки полилактида полученной из раствора:

а) 10 г - внешняя сторона, б) 10 г - внутренняя сторона, в) 30 г - внешняя сторона; г) 30 г - внутренняя сторона

На рисунке 3.1. представлены типичные электронно-микроскопические изображения поверхности исходной плёнки полилактида, полученной из 10 г раствора. Из изображений на рисунке 3.1.а, б, видно, что плёнка не содержит видимых дефектов: поперечных морщин, пор, трещин и т.д., а топография поверхности и её шероховатость зависят от стороны поверхности плёнки и природы контакта (раствор – атмосфера, раствор – стекло чашки Петри). Показано, что внешняя сторона поверхности плёнки, контактирующая с атмосферой (рисунок 3.1.а), имеет более рельефную поверхность, в отличие от более гладкой внутренней стороны, контактирующей с чашкой Петри (рисунок 3.1.б).

Данные различия связаны с методикой получения плёнки [65, 66, 88, 89], согласно которой раствор выливается и высыхает в чашках Петри, тем самым контактируя только с поверхностью чашки одной стороны и формируя внутреннюю сторону материала более гладкой.

Следует отметить, что топография поверхности и толщина плёнки зависит и от массы вылитого в чашку Петри раствора. В качестве примера на рисунке 3.1 (в, г) представлено электронно-микроскопическое изображение поверхности плёнки полилактида, вылитой из раствора 30 г. Видно, что поверхность плёнки рельефная и имеет более рыхлую структуру в отличие от плёнки, вылитой из 10 г.

Толщину плёнки определяли с помощью оптиметра ИКВ-3, среднее значение толщины составляло для плёнки, вылитой из раствора 10 г – $(15,5 \pm 0,5)$ мкм, из раствора 20 г – $(26,0 \pm 0,5)$ мкм, из раствора 30 г – $(37,0 \pm 0,5)$ мкм.

3.2. Морфология поверхности: шероховатость плёнки полилактида

На рисунках 3.2 и 3.3 представлены микрофотографии топографии внешней стороны поверхности исходной плёнки полилактида полученные методом АСМ.

Расчёт данных по профилям поверхности показал, что внешняя сторона плёнки, полученной из 10 г раствора обладает средней шероховатостью $R_a = 7,5 \pm 2,0$ нм (таблица 3.1), среднеквадратичной шероховатостью $R_q = 11,5$ нм и максимальным значением параметра шероховатости $R_z = 116,0$ нм (рисунок 3.2).

Внутренняя сторона плёнки обладает более однородной, гладкой поверхностью в нанометровом масштабе: средние значения $R_a = 4,8 \pm 1,0$ нм, $R_q = 7,1$ нм, $R_z = 42,0$ нм.

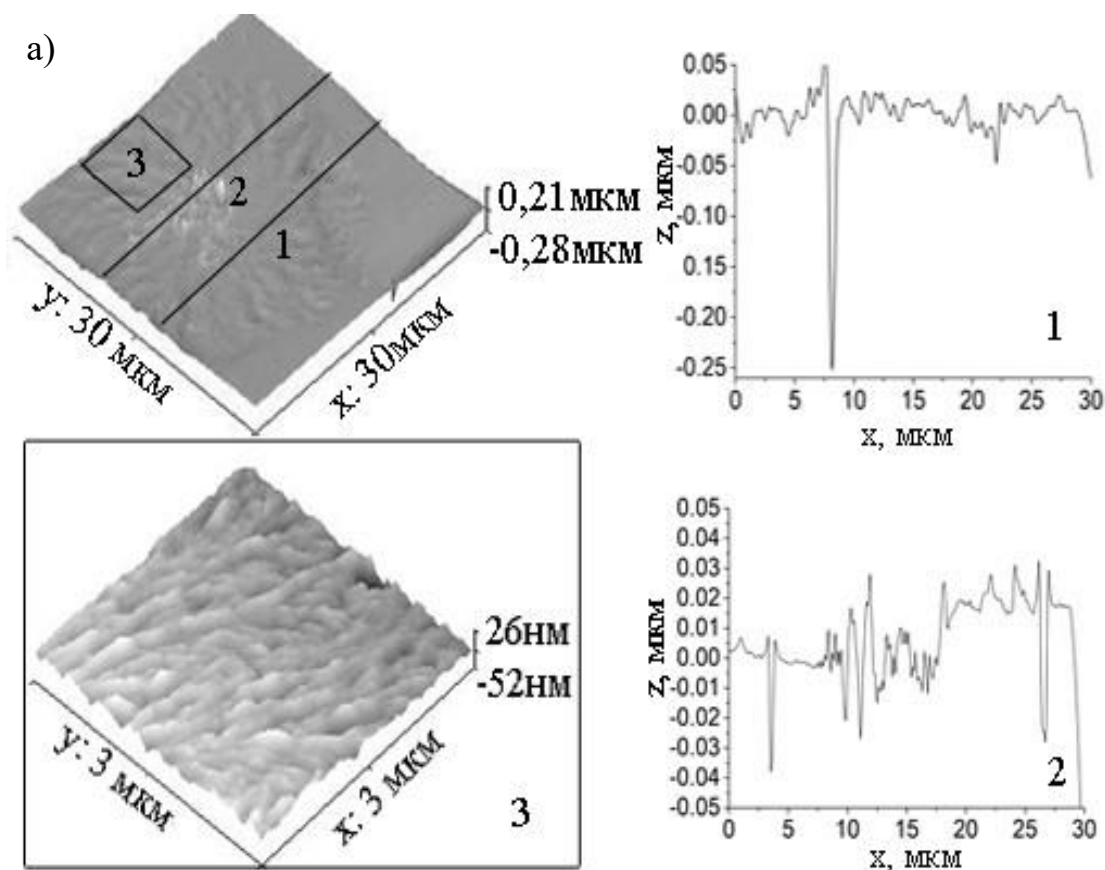


Рисунок 3.2 – Трёхмерные изображения (а, 3) и профили внешней стороны (1, 2) поверхности исходной плёнки полилактида

Плёнка, полученная из 20 г раствора, обладает средней шероховатостью внешней стороны $R_a = 26,0 \pm 2,0$ нм (таблица 3.1), среднеквадратичной шероховатостью $R_q = 23,4$ нм и максимальным значением параметра шероховатости $R_z = 83,1$ нм (рисунок 3.3, а), тогда как внутренняя сторона плёнки имеет следующие средние значения $R_a = 7,0 \pm 1,0$ нм, $R_q = 6,4$ нм, $R_z = 21$ нм.

Наибольшей шероховатостью обладает плёнка, полученная из 30 г раствора для внешней стороны $R_a = 32,0 \pm 3,0$ нм, $R_q = 41$ нм, $R_z = 118$ нм, а для внутренней стороны $R_a = 17,0 \pm 1,5$ нм, $R_q = 16$ нм, $R_z = 57$ нм, (рисунок 3.3, б).

Таблица 3.1 – Средняя шероховатость поверхности плёнки полилактида (площадь сканирования 30×30 мкм)

№	Образцы		Средняя шероховатость, R_a , нм	
1	10 г	внутр	$4,8 \pm 1,0$	* $p < 0,01$
		внеш	$7,5 \pm 2,0$	
2	20 г	внутр	$7,0 \pm 1,0$	* $p < 0,01$
		внеш	$26,0 \pm 2,0$	
3	30 г	внутр	$17,0 \pm 1,5$	* $p < 0,01$
		внеш	$32,0 \pm 3,0$	

Примечание: * $p < 0,01$ - уровень статистической значимости различий внутренней и внешней сторон

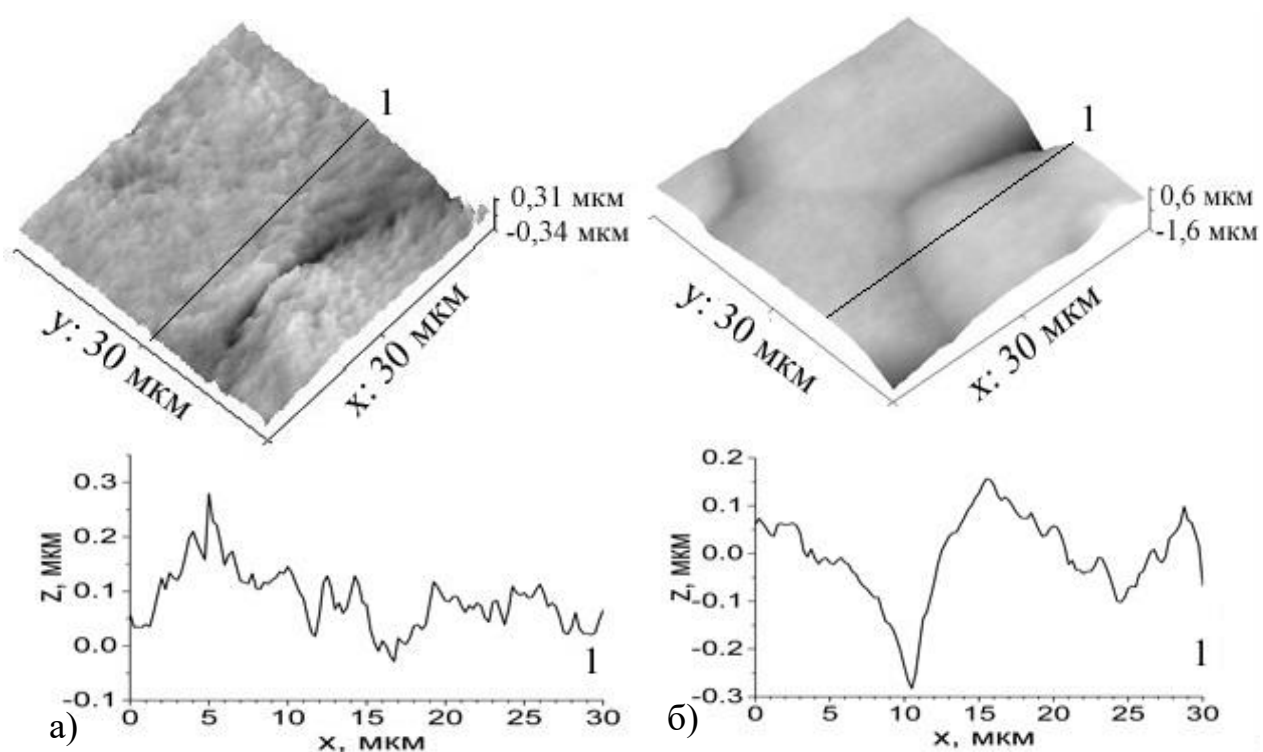


Рисунок 3.3 – Трехмерные изображения и профили внешней стороны поверхности плёнки, вылитой из 20 г (а) и 30 г (б)

3.3. Контактный угол смачивания и поверхностная энергия плёнки полилактида

Ещё одной важной характеристикой материалов, применяемых в регенеративной медицине, влияющей на их биосовместимость с живой тканью организма, является смачиваемость поверхности. Известно, что гидрофобная поверхность биоимплантата с низкой величиной поверхностной энергии отрицательно влияет на взаимодействие «полимер-клетка» [124]. Как правило, для лучшей пролиферации и дифференцировки клеток, полимерные материалы должны обладать гидрофильной поверхностью, с контактным углом не выше 65°–75° (для воды) [125].

Согласно полученным результатам исследований смачиваемости поверхности, внутренняя сторона образцов плёнки полилактида полученная из 10 г раствора, для случая воды, обладает краевым углом смачивания порядка 71 °, т.е. их свойства приближены к гидрофобным. Из данных таблицы 3.2 видно, что поверхностная энергия исходных плёнок составляет $\gamma = 33,8 \pm 0,9$ мДж/м², при этом наблюдается преобладание вклада дисперсионной составляющей. Полярность плёнки полилактида была определена отношением кислотно-основной составляющей свободной поверхностной энергии полимера (γ^P) к ее полной величине $-p = \frac{\gamma^P}{\gamma}$ [126], и для внутренней поверхности составила 0,47. Внешняя сторона образцов плёнки обладает краевым углом смачивания воды несколько меньшим (70 ° ± 1,2 °), чем внутренняя. Полярность внешней стороны поверхности образцов 0,48.

Из оценки значений краевого угла смачивания и поверхностной энергии следует, что обе стороны поверхности практически идентичны.

Для плёнки полилактида полученной из 20 г и 30 г, краевой угол смачивания внешней стороны, практически не отличался, и для случая воды, составляет порядка 75 ° ± 3 °, а для внутренней стороны образцов 73 ° ± 3 °, и характеризуется превалированием дисперсионной составляющей свободной поверхностной

энергии. При этом видно, что шероховатость не оказывает заметного влияния на величину θ . Полярность как для внешней, так и внутренней стороны поверхности образцов вылитых для 20 г и 30 г составила 0,48 и 0,47 соответственно. При этом статистический анализ не показал значимых различий между образцами вылитых из 20 г и 30 г * $p > 0,01$.

Таблица 3.2 – Свободная поверхностная энергия для внутренней и внешней стороны плёнки полилактида

Параметры плёнок		γ , мДж/м ²	γ^D , мДж/м ²	γ^P , мДж/м ²
Внутренняя сторона	10г	33,8 ± 0,9	17,9 ± 0,5	15,9 ± 0,4
Внешняя сторона		34,2 ± 0,5	18,3 ± 0,3	16,6 ± 0,2
Внутренняя сторона	20г	34,8 ± 0,9	18,0 ± 0,4	16,8 ± 0,5
Внешняя сторона		35,3 ± 0,5	18,3 ± 0,2	17,0 ± 0,3
Внутренняя сторона	30г	34,9 ± 0,7	18,4 ± 0,2	16,5 ± 0,5
Внешняя сторона		35,9 ± 0,8	19,0 ± 0,4	16,9 ± 0,4

Примечание: поверхностная энергия (γ), дисперсионная (γ^D) и поляризационная (γ^P) составляющие

Так сравнение полученных данных о толщине, шероховатости и параметров смачиваемости поверхности плёнки от вылитой массы вылитого в чашку Петри раствора, позволили выделить, что плёнки, полученные из 10 г раствора, обладают оптимальными первоначальными параметрами, необходимыми для получения на их основе трековых мембран как биорезорбируемого роговичного имплантата для кератопластики.

3.4. Исследование структуры и молекулярного состава плёнки полилактида методами комбинационного рассеяния света и ИК спектроскопии

Подробную информации о структуре полимерной плёнки полилактида полученной из 10 г раствора и их химическом составе, получали взаимно

дополняемыми методами комбинационного рассеяния света и ИК спектроскопии.

Идентификация функциональных групп поверхностного слоя плёнки осуществлялась методом *ИК-спектроскопии* за счёт высокой чувствительности спектроскопии к изменениям дипольного момента данной вибрирующей группы [127]. На рисунках 3.4 представлен нормализованный ИК–спектр плёнки полилактида, из которого отчетливо видно, что в нём присутствуют все характерные полосы поглощения полимолочной кислоты на 1456 см^{-1} $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1312 см^{-1} $\delta_2(\text{CH})$, 1269 см^{-1} $\delta(\text{CH}) + \nu(\text{C} - \text{O} - \text{C})$, 1189 см^{-1} $\nu_{\text{as}}(\text{C} - \text{O} - \text{C}, \text{I})$, 1132 см^{-1} $r_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1095 см^{-1} (валентных симметричных $\nu_s(\text{C} - \text{O} - \text{C})$), 1039 см^{-1} $\nu(\text{C} - \text{CH}_3)$, 872 см^{-1} $\nu(\text{C} - \text{COO})$, 754 см^{-1} $\delta(\text{C} = \text{O})$ и 695 см^{-1} $\gamma(\text{C} = \text{O})$, а также на 1754 см^{-1} относящейся к валентным колебаниям карбонильной группы $\nu(\text{C} = \text{O})$ [111, 128]. Кроме того, видны характерные полосы 2996 см^{-1} и 2944 см^{-1} , обусловленные симметричными и асимметричными колебаниями $\nu_s(\text{CH}_3)$ и $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$. Присутствует полоса на 3500 см^{-1} , которая относится к колебаниям небольшого количества воды, адсорбированной на поверхности плёнки.

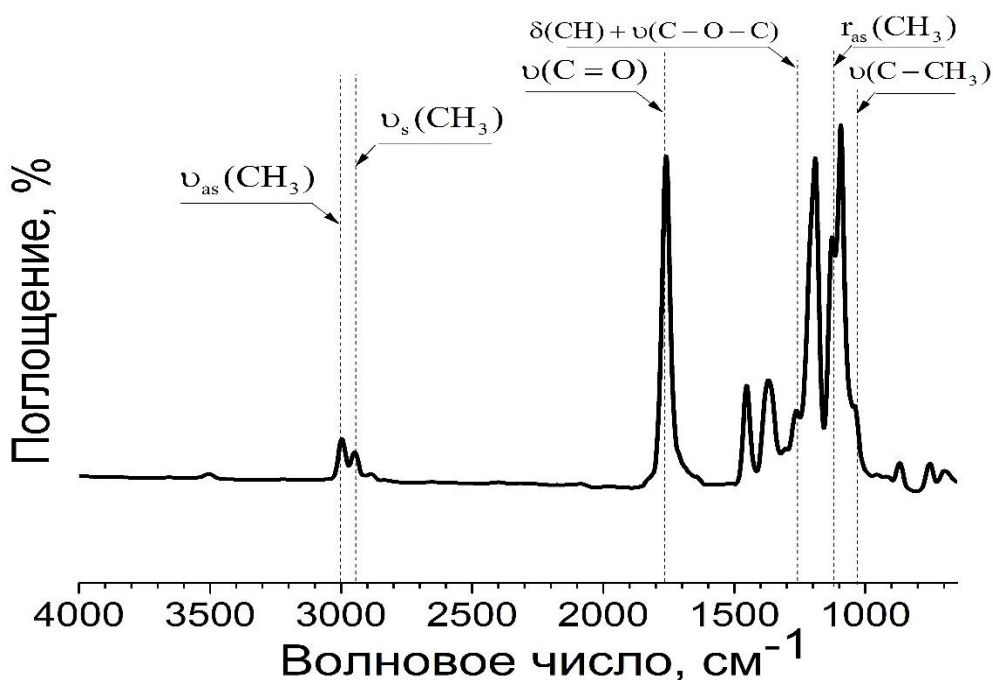


Рисунок 3.4 – Нормализованный ИК – спектр поглощения плёнки полилактида: где s – симметричные, as – ассиметричные, r – вращательные, ν -валентные, δ -деформационные, γ -скелетные колебания

Более детальное изучение структурных и фазовых характеристик плёнки полилактида, а также выявление слабополярных групп было осуществлено методом комбинационного рассеяния света. Спектр комбинационного рассеяния (спектр КР) был нормирован на максимум интенсивности полосы 873 см^{-1} . В спектре КР, изображенном на рисунке 3.5, однозначно представлен классический набор линий при 305 см^{-1} , 403 см^{-1} , 705 см^{-1} , 756 см^{-1} , 873 см^{-1} , 1092 см^{-1} , 1124 см^{-1} , 1179 см^{-1} , 1216 см^{-1} , 1293 см^{-1} , 1381 см^{-1} , 1452 см^{-1} , 1763 см^{-1} принадлежащий различным колебательным модам полилактида.

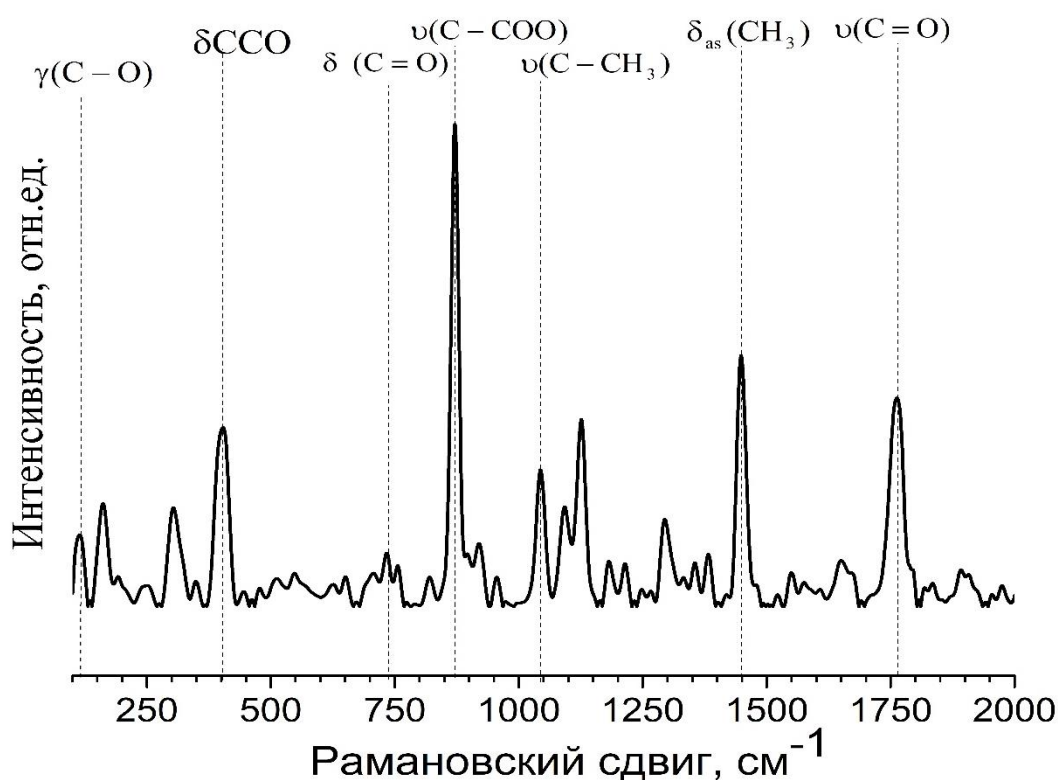


Рисунок 3.5 – Нормированный на максимум интенсивности спектр комбинационного рассеяния плёнки полилактида

Известно, что спектр КР полилактида может характеризоваться набором линий валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$, которые соответствуют 4 активным модам А, В, E_1 и E_2 при 1749 см^{-1} , 1763 см^{-1} , 1769 см^{-1} и 1773 см^{-1} [127]. В частности, спектр КР полученной плёнки полилактида соответствует моде В (1763 см^{-1}). Также

присутствует линия при 1452 см^{-1} относящаяся к деформационным ассиметричным колебаниям $\delta_{as}(\text{CH}_3)$, которая хорошо наблюдается как в спектре поглощения ИК, так и спектре КР. Рассматривая область от 1400 см^{-1} до 1250 см^{-1} , можно выделить хорошо разрешенные пики небольшой интенсивности при 1381 см^{-1} (А), 1356 см^{-1} (В), 1293 см^{-1} (Е (E_1 и E_2)), относящиеся к полукристаллической структуре полилактида и соответствующие колебаниям $\delta_s(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH}) + \delta_s(\text{CH}_3)$, $\delta_2(\text{CH})$ [99, 127]. В отличие от полос поглощения на ИК-спектре, ассиметричные и симметричные моды $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ при 1124 см^{-1} и 1092 см^{-1} обладают низкой интенсивностью полос на КР спектре, а валентные колебания в спектре КР $\nu(\text{C} - \text{CH}_3)$ и $\nu(\text{C} - \text{COO})$ при 1042 см^{-1} и 873 см^{-1} представлены более интенсивными линиями. Данные наблюдения можно связать с различной физической природой происхождения колебательных спектров, так полосы поглощения на спектре ИК-поглощения обусловлены переходами электронов между колебательными уровнями молекулы или полимера, а на спектре КР – вызваны поляризацией электронных оболочек внешним монохроматическим электромагнитным излучением видимого или УФ-диапазона. Из чего следует, что при данном колебании происходит увеличение интенсивности полосы поглощения в ИК спектре при изменении дипольного момента, и оно активно в спектре КР, если при этом колебании происходит изменение поляризуемости [127]. Также в спектре КР полилактида можно наблюдать линии на 756 см^{-1} , 705 см^{-1} , 403 см^{-1} , 305 см^{-1} , соответствующие деформационным и скелетным колебаниям $\delta(\text{C} = \text{O})$, $\gamma(\text{C} = \text{O})$, δCCO , $\delta_2(\text{C} - \text{CH}_3) + \delta\text{COC}$.

Таким образом, полученные данные хорошо коррелируют с результатами ИК спектроскопии.

3.5. Теплофизические свойства и степень кристалличности полимерных плёнок полилактида

Измерение тепловых эффектов в плёнке полилактида осуществляли методом дифференциальной сканирующей калориметрии в интервале температур от 10 до

275 °С. На рисунке 3.6 представлена термограмма исходной плёнки, на которой можно отметить очень слабый эндотермический эффект с потерей массы до 3% в районе 36 °С, обусловленный удалением слабосвязанной воды (рисунок 3.6 (1)). Также в области 171 °С наблюдается пик эндотермического эффекта, соответствующего температуре плавления T_2 полимера. Оценка изменения энтальпии плавления осуществлялась из расчёта площади пика под кривой плавления, а вычисление степени кристалличности полимера ($I_{ст.кр}$) (см. формулу 2.2) показало, что содержание кристаллической фазы в исходных плёнках полилактида составило 38,43%.

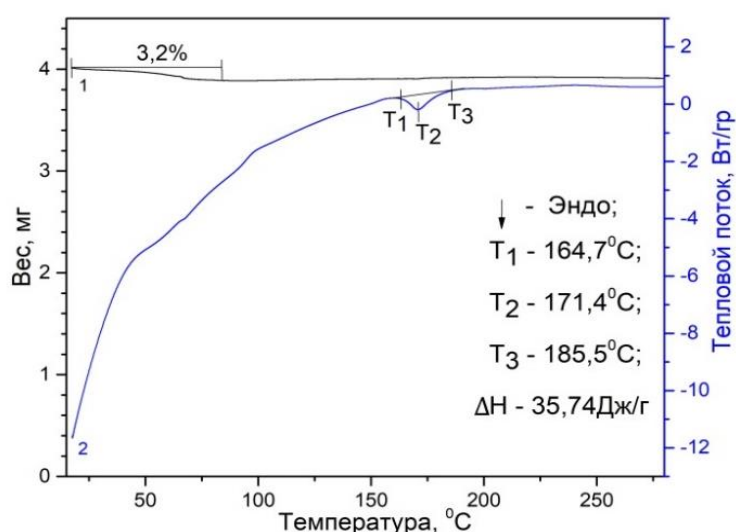


Рисунок 3.6 – Термограмма исходной плёнки полилактида, где T_1 – температура начала плавления, T_2 – температура максимума, T_3 – температура окончания пика плавления (°С), энтальпия плавления ΔH_m (Дж/г)

3.6. Исследование оптических свойств плёнки полилактида

В связи с подготовкой материала для трековых мембран на основе плёнки полилактида и их дальнейшего использования в качестве кератоимплантата в офтальмологии, необходимо, чтобы они были максимально прозрачны в видимой области спектра. Из спектра, представленного на рисунке 3.7, видно, что максимальное значение коэффициента пропускания спектра видимого излучения

исходных полимерных плёнок наблюдается при $\lambda = 400$ нм и находится в области 95%, что свидетельствует о высокой степени прозрачности и её однородности. В таблице 3.3 приведены показания прозрачности плёнки полилактида при $\lambda = 600$ нм, а также значения коэффициента светопропускания для разных длин волн в области видимого света 400 – 700 нм.

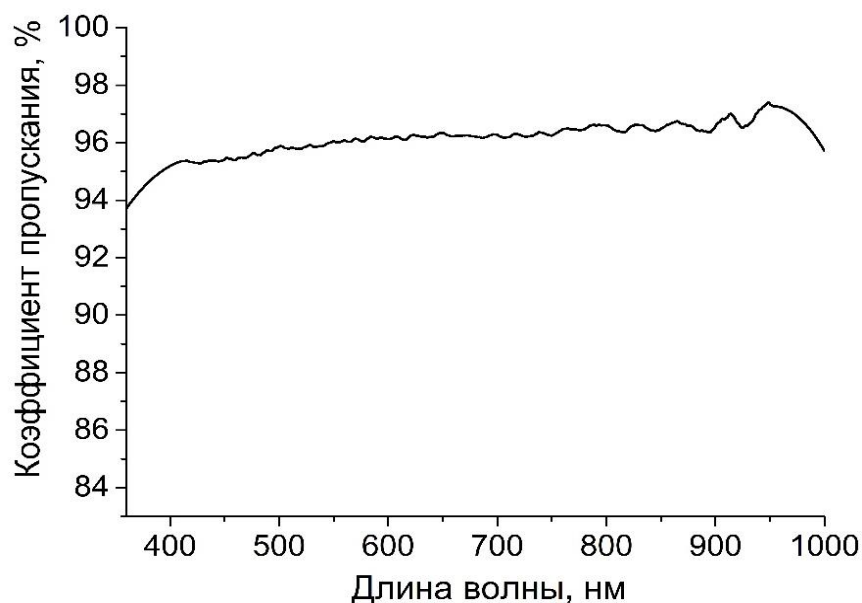


Рисунок 3.7 – Спектр светопропускания плёнки полилактида

Таблица 3.3 – Коэффициент пропускания света (Т, %) и прозрачность при $\lambda = 600$ нм плёнки полилактида

Образцы	(Т,%) на выбранных длинах волн, нм				Прозрачность
	400	500	600	700	
Плёнка полилактида	95,2	95,8	96,1	96,2	$2,19 \pm 0,02$

Примечание: Результаты представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение

3.7. Механические свойства плёнки полилактида

Исследование механических характеристик плёнки полилактида проводилось на установке Instron согласно ГОСТ 14236–81 и ГОСТ 11262–50. Анализ кривой «напряжение – деформация» плёнки, приведенный на рисунке 3.8, позволяет

выделить 4 характерные области напряжений, соответствующие аморфно-кристаллическому состоянию. Первая область (при величине деформации от 0% до 1,55%) соответствует упругой деформации полимера. Вторая область (при величине деформации от 1,55% до 1,66%) называется площадкой текучести, и свидетельствует о появлении пластической деформации, заключающейся в смещении макромолекулярных цепей относительно друг друга, за счёт деформирования межкристаллитных прослоек полимера, причем это проскальзывание имеет необратимый характер, в результате чего образец уже не может вернуться в исходное состояние после снятия напряжения [129]. Третья область (при величине деформации от 1,67% до 2,00%) является участком упрочнения полимера, включающим в себя низкую степень ориентации и рост новых кристаллических структур в направлении вытяжки [130]. Точка III соответствует максимальному напряжению (25,5 МПа), а также говорит о появлении локального сужения в образце – шейки. Четверная область (при величине деформации от 2,00% до разрушения образца) характеризуется уменьшением коэффициента деформационного упрочнения и развитием деформации. Точка IV кривой соответствуют максимальному относительному удлинению $2,4 \pm 0,2\%$ и разрыву образца. Рассчитанное значение модуля Юнга для плёнки полилактида составило 1660 ± 100 МПа.

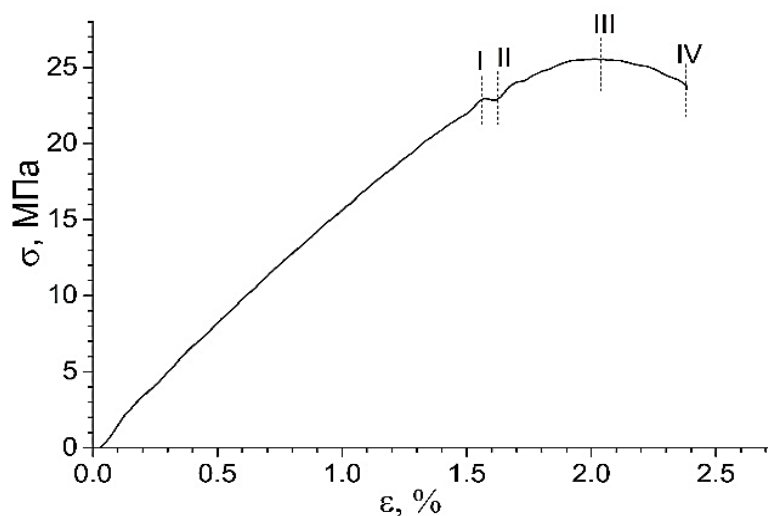


Рисунок 3.8 – Кривые «напряжение – деформация» плёнки полилактида

3.8. Определение влияния особенностей строения плёнки полилактида на процесс биodeградации

Одним из необходимых качеств биорезорбируемых кератоимплантатов на основе полилактида является их постепенное растворение. На скорость и степень биodeградации изделий из полилактида в биологических средах влияют физические, химические и биохимические (протекающие с участием ферментов) процессы. Изучение этих процессов позволяет оптимизировать сроки растворения и обеспечить успешное использование полимерных имплантатов.

В связи с этим в работе было проведено тестирование образцов плёнки полилактида на биоразложение согласно ГОСТ Р ИСО 13781-2011. В качестве модельной жидкости для процесса ускоренной гидролитической деструкции был выбран фосфатно-солевой буферный раствор ($\text{pH} = 7,76 \pm 0,10$) при постоянной температуре 70 ± 1 °C. Изъятие образцов из раствора осуществлялось через 6, 24 и 168 часов от начала эксперимента. Оценка степени деградации плёнки полилактида осуществлялась по проценту потери массы плёнки в сравнении с исходной. На рисунке 3.9 приведена кривая относительной потери массы плёнки полилактида от времени погружения их в фосфатно-солевой буферный раствор. Видно, что в первые 6 часов наблюдения достоверного снижения веса в плёнках не наблюдается, что свидетельствует о их низкой начальной скорости биodeградации. Дальнейший анализ полученных результатов выявил, что нахождение в растворе плёнки полилактида в течение 24 часов сопровождалось легким изменением прозрачности, при этом плёнки теряли до 0,38% веса. Эти изменения свидетельствуют о начале процесса разложения (гидролитической деструкции) полимеров в поверхностном слое (преимущественно в аморфных областях). При этом, свойства материала, в том числе и молекулярная масса, за пределами этой области не изменяются до разрушения внешнего слоя. Максимальный уровень деградации в образцах наблюдался через 168 ч и составляет 36,6%.

3.9. Изменения молекулярной массы плёнки полилактида

Молекулярную массу плёнки полилактида, а также детальный анализ изменения молекулярной массы в процессе её разложения (гидролитической деструкции) оценивали методом эксклюзионной хроматографии.

На рисунке 3.9 видно, что образцы имеют унимодальное распределение, состоят из одной фракции и являются полидисперсными полимерами $M_w/M_n > 1$. У плёнок наблюдается узкое ММР, где основная масса полимера представлена фракциями с молекулярной массой около $M_n = 122500$ г/моль (среднечисловая) и $M_w = 203500$ г/моль (среднемассовая). Плёнки полилактида обладают низким коэффициентом полидисперсности равным $M_w/M_n = 1,66$.

Нахождение исходной плёнки полилактида в фосфатно-солевом буферном растворе при рН, близком к нейтральной среде ($pH = 7,76 \pm 0,10$) в течение 24 ч, приводит к потере молекулярной массы M_n на 54% и M_w на 46%, при этом наблюдается рост коэффициента полидисперсности $M_w/M_n = 1,93$ (присутствие

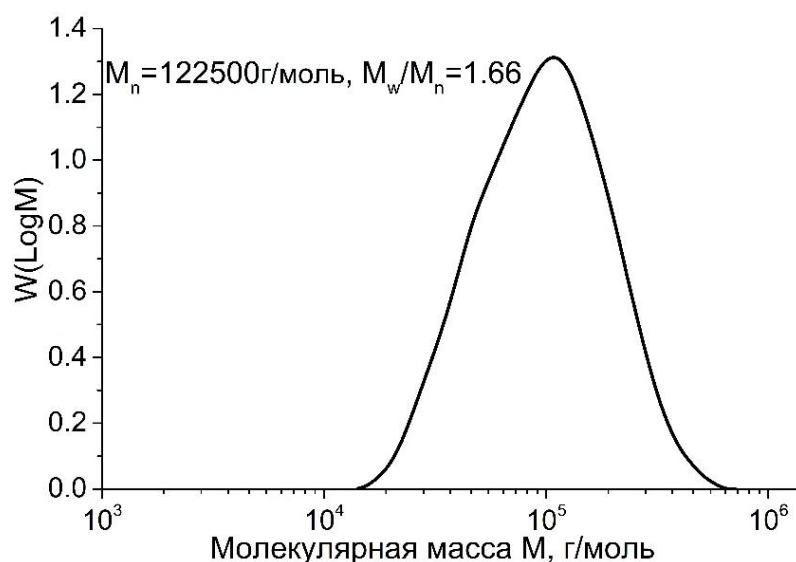


Рисунок 3.9 – Кривая молекулярно-массового распределения (ММР) исходной плёнки полилактида

макромолекул в широком диапазоне значений молекулярной массы). Это объясняется тем, что деструкция низкомолекулярных фракций протекает быстрее,

так как мономерные продукты гидролиза растворяются легче. Таким образом, из полимера удаляются низкомолекулярные фракции, а среднюю молекулярную массу начинают определять оставшиеся высокомолекулярные компоненты, что и обуславливает ее кажущееся увеличение [131].

При дальнейшем разложении плёнки полилактида, распределение молекулярной массы продолжало изменяться. На основании кривых ММР, полученных после выдерживания плёнки в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 168 ч при температуре 70 °С (рисунок 3.10), установлено, что распределение молекулярной массы стало носить ярко выраженный бимодальный характер с плечами, находящимися в низкомолекулярном хвосте хроматограммы. При этом наблюдаются значительные изменения молекулярной массы (M_n и M_w) обеих фракций (рисунок 3.10), так среднечисловая молекулярная массы фракции 1 составляет $M_{n_ф1} = 6526$ г/моль, фракции 2 – $M_{n_ф2} = 2263$ г/моль. И объясняется тем, что за счёт расщепления длинных цепей полилактида в результате гидролиза, что, в свою очередь, приводит к образованию более коротких цепей, линейных олигомеров и циклических структур [132].

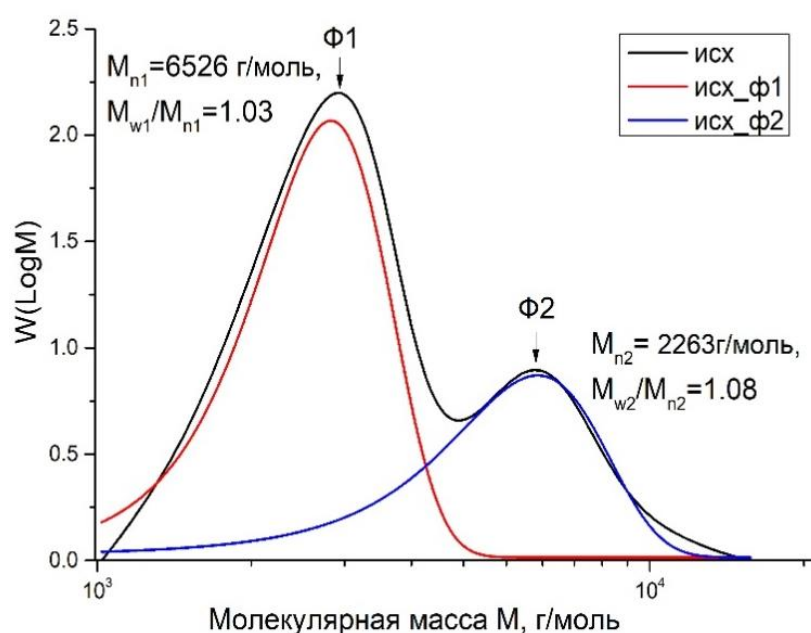


Рисунок 3.10 – Кривые молекулярно-массового распределения (ММР) плёнки полилактида на 7 день после их погружения в фосфатно-солевой буферный раствор $pH = 7,76 \pm 0,10$

3.10. Выводы по 3 главе

1. Выявлено, что топография поверхности, шероховатость и толщина плёнки зависит и от массы вылитого в чашку Петри раствора.

2. Установлено, что тонкие плёнки полилактида обладают свойствами, близкими к гидрофобным с контактным углом смачивания $70^\circ - 73^\circ$, независимо от шероховатости сторон поверхности.

3. Установлено, что степень кристалличности плёнки составляет 38,0%, при этом относительное удлинение при растяжении 2,4%, а модуль упругости 1660 МПа. При этом среднечисловая молекулярная масса равна $M_n=122500$ г/моль, а коэффициент полидисперсности $M_w/M_n = 1,66$.

Глава 4. Получение и исследование трековых мембран на основе плёнки полилактида

4.1. Облучение тяжёлыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ плёнки полилактида

Ранее упоминалось, что буллезная кератопатия является следствием нарушения эндотелиального слоя роговицы, основной физиологической функцией которой является сохранение постоянства содержания жидкости в строме, т. е. поддержание стромы в относительно дегидратированном состоянии, в результате чего обеспечивается прозрачность роговицы. Это достигается за счёт эффективного эндотелиального барьера между стромой роговой оболочки и водянистой влагой передней камеры и нормального функционирования метаболических помп. Основой барьерной функции эндотелиального слоя является наличие плотных и щелевидных контактов между эндотелиальными клетками, которые позволяют жидкости относительно свободно проникать в строму из передней камеры, несмотря на их малочисленное количество [133]. Кроме того, эндотелиальный слой роговицы очень плохо поддается восстановлению и выполняет насосную функцию, отвечающую за сохранение постоянного динамического равновесия между притоком жидкости в строму через эндотелиальный барьер и поступлением воды обратно в переднюю камеру по градиенту осмотического давления [133]. Изучение данного физиологического процесса позволяет выделить мембранные технологии в разработках новых подходов для лечения патологии. Полимерные пористые мембраны, в частности – трековые мембраны с системой сквозных изолированных пор, основной функцией которых является процесс отделения или разделения жидкостей путем фильтрации, можно использовать в качестве барьера при переносе внутриглазной жидкости между передней камерой и стромой за счёт их высокой селективности (разброс диаметра пор одиночных пор не более 5%).

«Классическая» технология получения трековых мембран состоит из двух основных этапов. Первый этап, как правило, включает в себя облучение исходного

материала высокоэнергетичными тяжелыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$. В настоящей работе в качестве исходного материала использовались полимерные плёнки на основе полилактида толщиной $15,5 \pm 0,5$ мкм. На рисунке 4.1 представлены фрагменты поверхности плёнки полилактида со стороны «входа» и «выхода» иона $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученные с помощью лазерно-сканирующего микроскопа Olympus Lext Ols4100 (Olympus, Япония). Видно, что под действием тяжёлых ионов на поверхности плёнки формируются следы латентных (скрытых) треков, протяженных структурных дефектов, представляющие собой поврежденный объем исходного вещества полимерной матрицы диаметром до 6 – 10 мкм. При этом трек может становится наблюдаемым, за счет изменений в свойствах, структуре или фазовом состоянии вещества вблизи траектории заряженного иона. Видимые линейные размеры сердцевин латентных треков на поверхности плёнки полилактида, облученной ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ со стороны “входа” ионов имели среднее значение диаметра $2,0 \pm 0,5$ мкм, а со стороны “выхода” ионов $1,8 \pm 0,5$ мкм.

Средняя плотность видимых следов треков при облучении как со стороны “входа”, так и со стороны “выхода” ионов составляет 3×10^5 трек/см², что является приблизительным значением, так как согласно литературным данным она должна совпадать с флюенсом ионов, однако увидеть с помощью электронного микроскопа в полимере все скрытые треки можно лишь с помощью специального окрашивания деструктивного радиацией вещества, однако метод очень трудоемкий и практически не доступен.

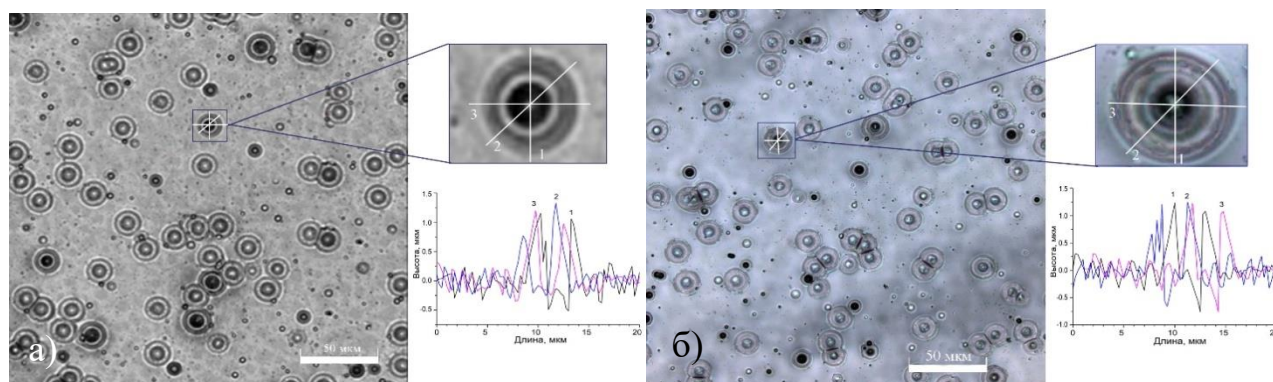


Рисунок 4.1 – Изображение поверхности и кратера входа иона (а) и выхода иона (б), где кривые

1, 2, 3 - профили латентного трека. Облучение ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$

4.2. Травление исходной плёнки полилактида

Второй этап получения трековых мембран заключается в формировании сквозных пор посредством избирательного химического травления, под действием которого происходит удаление поврежденного материала из сердцевины трека и образование пустотелого канала. Известно, что плотность пор контролируется потоком бомбардирующих ионов и продолжительностью облучения, в то время как характеристики пор, такие как форма и размер пор, контролируются свойствами полимера и условиями травления [134]. Поэтому выбор условий (концентрация, температура, состав травителя и т.д.) травления треков является одной из главных задач в процессе создания трековых мембран на основе плёнки полилактида.

Подбор условий травления будущих мембран, а также определение скорости травления однородных участков плёнки, не содержащих радиационных дефектов, проводился на необлученной биорезорбируемой плёнке полилактида. Образцы размером 2×2 см крепились согласно методике, описанной во 2-й главе данной работы. Плотность материала – $1,35 \text{ г/см}^3$. Тестовое травление проводилось в 0,1 М, растворе NaOH при температуре травления 18°C , интервал забора образцов составлял 5 минут. Как показали полученные данные, заметного изменения массы и толщины плёнок не наблюдалось, а за час нахождения образцов потеря массы составила около 3% (рисунок 4.2, а). Аналогичные результаты были получены при увеличении температуры раствора до 50°C (потеря массы составляла до 8%) (рисунок 4.2, б – г). В связи с этим, было принято решение увеличить концентрацию раствора, которая может сократить время травления на несколько порядков [135].

На рисунке 4.2. представлена зависимость изменения массы от времени травления в 1 М и 2 М растворе гидроксида натрия (NaOH) и температуры раствора травителя (18°C , 38°C , 44°C и 50°C). Увеличение температуры до 70°C при

травлении плёнки полилактида привело к их сильной деформации и скручиванию образцов, поэтому использование данной температуры травления полимерных

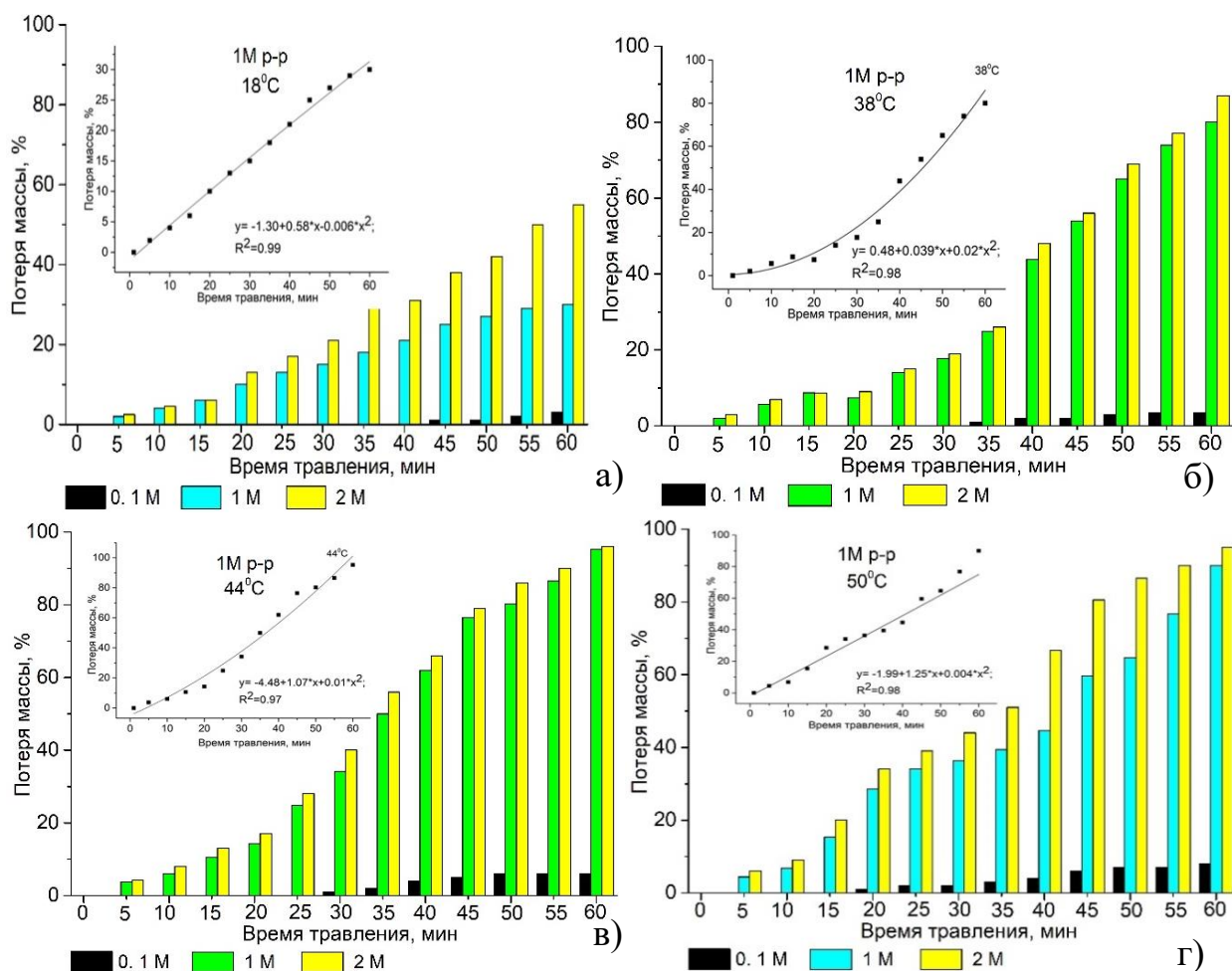


Рисунок 4.2 – Зависимость потери массы от времени травления исходной плёнки полилактида при температуре: а) 18°C, б) 38°C, в) 44°C, г) 50°C

материалов, широко применяемой в получении ТМ неприемлемо [134-137]. Из гистограммы видно, что при нагревании раствора травителя происходит увеличение потери массы (Δm). Максимум потери массы до 90% приходится на 60 минут нахождения плёнки полилактида в 1 М растворе NaOH при температуре 50 °C, в то время как при температуре 18 °C составляет около 30%. При 38 °C и 44 °C Δm находится в пределах 80 – 95%, за счёт щелочного гидролиза мономолекулярного слоя образцов. Кроме того, методом корреляционно-регрессионного анализа было выявлено, что зависимость описывается полиномом

второго порядка с коэффициентом детерминации R^2 меняющимся в пределах 0,99 – 0,97.

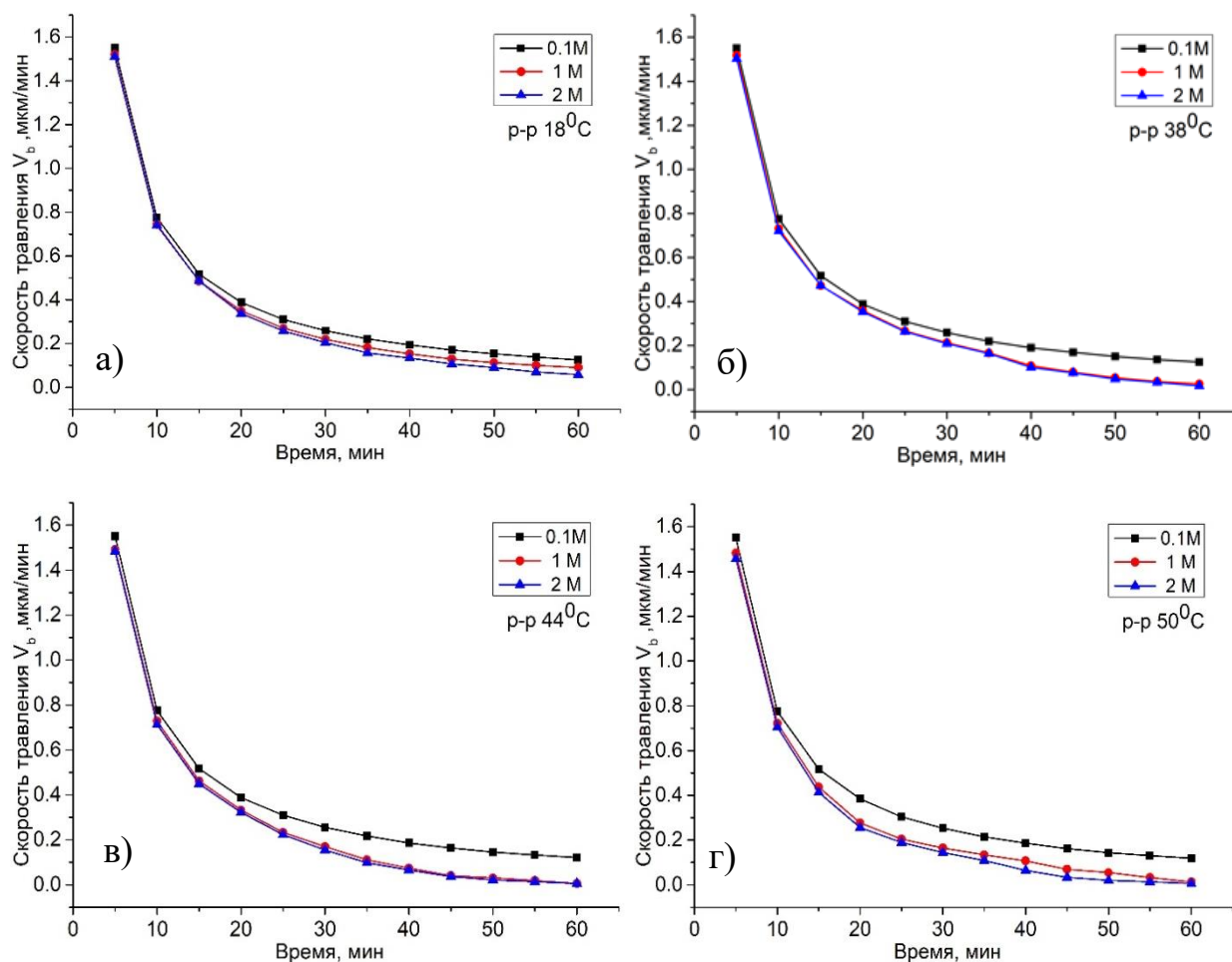


Рисунок 4.3 – Зависимость объемной скорости травления v_b плёнки полилактида от времени при постоянной концентрации ((0,1 М, 1 М и 2 М).) и температуре травления 18 °C(а) 38 °C (б), 44 °C(в) и 50 °C(г)

Увеличение концентрации раствора NaOH до 2 М повышает потерю массы плёнки полилактида в среднем на 12 – 13% по сравнению с концентрацией 1 М. Коэффициент детерминации R^2 находится в пределах 0,98 – 0,99.

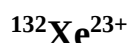
Также в работе была определена объёмная скорость травления v_b плёнки полилактида в диапазоне от 5 до 60 минут с шагом в 5 минут в растворе NaOH различных концентраций (0,1 М, 1 М и 2 М). Для расчёта скорости травления в объеме плёнки использовалось соотношение [138]:

$$v_b = \frac{\Delta m}{2S\rho t} \quad (4.1)$$

где Δm – изменение массы плёнки полилактида до и после травления (г), S – площадь образца (см²), ρ – плотность плёнки (г/см³) и t – время травления (мин).

Учитывая условия избирательности травления и полученные результаты, были определены оптимальные параметры, такие как концентрация раствора NaOH, время и температура для травления облучённой плёнки полилактида ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$, способствующие образованию ТМ с диаметром пор в пределах 0,02 – 2 мкм.

4.2.1. Травление плёнки полилактида после облучения тяжёлыми ионами



Для травления плёнки полилактида, облучённой тяжёлыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$, применялся 1 М раствор NaOH при температурах 38 °С, 44 °С и 50 °С. Время травления составляло 5, 10, 15, 20, 25 и 30 минут. После помещения плёнки в щелочной раствор начинался процесс травления, связанный с медленным проникновением травителя вглубь латентного трека, который представляет собой область с высокой плотностью нарушений материала, таких как разрывы и сшивки молекулярных цепей, вызванные прохождением через него тяжёлого иона $^{132}\text{Xe}^{23+}$, что приводит к уменьшению молекулярной массы и росту растворимости плёнки. В результате чего наблюдается выход в реакционный сосуд продуктов реакции двухстороннего травления, в результате чего образуется система сквозных пор. На границе раздела фаз полимер-жидкость происходит щелочной гидролиз неповрежденной плёнки полилактида [136]. По истечении времени нахождения в растворе, протравленные плёнки для нейтрализации следов щелочи и закрепления процесса помещались в 0,01%-уксусный раствор, затем промывались большим количеством дистиллированной воды.

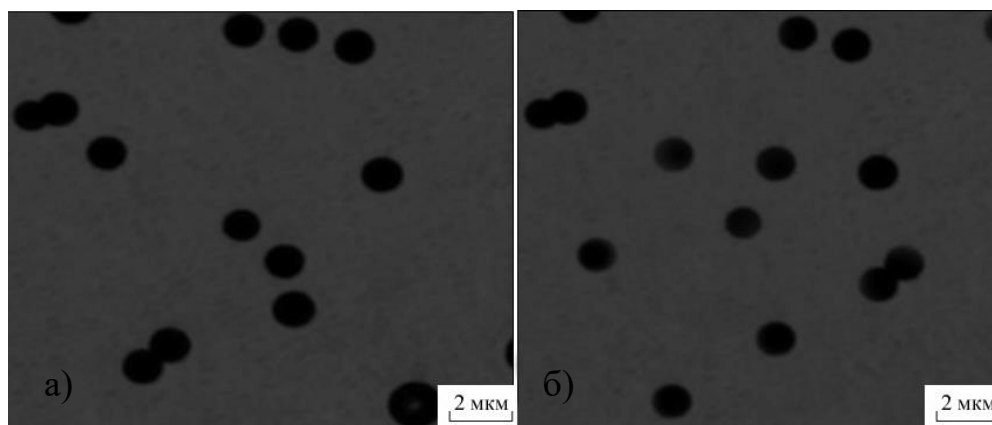


Рисунок 4.4 – Микрофотографии пор внутренней стороны (а) и внешней стороны (б) ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$

Анализ РЭМ-изображений показал, что предел обнаружения сквозных пор при травлении в растворе температурой $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ находится на 10 минуте после начала травления. С увеличением времени травления наблюдался рост диаметра пор. В качестве примера, на рисунке 4.4 представлены микрофотографии внутренней и внешней стороны трековой мембраны, полученной травлением в течение 25 минут при $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Olympus Lext Ols4100). На снимке видно, что поры обладают одинаковыми размерами. Средний диаметр пор для внутренней стороны составляет $1,05 \pm 0,10\text{ мкм}$, а внешней $1,11 \pm 0,10\text{ мкм}$.

При температуре раствора $\text{NaOH } 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ процесс травления пор протекает медленнее, видимые сквозные поры одного диаметра начали формироваться лишь на 15 минуте от начала травления. Это позволяет формировать мембраны с небольшим диаметром пор от $0,2\text{ мкм}$ до $0,5\text{ мкм}$ (рисунок 4.5, а). Увеличение температуры травления до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ привело к ускорению процесса травления, поры проявлялись на 5 минуте пребывания плёнки в растворе, однако процесс протекал неравномерно. На 20 – 25 минуте начинается деформирование плёнки, а последующее травление приводит к многократным наложениям пор, потере прочности и разрушению мембраны (рисунок 4.5, б).

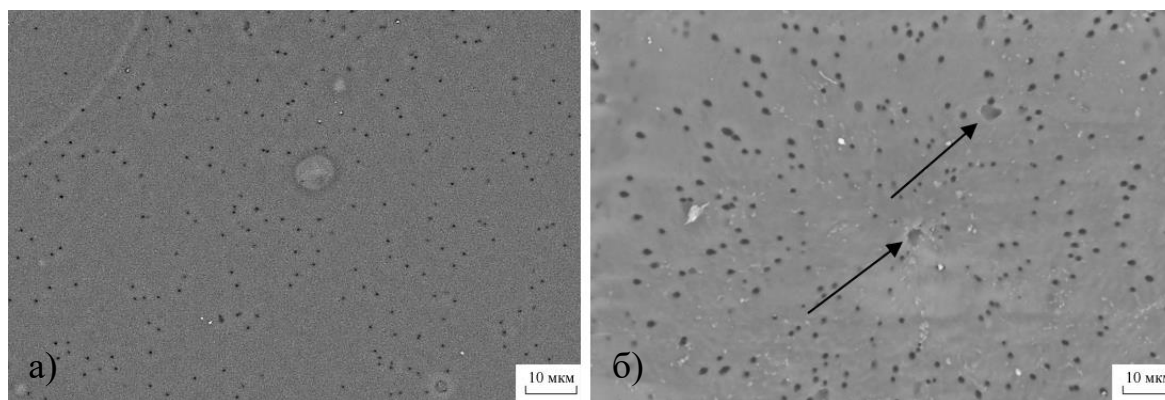


Рисунок 4.5 – РЭМ-изображения поверхности ТМ, полученных травлением облученной плёнки полилактида в растворе концентрацией 1 М в течение 20 минут при температуре (а) 38 °С; (б) 50 °С (стрелками указаны дефекты)

4.2.2. Оценка диаметра пор трековых мембран на основе плёнки полилактида, полученных на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$

Изучение изображений внешней и внутренней сторон ТМ основе плёнки полилактида полученной на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, а также определение размера сквозных пор осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии. На микрофотографиях ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, представленных на рисунке 4.6, видно, что зависимость среднего диаметра пор от времени травления (начиная с 10 минуты) в растворе NaOH при температуре 44 °С носит нелинейный характер. Большая радиальная и линейные скорости травления позволяют получать ТМ с диаметрами пор от $0,58 \pm 0,06$ мкм до $1,5 \pm 0,05$ мкм (рисунок 4.7(а), 4.8) при относительно коротком времени травления, практически не меняя основную часть неповрежденного полимера. Для внутренней стороны диаметр пор отличается незначительно и меняется в диапазоне от $0,55 \pm 0,05$ мкм и до $1,49 \pm 0,06$ мкм (рисунок 4.7, б).

Аналогичные изображения были получены и для ТМ, полученных при травлении при температуре 38 °С. Формирование пор диаметром $0,20 \pm 0,04$ мкм наблюдалось после 15 минут травления плёнки в растворе, нахождение плёнки в

течение 30 минут привело к росту диаметра пор до $0,50 \pm 0,05$ мкм. Средний диаметр пор после травления при температуре 50°C составляет: для 5 мин

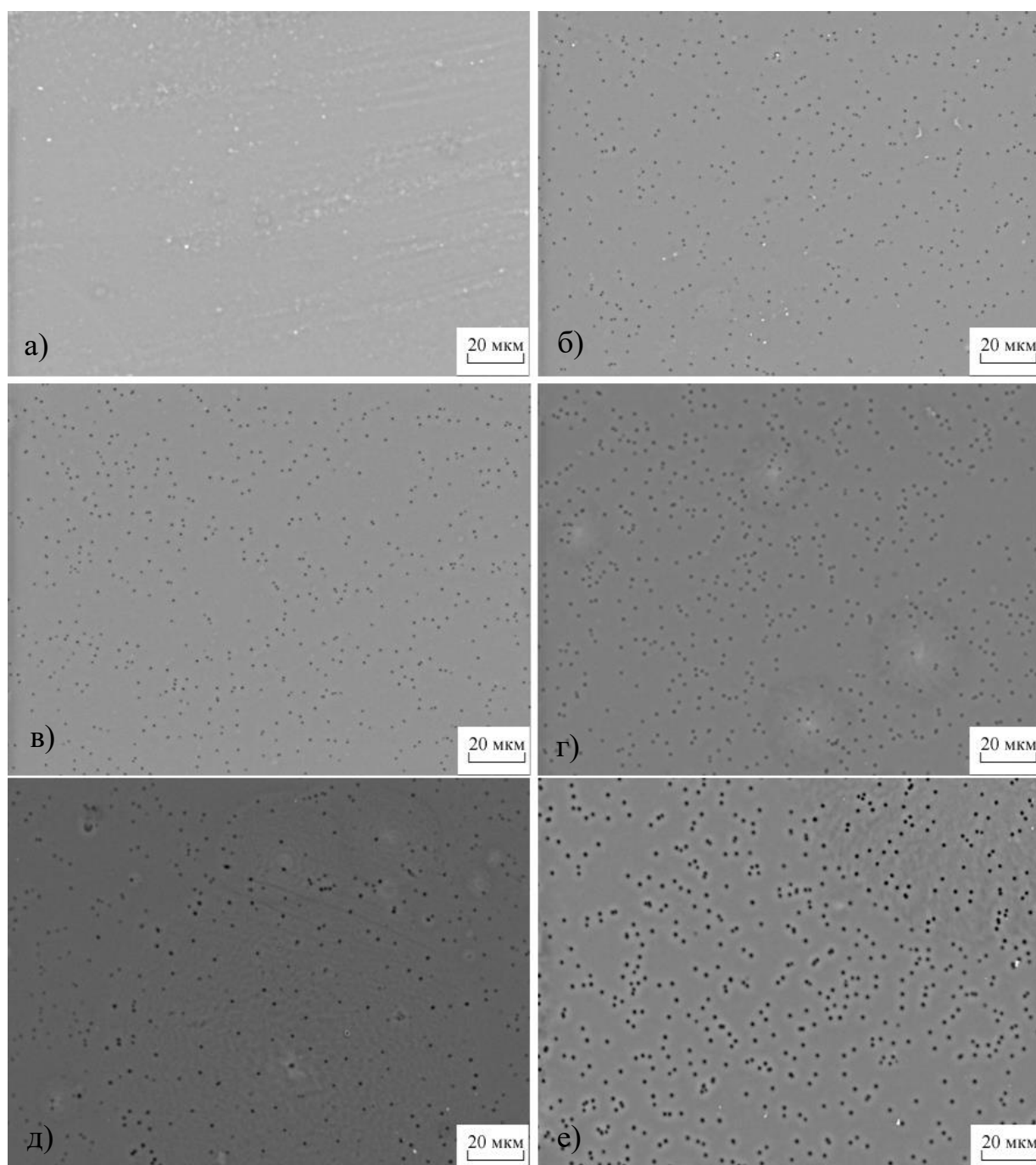


Рисунок 4.6 – РЭМ изображение внешних сторон ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: а) 5 минут (поры меньше предела обнаружения); б) 10 минут $d_{\text{пор}} = (0,58 \pm 0,06)$ мкм; в) 15 минут $d_{\text{пор}} = (0,69 \pm 0,05)$ мкм; г) 20 минут $d_{\text{пор}} = (0,79 \pm 0,05)$ мкм; д) 25 минут $d_{\text{пор}} = (1,11 \pm 0,06)$ мкм; е) 30 минут $d_{\text{пор}} = (1,5 \pm 0,05)$ мкм

$0,40 \pm 0,05$ мкм, для 10 мин $0,55 \pm 0,06$ мкм, для 15 мин $1,20 \pm 0,06$ мкм и для 20 мин $1,80 \pm 0,08$ мкм. Дальнейшее травление приводит к разрушению плёнки, что может быть обусловлено повышением скорости травления неповрежденного полимера. Кроме того, в таблице 4.1. приведена зависимость среднего диаметра пор полученного методом «точка пузырька» от времени и температуры травления плёнки полилактида облучённой ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$. Как видно, значения коррелируют с диаметрами пор, полученными из РЭМ-изображений, а также подтверждают наличие сквозных пор и целостность ТМ.

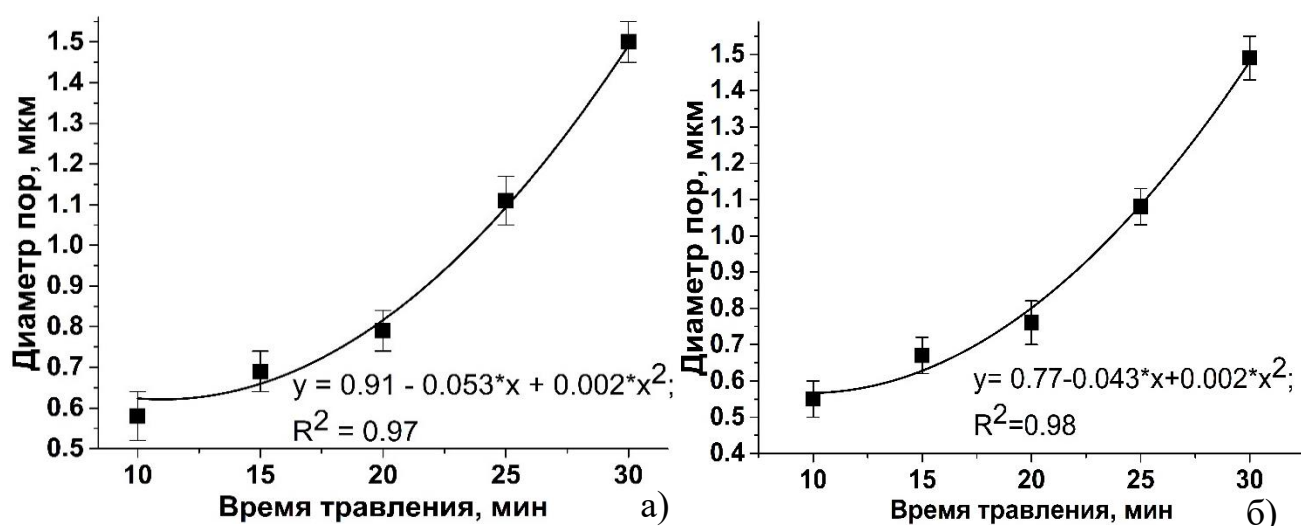


Рисунок 4.7 – Зависимость среднего диаметра пор от времени травления при температуре 44°C ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$: а) внешняя сторона, б) внутренняя сторона

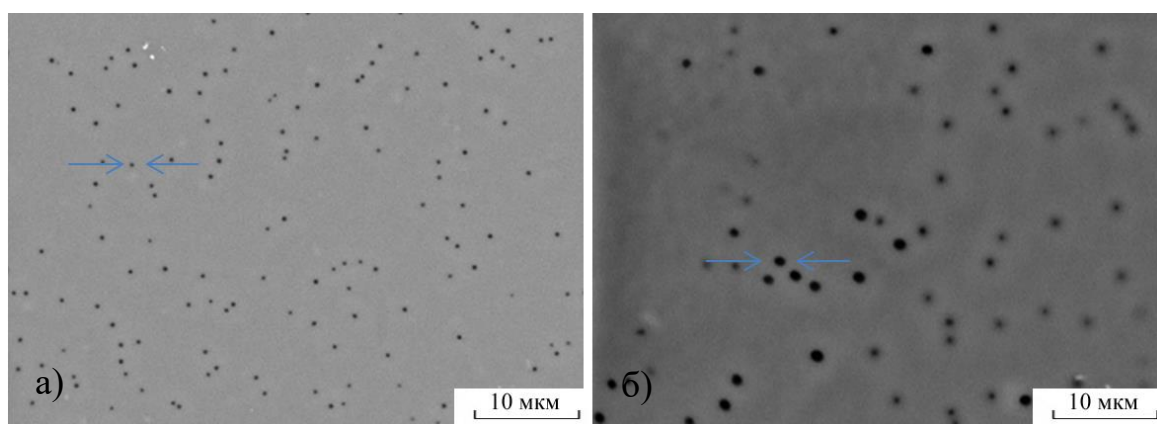


Рисунок 4.8 – РЭМ-изображения внешней стороны ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: а) 15 минут; б) 25 минут

Средняя плотность пор (число пор на единицу площади мембраны) в трековых мембранах на основе плёнки полилактида и пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ составляет $(3,2 \pm 0,4) \times 10^6$ пор/см², а пористость (доля поверхности, занятая порами) составила около 8%. (рисунок 4.6).

Таким образом, эффективным режимом получения трековых мембран с разным диаметром пор из биорезорбируемой плёнки полилактида облучённых ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$, является травление треков в 1 М растворе NaOH при температуре 44 °С, так как наблюдается наибольшая избирательность травления треков. При температуре травителя выше 44 °С отмечается ухудшение структурных характеристик ТМ. В связи с чем, дальнейшие исследования были проведены для режима 44 °С.

Таблица 4.1 – Зависимость среднего диаметра пор, полученного методом «точка пузырька», от времени и температуры травления плёнки полилактида облучённой ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$

Время травления, мин	Диаметр пор, мкм		
	38 °С	44 °С	50 °С
5	Ниже предела обнаружения	Ниже предела обнаружения	$0,48 \pm 0,06^*$
10	Ниже предела обнаружения	$0,63 \pm 0,07^*$	$1,10 \pm 0,07^*$
15	$0,26 \pm 0,05^*$	$0,65 \pm 0,06^*$	$1,80 \pm 0,05^*$
20	$0,38 \pm 0,05^*$	$1,00 \pm 0,06^*$	$1,89 \pm 0,05^*$
25	$0,46 \pm 0,06^*$	$1,56 \pm 0,08^*$	-
30	$0,57 \pm 0,05^*$	$1,75 \pm 0,05^*$	-

Примечание: * $p < 0,01$ - уровень статистической значимости между группами

4.3. Исследование структуры и свойств биорезорбируемой трековой мембраны на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$

На рисунке 4.9 представлены наиболее типичные микрофотографии поперечных сколов ТМ на основе плёнки полилактида для демонстрации

изменения размера пор. Исследование сколов мембран выявило, что поры имеют форму близкую к цилиндру, где радиус устья пор сравним с размером стенок пор.

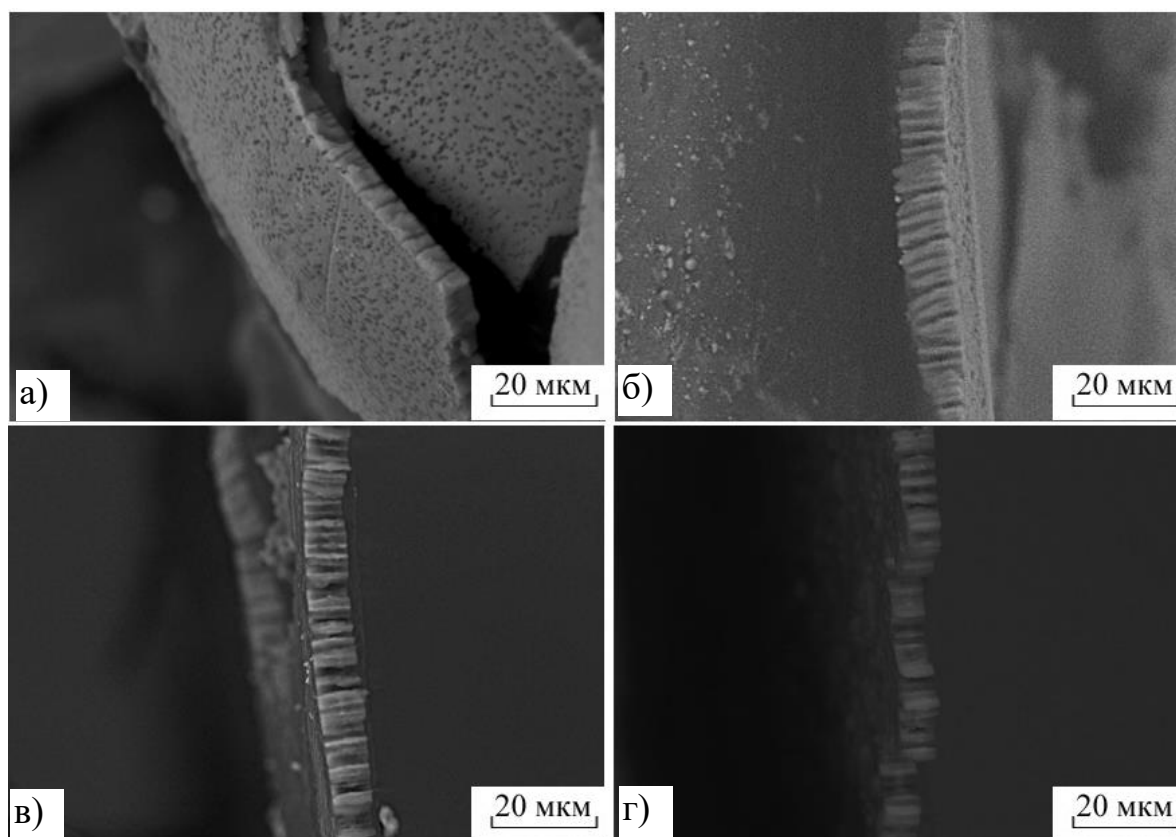


Рисунок 4.9 – РЭМ изображения скола биорезорбируемой ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44 °С в течение: а) 15 минут $d_{\text{пор}} = (0,69 \pm 0,05)$ мкм, б) 20 минут $d_{\text{пор}} = (0,79 \pm 0,05)$ мкм, в) 25 минут $d_{\text{пор}} = (1,11 \pm 0,06)$ мкм, г) 30 минут $d_{\text{пор}} = (1,5 \pm 0,05)$ мкм

Влияние облучения высокоэнергетическими ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и последующего химического травления в растворе NaOH позволило выявить следующие закономерности. Воздействие данного реагента на облученную плёнку приводит к изменению её поверхностных свойств.

На рисунке 4.11 и 4.12 приведены трехмерные изображения поверхности облучённой плёнки полилактида после нахождения её в растворе травителя при температуре 44 °С в течение: 10, 15, 20, 25 и 30 минут.

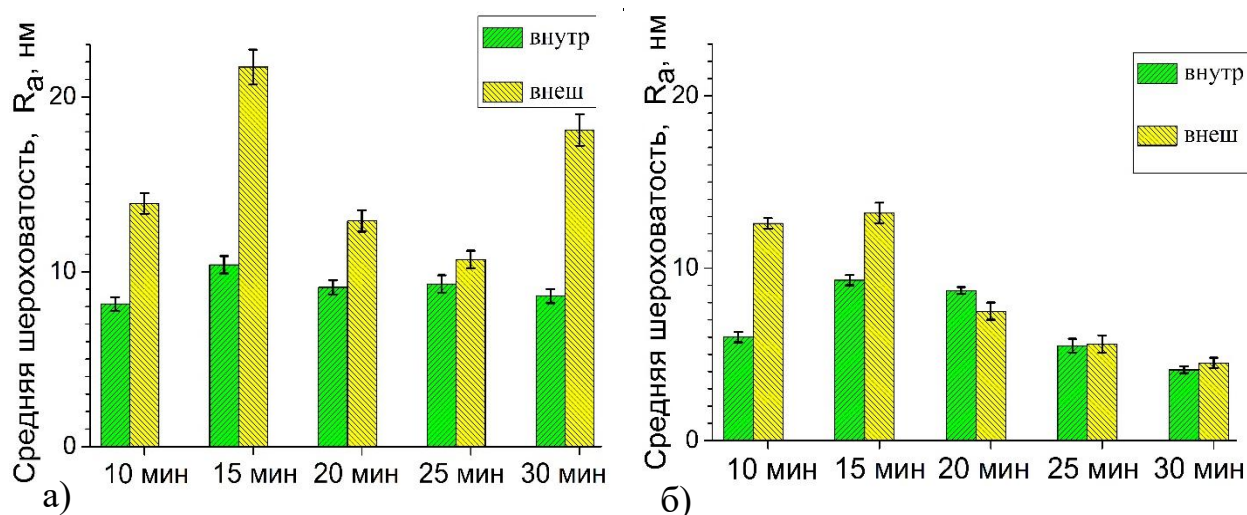


Рисунок 4.10 – Зависимость средней шероховатости поверхности (R_a) биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44 °С, от времени травления по всей поверхности ТМ с учетом пор (а) и по профилям в области неповрежденного полимера (б)

Расчёт данных по профилям поверхности с порами показал, что внешняя сторона плёнки обладает средней шероховатостью $R_a = 14,0 \pm 0,6$ нм и максимальным значением параметра шероховатости $R_z = 155,0$ нм для 10 минут травления, $R_a = 29,0 \pm 1,0$ нм и $R_z = 346,0$ нм для 15 минут травления, $R_a = 13,0 \pm 0,6$ нм и $R_z = 216,0$ нм для 20 минут травления, $R_a = 11,0 \pm 0,5$ нм и $R_z = 183,0$ нм для 25 минут травления, $R_a = 18,0 \pm 1,0$ нм и $R_z = 231,0$ нм для 30 минут травления (рисунок 4.10 а). Внутренняя сторона плёнок обладает более однородной, гладкой поверхностью, средние значения шероховатости (R_a) варьируются $8,0 \pm 3,5$ нм и практически не зависят от времени травления. В связи с этим, расчёт параметров шероховатости был проведен по профилям поверхности на участках неизменённой плёнки (таблица 4.3).

Согласно полученным данным, в трековых мембранах на участках с неизменённой плёнкой после облучения и влияния обработки раствора гидроксида натрия NaOH в течение 15 минут наблюдается рост параметра шероховатости $R_a = 18,2 \pm 0,6$ нм (таблица 4.2), что может быть следствием изменением морфологии приповерхностного слоя плёнки, в результате щелочного гидролиза и диффузии продуктов деструкции к поверхности [75].

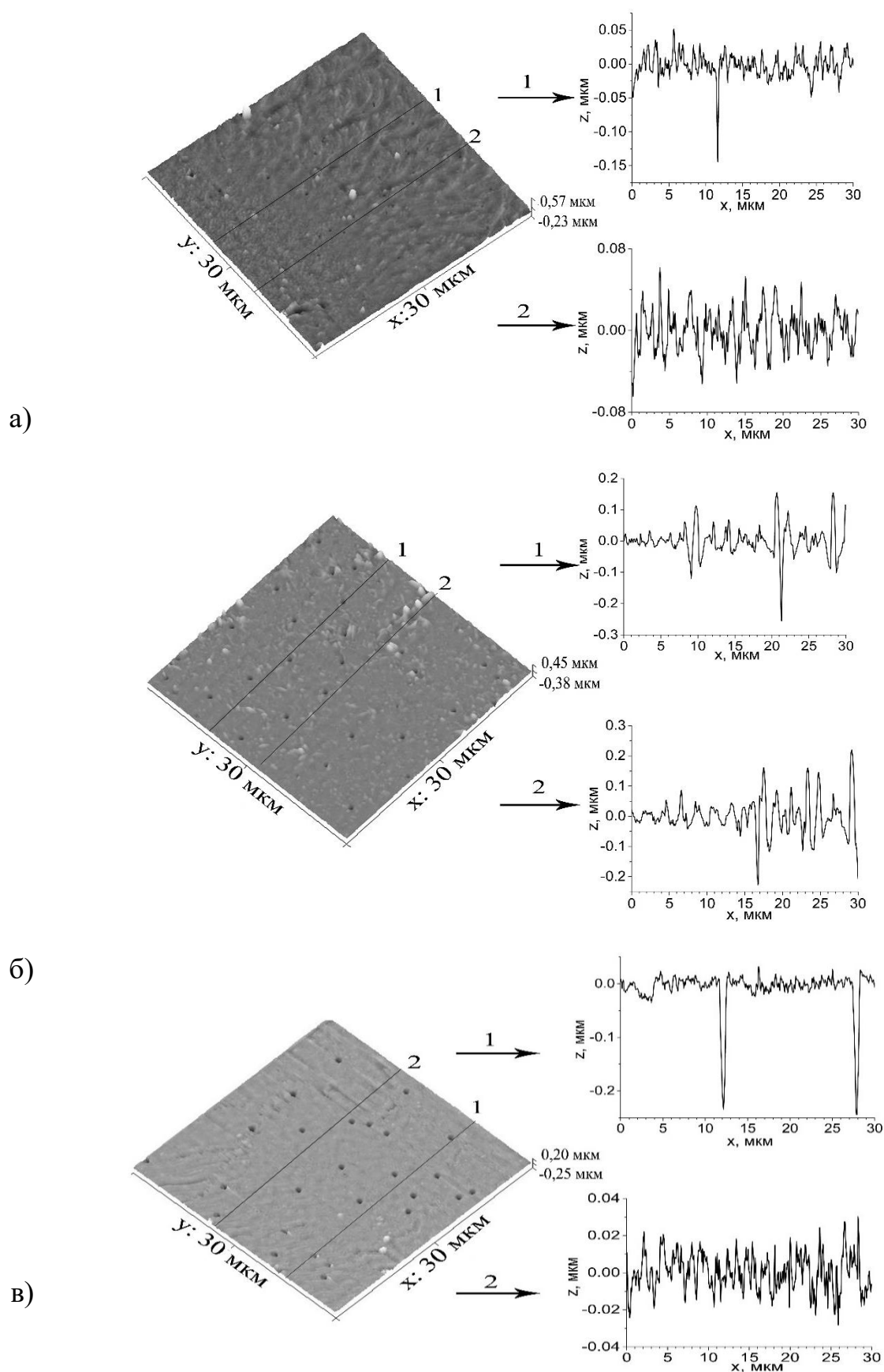


Рисунок 4.11 – Трехмерные изображения и профили внешней стороны поверхности биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: (а) 10 минут (б) 15 минут (в) 20 минут

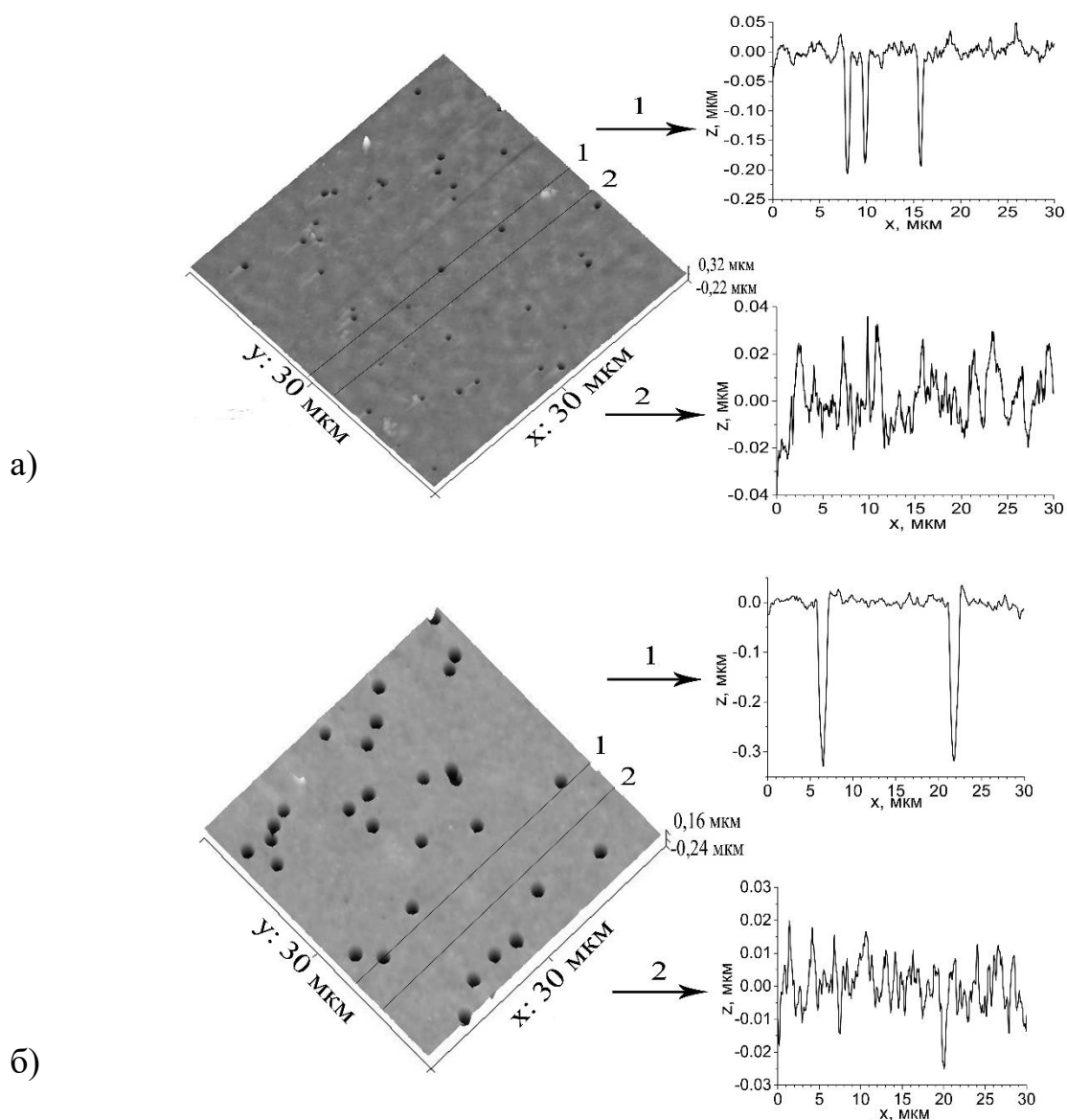


Рисунок 4.12 – Трехмерное изображение и профили внешней стороны поверхности биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44 °С в течение (а) 25 минут и (б) 30 минут, (стрелка 1 - профиль с порами, стрелка 2- профиль без пор)

Дальнейшее воздействие травящего раствора на облученную плёнку приводит уменьшению шероховатости поверхности, так для 20 минут травления средняя шероховатость составила ($R_a = 8,7 \pm 0,2$ нм, для 25 мин травления - $R_a = 5,6 \pm 0,5$ нм и для 30 минут травления $R_a = 4,5 \pm 0,3$ нм (рисунок 4.10 б) и связано химическими реакциями, протекающими с разрывами сложноэфирных связей, отщеплением молекул и десорбцией продуктов разложения с поверхности

Таблица 4.2 – Средние параметры шероховатости поверхности ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44 °С от времени травления для площади сканирования 30 × 30 мкм

№	Время травления, мин		Средняя шероховатость, (R _a): нм		Средне квадратичная шероховатость, (R _q): нм	Максимальная высота шероховатости, (R _t): нм
1	10	внутр	6,0 ± 0,3	*p < 0,001	8,0	60
		внеш	12,6 ± 0,3		16,3	108
2	15	внутр	9,3 ± 0,3	*p < 0,001	11,5	66
		внеш	18,2 ± 0,6		25	183
3	20	внутр	7,5 ± 0,5	*p < 0,001	9,9	67
		внеш	8,7 ± 0,2		11,1	75
4	25	внутр	5,5 ± 0,4	*p < 0,001	7,0	43
		внеш	5,6 ± 0,5		7,3	54,2
5	30	внутр	4,1 ± 0,2	*p < 0,001	5,4	39
		внеш	4,5 ± 0,3		6,0	44

Примечание: *p<0,01 - уровень статистической значимости различий внутренней и внешней сторон

полимера. Можно предположить, что одновременно в процессе длительного травления на поверхности образуется слой полимера с более низкой молекулярной массой, и возможно изменение некоторых структурных характеристик ТМ [139], что требует дальнейших исследований.

На рисунке 4.13 (а) приведены значения краевых углов смачивания трековых мембран по пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с диаметрами пор от 0,58 мкм до 1,5 мкм. Углы для образцов практически не отличаются и составляют $73^\circ \pm 3^\circ$, что свидетельствует о том, что поверхность ТМ носит приближенный к гидрофобности характер. При этом вероятно присутствие функциональных полярных групп с

высоким сродством к воде (например, C – O, OH) на поверхности полимера. Из данных, представленных на гистограмме 4.13 (б) видно, что поверхностная энергия (γ) ТМ увеличивается от $31,1 \pm 0,6$ мДж/м² до $33,8 \pm 0,6$ мДж/м², за счёт роста полярной составляющей, при этом наблюдается преобладание вклада

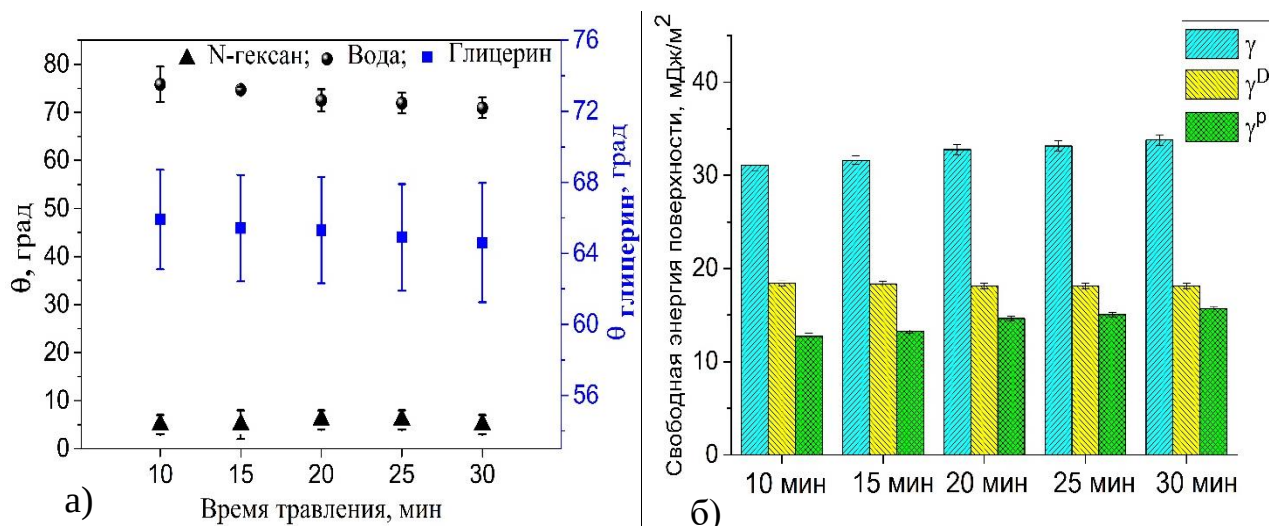


Рисунок 4.13 – Изменение контактного угла ($\theta_{\text{в}}$ – вода, $\theta_{\text{г}}$ – глицерин, $\theta_{\text{н}}$ – н-гексан) (а) и СЭП (б) внешней стороны биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C во временном диапазоне от 10 до 30 минут

дисперсионной составляющей. Как показали измерения, капли воды имели симметричную форму и не растекались через 1,5 мин после их нанесения на поверхность, что свидетельствует об однородности поверхности ТМ. Полярность поверхности ТМ полученных травлением в растворе NaOH в течение: 10, 15, 20, 25 и 30 минут при температуре 44 °C составляет 0.41, 0.42, 0.44, 0.45, 0.46 соответственно.

На рисунке 4.14 (1 – 5) представлены нормализованные ИК-спектры образцов, протравленных в течение 10, 15, 20, 25 и 30 минут. Анализ которых показал наличие всех полос поглощения, характерных для полилактида, наблюдаемых в исходных спектрах для монолитных плёнок (рисунок 3.4). При травлении в течение 10 минут наблюдалось уширение характерных полос 2996 см⁻¹ и 2944 см⁻¹, обусловленных симметричными и асимметричными колебаниями $\nu(\text{CH}_3)$, а также уменьшалась интенсивность полосы при 1269 см⁻¹, относящейся к колебаниям

$\delta(\text{CH}) + \nu(\text{C} - \text{O} - \text{C})$. На спектрах увеличивается интенсивность полос поглощения при 870 см^{-1} , 760 см^{-1} , 690 см^{-1} характерных для $\nu(\text{C} - \text{COO})$, $\delta(\text{C} = \text{O})$ и $\gamma(\text{C} = \text{O})$ колебаний, что может быть обусловлено расщеплением сложного эфира и образованием групп $-\text{OH}$ и $-\text{COOH}$ на поверхности полимеров. При увеличении времени травления присутствует небольшое смещение полосы поглощения, относящейся к валентным колебаниям карбонильной группы $\text{C} = \text{O}$ в область 1747 см^{-1} .

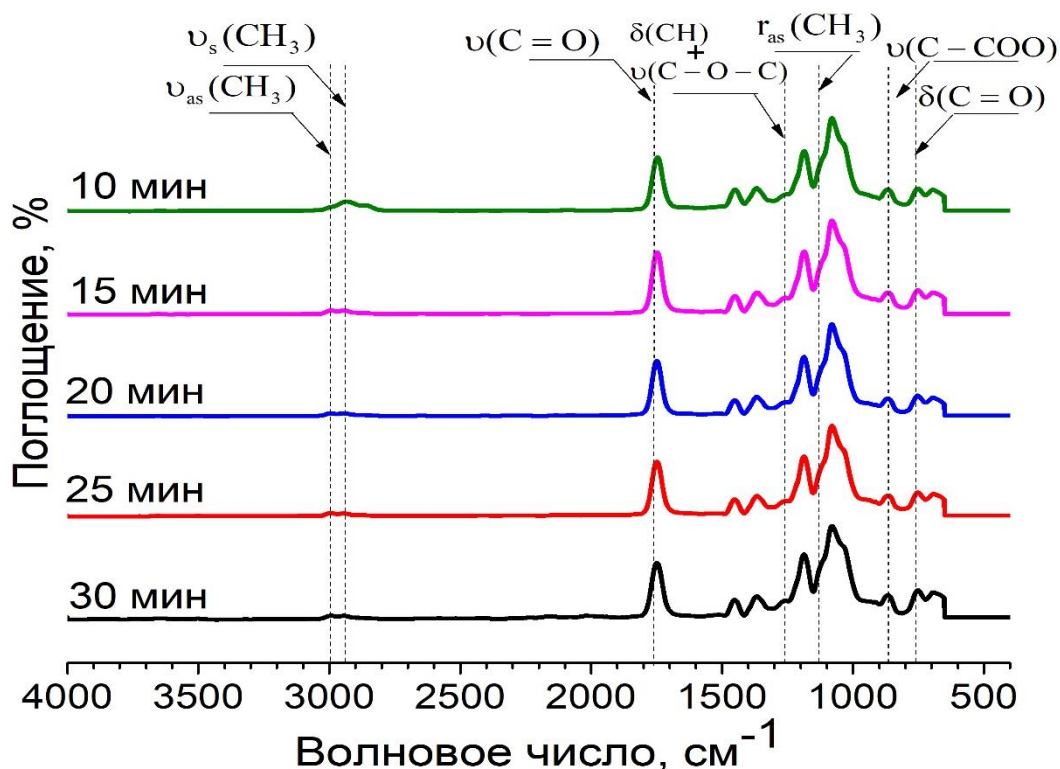


Рисунок 4.14 – ИК – спектры поглощения биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: (1) 10 минут; (2) 15 минут; (3) 20 минут; (4) 25 минут; (5) 30 минут

Полученные результаты, показывают, что изменения могут быть связаны с амортизацией полимера в результате деструкции макромолекул на его поверхности, вызванной щелочным травлением, при этом существенного воздействия на их объемные характеристики не наблюдается [73, 140].

Кроме того, было рассмотрено влияние степени пористости (диаметр пор и их поверхностной плотности) на характер спектров КР. На рисунке 4.15 представлены

нормализованные на максимум интенсивности полосы 873 см^{-1} спектры КР трековых мембран на основе плёнки полилактида и на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$. Следует отметить, что на спектрах КР ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ присутствует весь набор линий при 305 см^{-1} , 403 см^{-1} , 736 см^{-1} , 873 см^{-1} , 1042 см^{-1} , 1092 см^{-1} , 1124 см^{-1} , 1179 см^{-1} , 1293 см^{-1} , 1381 см^{-1} , 1452 см^{-1} , 1763 см^{-1} , присущий исходной монолитной плёнке полилактида (рисунок 3.5). С увеличением времени травления облучённых плёнок наблюдается слабое смещение и уменьшение интенсивности линии валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ при 1763 см^{-1} ,

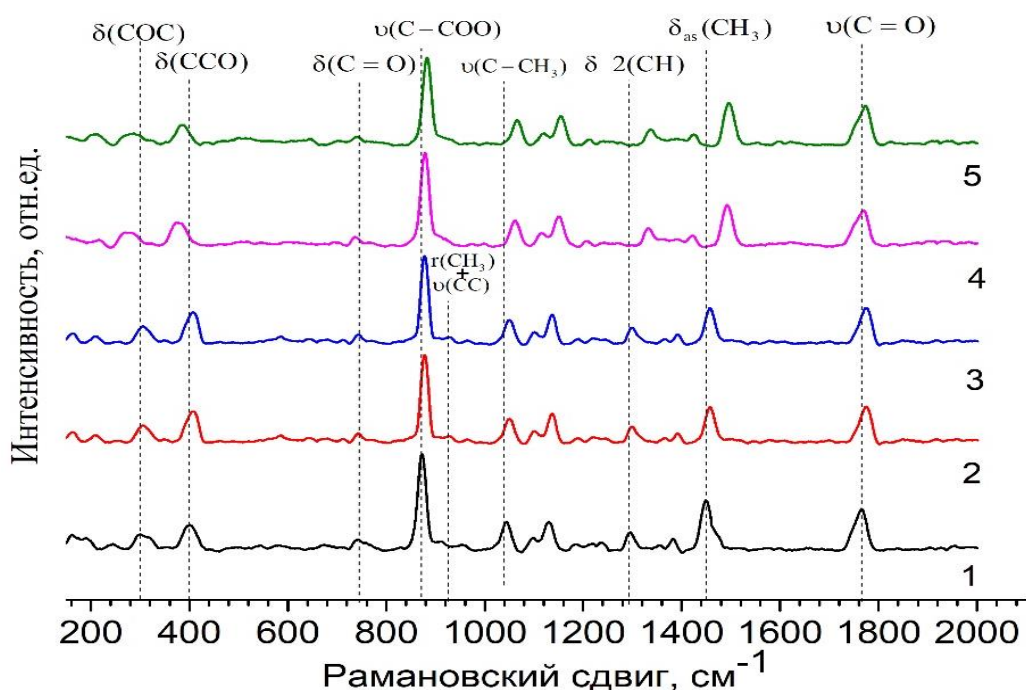


Рисунок 4.15 – Нормированные на максимум интенсивности спектры комбинационного рассеяния биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: (1) 10 минут (2) 15 минут (3) 20 минут (4) 25 минут (5) 30 минут

соответствующей активной моде В до моды E_2 при 1773 см^{-1} [127]. В спектрах ТМ с диаметром пор $1,11\text{ мкм}$ (травление 25 минут) и $1,5\text{ мкм}$ (травление в течение 30 минут) присутствует смещение линии валентного колебания $\nu(\text{C}-\text{COO})$ от 873 см^{-1} до 881 см^{-1} . Кроме того, на спектрах отсутствует линия, соответствующая колебаниям $\gamma(\text{CH}_3)+\nu(\text{CC})$ при 923 см^{-1} , и наблюдается уширение и сдвиг линий при 238 см^{-1} , 382 см^{-1} , соответствующих крутильным τCC и деформационным

колебаниям δSCO , что может свидетельствовать об изменении степени кристалличности фаз полимера [141].

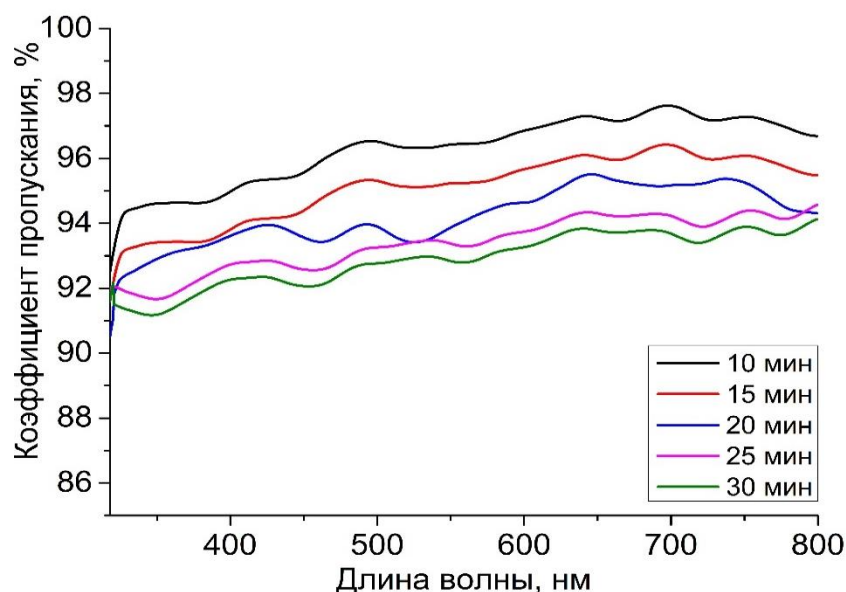


Рисунок 4.16 – Спектры пропускания биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44 °С в течение: а) 10 минут; б) 15 минут; в) 20 минут; г) 25 минут; г) 30 минут

Светопропускание трековых мембран на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ высокое, более 92,0%. Соответствующие спектры светопропускания приведены на рисунке 4.16. Видно, что максимальное светопропускание около 97% при длине 560 – 600 нм достигнуто для ТМ с диаметром пор 0,58 мкм и 0,69 мкм, полученных травлением

Таблица 4.3 – Прозрачность (длина волны $\lambda = 600$ нм) биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ полученных травлением при температуре 44 °С

Время травления, мин	Прозрачность
10	$2,19 \pm 0,03^*$
15	$2,20 \pm 0,03^*$
20	$2,20 \pm 0,04^*$
25	$2,20 \pm 0,04^*$
30	$2,21 \pm 0,03^*$

Примечание: *достоверность различий между группами трековых мембран $p < 0,01$

в течение 10 минут и 15 минут, соответственно. Коэффициент пропускания ТМ со временем увеличения травления облученной плёнки снижается приблизительно на 0,7%. Прозрачность трековых мембран на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ составляет $2,19 \pm 0,03$ (таблица 4.3). Трековые мембраны практически бесцветны, увеличение диаметра пор и их поверхностной плотности и не приводит к заметному невооруженным глазу помутнению.

Все изменения кристалличности в плёнках после облучения и травления можно проследить с помощью анализа ДСК. На рисунке 4.17 представлены ДСК термограммы плавления ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ с порами различного диаметра. По сравнению с исходными монолитными плёнками полилактида (рисунок 3.6), в трековых мембранах на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ имеется сдвиг температуры плавления на 4°C , что свидетельствует об увеличении содержания кристаллической фазы [142]. Увеличение диаметра пор в ТМ на температуру плавления практически не влияло.

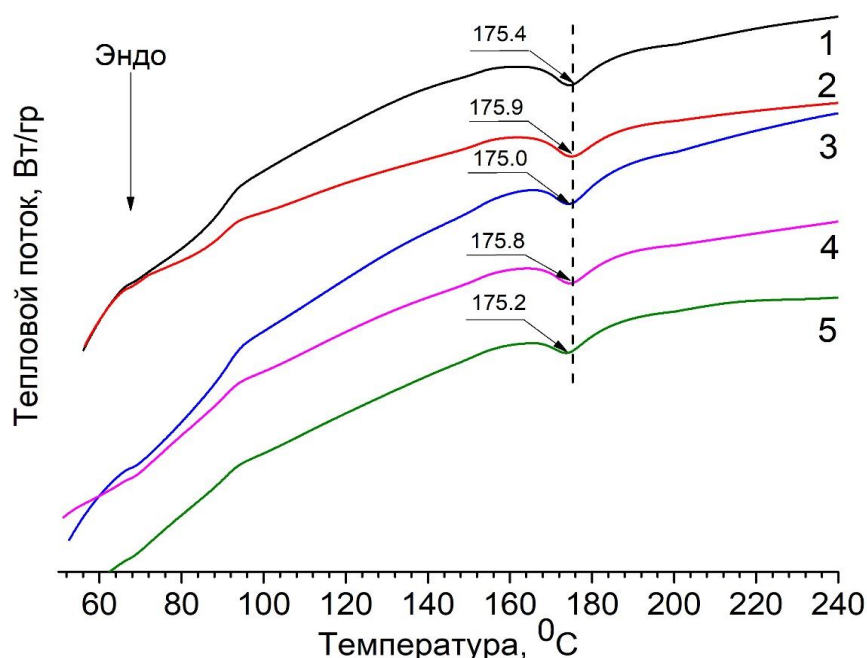


Рисунок 4.17 – Термограммы биорезорбируемой ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: (1) 10 минут; (2) 15 минут; (3) 20 минут; (4) 25 минут; (5) 30 минут

Однако в ТМ с увеличением диаметра и плотности пор наблюдалось изменение энтальпии плавления материалов. До появления пор диаметром 0,58 мкм (травление в течение 10 минут) происходило увеличение энтальпии плавления материала до $\Delta H_m = 47,5$ Дж/г, а кристалличность структуры плёнок увеличилась до 51%. С ростом диаметра пор кристалличность полимера снижается (рисунок 4.18), за счёт формирования локальных областей набухания полимера и растравливания стенок пор – по классическому механизму щелочного гидролиза [143]. Так для ТМ с диаметром пор 0,69 мкм (травление в течение 15 минут) и 0,79 мкм (травление в течение 20 минут) степень кристалличности составляла 49% и 46%, соответственно. Наибольшее падение степени кристалличности (близкой к исходным плёнкам) до 39 – 40% наблюдалось для ТМ с диаметром пор 1,1 мкм (травление в течение 25 минут) и 1,5 мкм (травление в течение 30 минут), что может быть связано с разрывами цепи ПМК во время окисления [142].

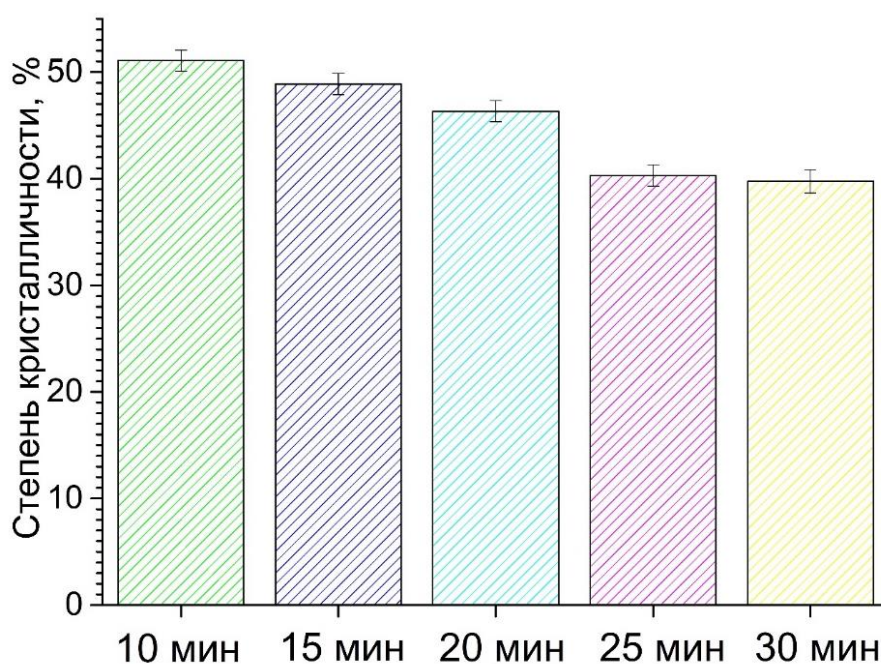


Рисунок 4.18 – Зависимость степени кристалличности биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ полученных травлением при температуре 44°C от времени травления

4.4. Трековые мембраны, полученные облучением плёнки полилактида ионами $^4\text{He}^{2+}$

В работе, также, рассмотрен второй способ получения трековых мембран, основанный на облучении полимерной плёнки полилактида ионами $^4\text{He}^{2+}$ (ТМ

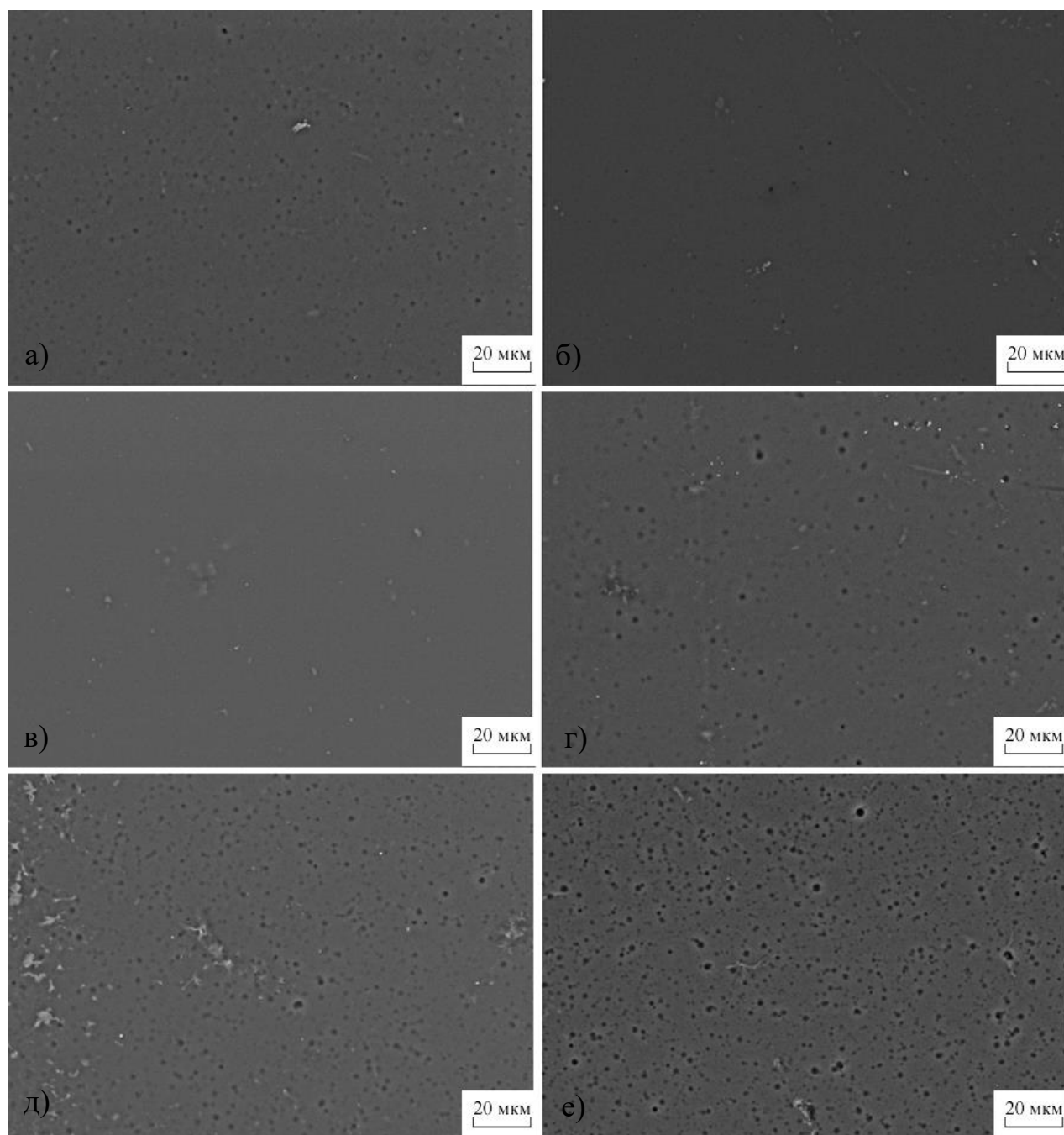


Рисунок 4.19 – РЭМ изображения биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре 44 °С в течение: а) 5 минут - внешняя сторона; б) 5 минут - внутренняя сторона, внешняя сторона: в) 10 минут; г) 15 минут; д) 20 минут; е) 25 минут

$^4\text{He}^{2+}$). При этом были выбраны те же режимы травления облученной плёнки. На рисунке 4.19 (а, б) наблюдается начало травления треков, полученных в результате прохождения ионов $^4\text{He}^{2+}$ сквозь плёнку полилактида, после 5 минут нахождения их в «избирательном» травителе температурой 44 °С. При увеличении времени травления (рисунок 4.19 в-е) видно, что поры увеличиваются в диаметре. Также наблюдается увеличение плотности пор в видимом диапазоне.

При помощи программы Image J 1.52 и РЭМ-изображений рассчитан средний диаметр пор для 3 режимов травления. По данным представленным в таблице 4.4, видно, что увеличение времени травления приводит к росту плотности пор, которая для 38 °С меняется в диапазоне от $(0,03 \pm 0,01) \times 10^6$ пор/см² до $(0,11 \pm 0,01) \times 10^6$ пор/см² для 15 минут и 25 минут травления, соответственно. Для режима травления при 44 °С, плотность пор возрастает до $(0,20 \pm 0,01) \times 10^6$ пор/см² (таблица 4.4). Такая неоднородность пор по размерам вызвана незначительной избирательностью травления треков и может быть обусловлена низкой эффективностью травителя.

Таблица 4.4 – Средний диаметр и плотность пор после травления плёнки полилактида облучённой ионами $^4\text{He}^{2+}$

Время травления, мин	Диаметр пор, мкм, 38°С	Диаметр пор, мкм, 44°С	Плотность пор, 10 ⁶ пор/см ² , 38°С	Плотность пор, 10 ⁶ пор/см ² , 44°С
5	Ниже предела обнаружения	$0,46 \pm 0,10$	Ниже предела обнаружения	$0,022 \pm 0,010$
10	Ниже предела обнаружения	$0,47 \pm 0,07^*$	Ниже предела обнаружения	$0,050 \pm 0,020$
15	$0,56 \pm 0,07^*$	$0,50 \pm 0,07^*$	$0,030 \pm 0,010$	$0,062 \pm 0,030$
20	$0,59 \pm 0,06^*$	$0,65 \pm 0,09^*$	$0,060 \pm 0,020$	$0,160 \pm 0,060$
25	$0,66 \pm 0,07^*$	$0,75 \pm 0,10^*$	$0,110 \pm 0,030$	$0,200 \pm 0,050$

Примечание: * $p < 0,01$ - уровень статистической значимости между группами

Также в биорезорбируемой плёнке полилактида, облучённой ионами $^4\text{He}^{2+}$, процесс растравливания латентных треков в видимом диапазоне начинался при

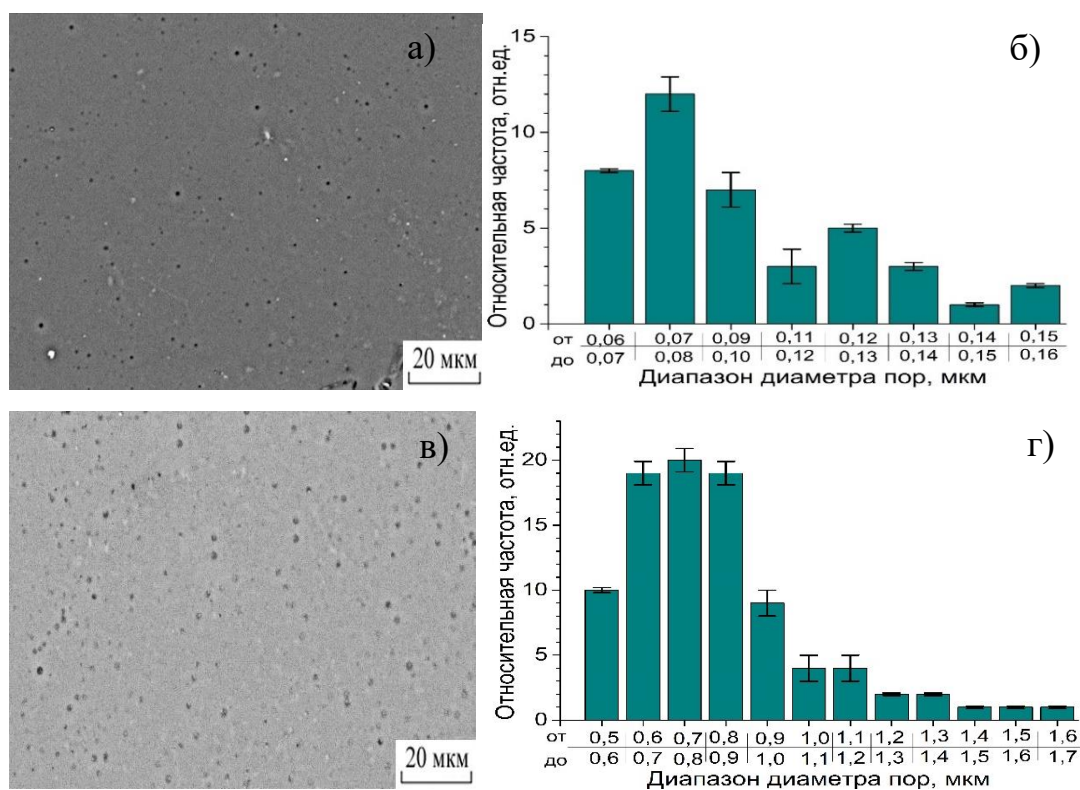


Рисунок 4.20 – Плотность пор и распределение пор по размерам на поверхности биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре 50 °С в течение: а, б) 3 минут – $(0,032 \pm 0,010) \times 10^6$ пор/см²; в, г) 10 минут – $(0,07 \pm 0,03) \times 10^6$ пор/см²

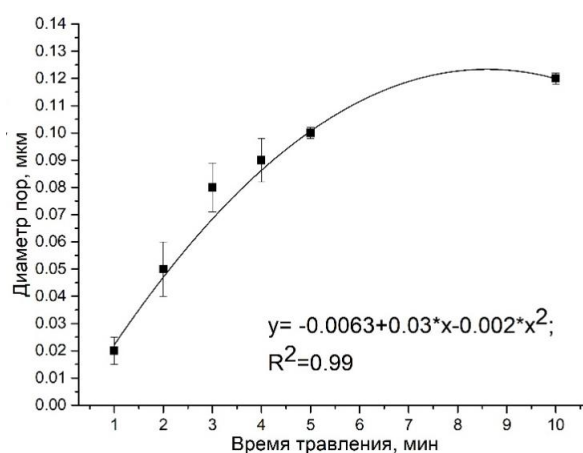


Рисунок 4.22 – Зависимость среднего диаметра пор в плёнке полилактида облучённой пучками ионов $^4\text{He}^{2+}$ от времени травления при температуре 50 °С

температуре 44 °С на 5 минуте нахождения плёнки в травителе, а через 25 минут наблюдалось уширение пор до диаметра $0,75 \pm 0,02$ мкм. При температуре травления 38 °С диаметр пор в видимом диапазоне составляет от 0,56 до 0,66 мкм.

Увеличение температуры травления до 50 °С привело к нелинейному увеличению (полином второго порядка) скорости травления. Поры диаметром $0,020 \pm 0,005$ мкм (рисунок 4.22) проявляются на 1 минуте нахождения в растворе. Начальная плотность растравленных пор составляет $(0,010 \pm 0,003) \times 10^6$ пор/см². С дальнейшим ростом времени травления увеличивается плотность пор и для 10 минут она составляет $(0,07 \pm 0,01) \times 10^6$ пор/см² (рисунок 4.20). Однако нахождение плёнок в травителе более 10 минут приводит к их охрупчиванию, закупориванию пор и разрушению образца.

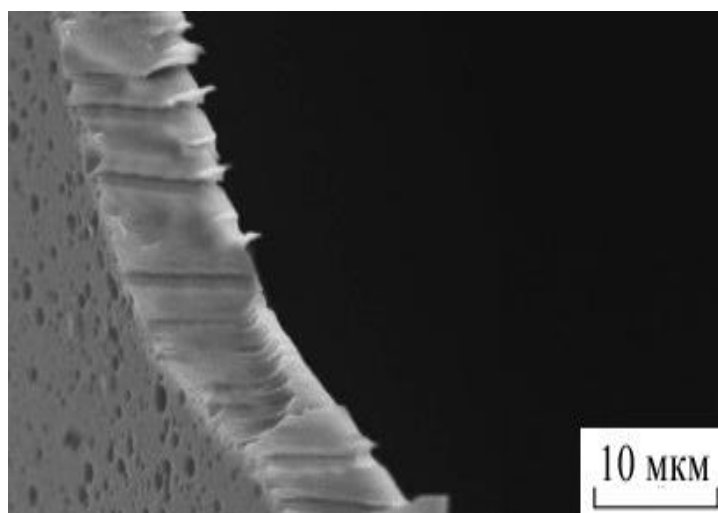


Рисунок 4.23 – РЭМ изображения скола ТМ на основе плёнки полилактида на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученного травлением при температуре 44 °С в течение 15 минут

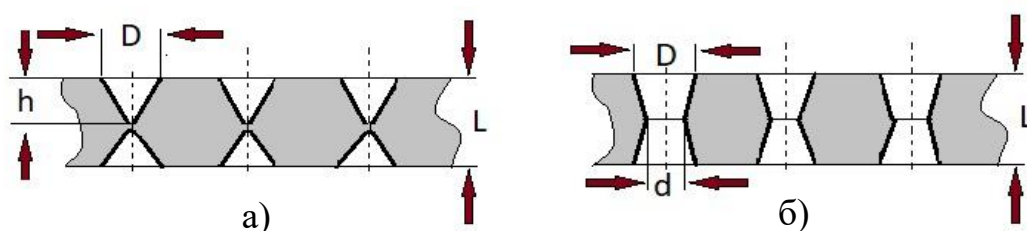


Рисунок 4.24 – Схематическое изображение, а) «глухих» конических пор (поры, не протравленные насквозь), б) «песочные часы», сквозные симметричные поры [144]

При этом, следует отметить, что эксперимент на проницаемость и целостность методом “точка пузырька” провести удалось лишь для режима травления 44 °С. Полученные РЭМ изображения сколов, также показали наличие сквозных пор для режима 44 °С (рисунок 4.23, 4.24 б), а в образцах, полученных при травлении в растворе NaOH температурой 38 °С наблюдалась форма глухих конических пор рисунок 4.24 а. Это может быть связано с механизмом травления пор и нехваткой времени травления. Так как для образования пор, напоминающих форму песочных часов, при двухстороннем травлении, должно выполняться следующее условие: время травления должно превышать $L_0/2v_t$ (рисунок 4.24 а, б), тогда треки протравливаются насквозь по толщине плёнки L_0 [144].

В связи с вышеприведенными результатами, для дальнейшего исследования были отобраны ТМ на пучках ионов $^4\text{He}^{2+}$ полученные при травлении в растворе температурой 44 °С, а для получения сквозных пор на биорезорбируемой плёнке, облучённой $^4\text{He}^{2+}$ в широком температурном режиме, необходимо провести дальнейший поиск условий травления: изменить состав травителя, уменьшить время травления, увеличить время нахождения в растворе и определить условия процесса травления.

4.5. Исследование структуры и свойств биорезорбируемой трековой мембраны на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$

Приведённые на рисунке 4.24 трехмерные изображения АСМ и профили поверхности трековых мембран на основе плёнки полилактида облученной ионами $^4\text{He}^{2+}$ с последующим травлением в 1 М растворе NaOH при температуре 44 °С при увеличении длительности травления от 10 мин до 25 мин, характеризуются линейным увеличением шероховатости по R_a . Для того, чтобы избежать влияния пор при определении поверхностной шероховатости, для исследований были обработаны профили, не содержащие пор. Видно, что для образцов, находившихся в растворе травителя в течение 10 мин наблюдаются единичные поры и слабо выраженная шероховатость $R_a = 2,1 \pm 1,0$ нм, $R_q = 1,15$ нм и $R_z = 10,0$ нм как для

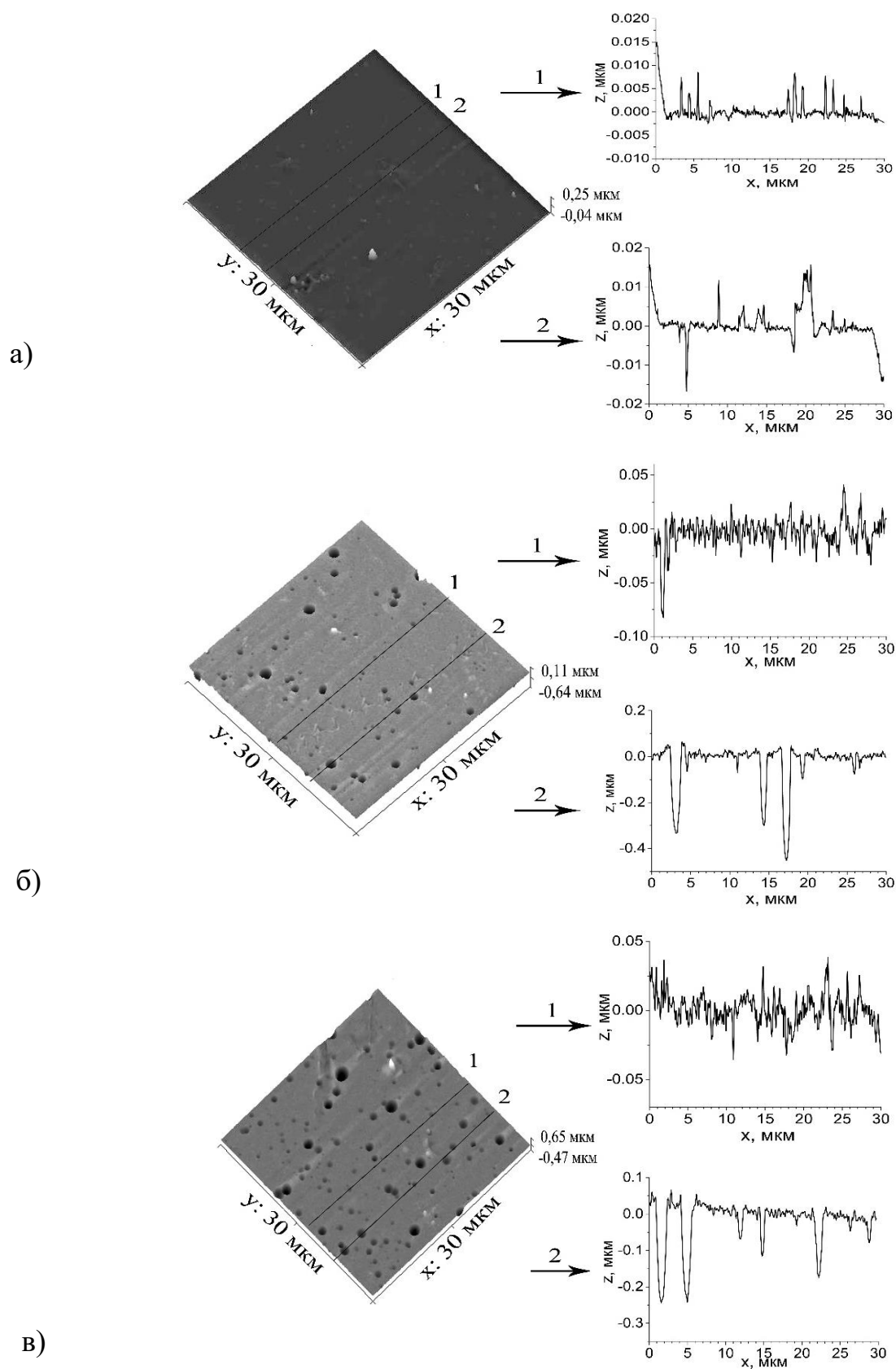


Рисунок 4.24 – Трехмерные изображения и профили (1 – без пор, 2 – с порами) внешней стороны поверхности биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: (а) 10 минут (б) 15 минут (в) 20 минут

внутренней, так и внешней стороны. Так на 15 мин травления плёнка имеет более развитую поверхность, видно возрастание величины $R_a = 7,4 \pm 1,0$ нм, $R_q = 6,8$ нм $R_z = 35,0$ нм на поверхности без пор внешней стороны. Для внутренней стороны параметры – $R_a = 5,3 \pm 1,3$ нм, $R_q = 4,7$ нм $R_z = 20,0$ нм. Также при увеличении времени травления происходит увеличение количества пор в единицу площади в

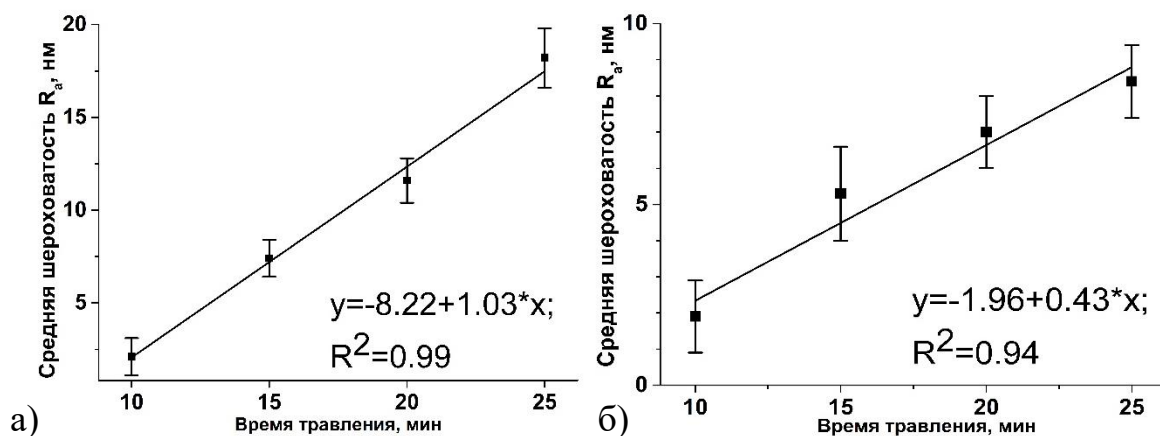


Рисунок 4.25 – Зависимость средней шероховатости внешней (а) и внутренней (б) поверхности (R_a) биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре 44 °С, от времени травления по всей поверхности ТМ по профилям в области полимера без наличия видимых пор

пределе видимости, а также наблюдается неравномерный рост диаметра пор (рисунок 4.24), что коррелирует с РЭМ-изображениями. Наибольшая шероховатость ($R_a = 18,2 \pm 1,6$ нм), плотность и наложение пор наблюдается на 25 мин травления. Предположительно, данный факт может быть связан с стохастической природой излучения, так как при облучении ионы входят в плёнку под одним углом, то образующиеся треки случайным образом распределены друг относительно друга. В следствии чего, расстояние между отдельными треками может быть настолько малым, что после травления несколько пор могут перекрыться. Вследствие этого образуется сквозной канал большего размера, чем размер отдельной поры. А чем выше флюенс, тем выше вероятность наложения треков. При этом слабая избирательность раствора травителя приводит к неравномерному травлению треков [145].

Сравнение контактных свойств исходной необлученной плёнки и ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$, показывает, что существенных отличий в величине краевого угла смачивания не наблюдается. Для случая воды ТМ характеризуется величиной θ равной $72^\circ - 73^\circ$ (рисунок 4.26 а) а поверхность материала носит умеренно гидрофобный характер. Вместе с тем, с увеличением времени травления наблюдался рост свободной энергии поверхности (СЭП) с $32,4 \pm 0,4$ мДж/м² до $33,2 \pm 0,6$ мДж/м² (рисунок 4.26 б) в большей мере за счёт закономерного слабого увеличения полярной составляющей, что может быть связано с наличием на поверхности полярных химических связей, содержащих OH^- -группы. При этом, увеличение общей свободной поверхностной энергии, позволяет прогнозировать увеличение адгезионной способности клеток при контакте с ТМ [146]. Следует отметить, что шероховатость также не оказала заметного влияния на краевые углы смачивания ТМ, что может свидетельствовать о том, что обработка не оказала существенного влияния на химическую структуру полимерной матрицы ТМ [147]. Что подтверждается результатами ИК–спектроскопии.

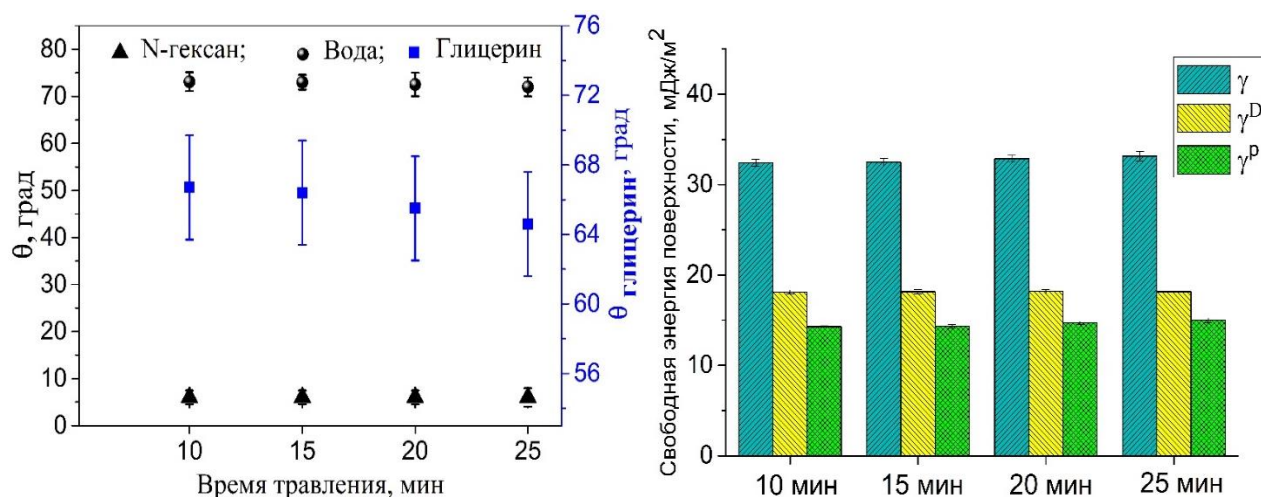


Рисунок 4.26 – Изменение контактного угла (θ_w – вода, θ_g – глицерин, θ_N – н-гексан) (а) и СЭП (б) внешней стороны биорезорбируемых ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре 44°C во временном диапазоне от 10 до 25 минут

В ИК-спектрах ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ присутствовал весь набор полос поглощения характерный для необлученной плёнки полилактида [111, 128].

(рисунок 3.4 и 4.27). При этом после обработки в течение 10, 15 минут наблюдается сглаживание полос поглощения в области 1132 см^{-1} , 1110 см^{-1} относящихся к колебаниям сложных алифатических полиэфиров $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{s}}(\text{C} - \text{O} - \text{C})$. Дальнейшее увеличение времени травления приводит к слабому снижению интенсивности и уширению характерных полос 2996 см^{-1} и 2944 см^{-1} , обусловленных симметричными и асимметричными колебаниями $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ и $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$. Наибольшие изменения, наблюдались в ИК-спектре облученной плёнки, травленной в течение 25 минут. Видно, что травление привело к снижению интенсивности пиков в области 1367 см^{-1} $\delta(\text{CH}) + \delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ и 1450 см^{-1} $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ и небольшому сглаживанию пика валентных колебаний $\nu(\text{C} - \text{COO})$ в области 879 см^{-1} . При этом в спектре присутствует небольшое смещение полосы поглощения относящуюся к валентным колебаниям карбонильной группы $\nu(\text{C} = \text{O})$, в область 1743 см^{-1} , что может быть связано с изменением степени кристалличности образцов [148].

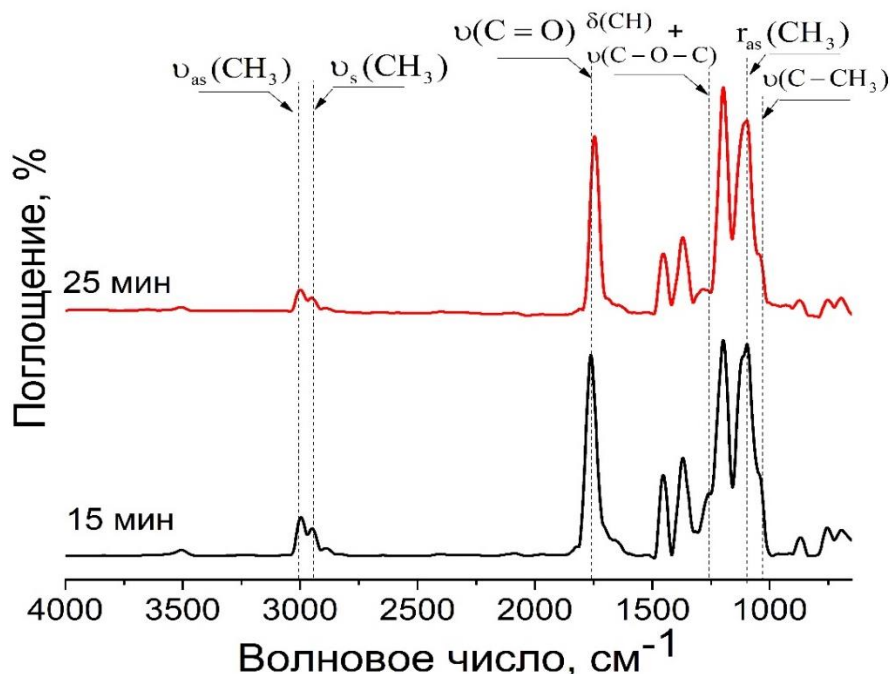


Рисунок 4.27 – ИК – спектры поглощения биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение: 15 минут и 25 минут

Кроме того, из спектров светопропускания биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ полученных травлением при температуре 44°C и временем травления от 10 до 25 минут, представленных на рисунке 4.28 видно, что увеличение времени травления облученной плёнки ионами $^4\text{He}^{2+}$, приводит к смещению полосы поглощения и как следствие происходит потеря прозрачности плёнки. Так коэффициент пропускания при травлении в течение 10 минут в максимуме $\lambda = 400$ нм равен 89,2%, для 15 минут 88,4%, для 20 мин 87,7%, при этом видимого помутнения в трековых мембранах, полученных при 10 – 15 мин не наблюдалось (таблица 4.5). Травление облучённой плёнки в течение 25 минут приводило к

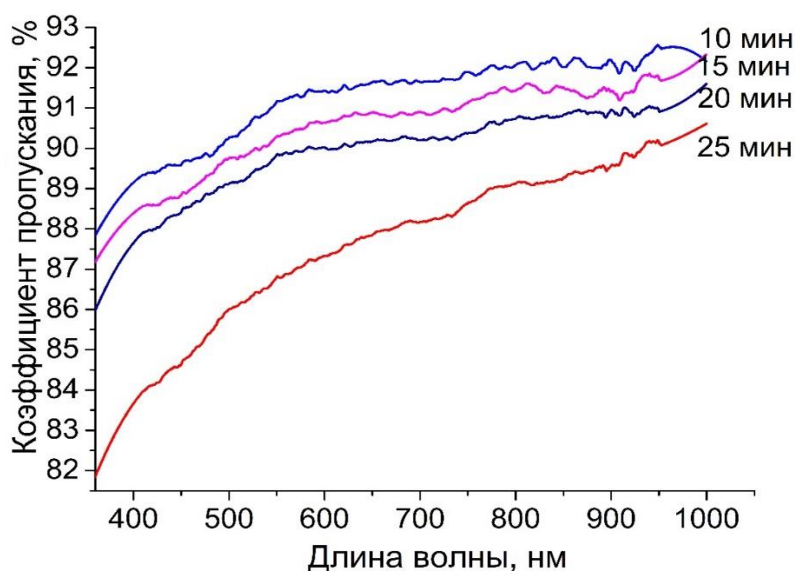


Рисунок 4.28 – Спектры пропускания биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$, полученных травлением при температуре 44°C в течение: а) 10 минут; б) 15 минут; в) 20 минут; г) 25 минут

наиболее значительному снижению коэффициента пропускания в максимуме при $\lambda = 400$ нм который равен 83,7% и при $\lambda = 600$ нм равен 87,3% (рисунок 3.28), а также падению прозрачности в сравнении с исходной плёнкой полилактида на 1,8%, а образцы приобретали еле заметный беловатый оттенок, видимый невооруженным глазом (таблица 4.5), что может быть обусловлено реконструкцией полимерной необлучённой матрицы вызванной щелочным гидролизом, увеличением диаметра пор, а также ростом поверхностной плотности пор,

связанный с неравномерным протравливанием треков вызванное слабой избирательностью травителя. При этом, согласно литературным данным для плёнки, облученной ионами ${}^4\text{He}^{2+}$ плотность пор может достигать порядка равного флюенсу облучения ионами, $1,3 \times 10^{13} \text{ см}^{-2}$ [73, 149].

Таблица 4.5 – Прозрачность (длина волны $\lambda = 600 \text{ нм}$) биорезорбируемых ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ полученных травлением при температуре $44 \text{ }^\circ\text{C}$

Время травления, мин	Прозрачность
10	$2,21 \pm 0,03^*$
15	$2,22 \pm 0,03^*$
20	$2,22 \pm 0,03^*$
25	$2,24 \pm 0,03^*$

Примечание: * достоверность различий между группами трековых мембран $p < 0,01$

Оценку степени кристалличности ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ проводили методом ДСК. Анализ показал отсутствие значительных сдвигов температуры плавления, которая составляла $171,4 \text{ }^\circ\text{C}$ и небольшие изменения интенсивности пиков плавления. Так в качестве примера на рисунке 3.29 приведены ДСК и ТГ кривые ТМ полученной из облучённой плёнки и травленной в течение 15 мин, где кривая 1 (обозначенная черным цветом), отражает отсутствие изменений массы полимерной трековой мембраны увеличением температуры. в диапазоне $30 \text{ }^\circ\text{C} - 275 \text{ }^\circ\text{C}$, а кривая 2 показывает изменение теплового потока, исходящего от полимера (в сравнении с эталонным пустым тиглем). Видно, что в области $171,5 \text{ }^\circ\text{C}$ наблюдается пик эндотермического эффекта, соответствующего температуре плавления T_2 . Энтальпия плавления составляет $\Delta H_m = 36,3 \pm 0,7 \text{ Дж/г}$, а степень кристалличности ТМ равна $39,0 \pm 0,8\%$. Для ТМ полученной при травлении в течение 10 мин $\Delta H_m = 39,13 \pm 0,8 \text{ Дж/г}$, а степень кристалличности равна $41,9 \pm 0,8\%$. В сравнение с исходной не облученной плёнкой полилактида наблюдается небольшой рост кристалличности, как правило, это может быть связано с разными факторами. Считается, что при прохождении ионов сквозь плёнку происходит передача энергии веществу, в результате чего может

происходить радиационный нагрев, который может вызывать образование поперечных (межмолекулярных) связей и ориентацию макромолекул и цепей в полимере. В результате прохождения ионов сквозь полимер, происходит уменьшение числа возможных конформаций макромолекул и распрямление полимерных цепей, которое приводит к увеличению жесткости макромолекул, и в свою очередь, наблюдается процесс кристаллизации [150]. Увеличение времени травления 20 и 25 мин привело к уменьшению энтальпии плавления $\Delta H_m = 34,7 \pm 0,7$ Дж/г и $\Delta H_m = 33,8 \pm 0,7$ Дж/г соответственно, и как следствие наблюдается уменьшение кристалличности до $37,3 \pm 0,7\%$ и $36,3 \pm 0,7\%$, что связано с формированием локальных областей набухания полимера и растравливания стенок пор – по классическому механизму щелочного гидролиза [143].

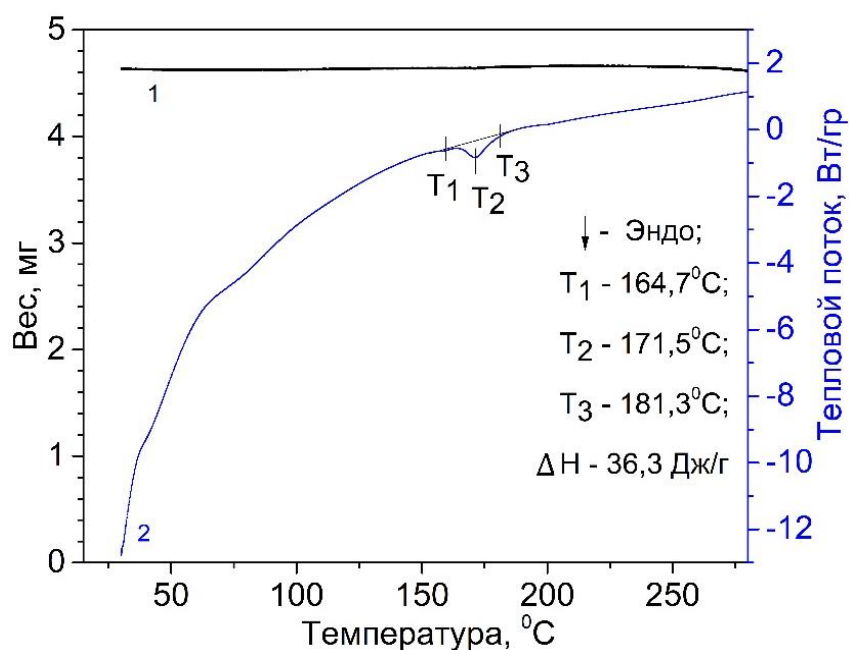


Рисунок 4.29 – Термограмма ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ полученных травлением при температуре 44°C в течение 15 минут, где T_1 – температура начала плавления, T_2 – температура максимума, T_3 – температура окончания пика плавления ($^{\circ}\text{C}$), энтальпия плавления ΔH_m (Дж/г)

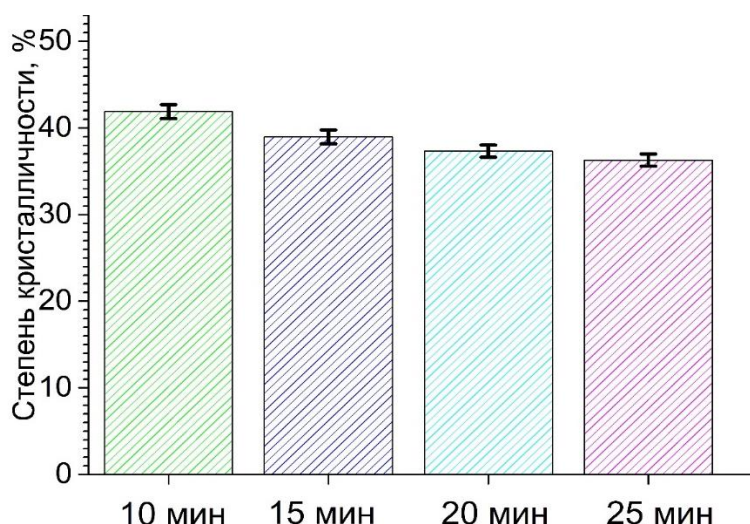


Рисунок 4.30 – Зависимость степени кристалличности биорезорбируемых ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ полученных травлением при температуре 44 °С от времени травления

4.6. Сравнительный анализ трековых мембран на пучках ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$

Выбор биорезорбируемой мембраны для применения в кератопластике является нелегкой задачей, так как полимерное изделие должно отвечать ряду требований, таким как: обоснованный размер пор и их плотность, требуемая геометрия сквозного канала (для роговичного имплантата предпочтительней цилиндрическая форма), необходимая шероховатость поверхности и смачиваемость, а также высокая оптическая пропускная способность. Кроме того, необходимо учитывать методику изготовления мембран, так как сложность в их получении может создать трудность и в создании медицинских изделий офтальмологического назначения. В работе приведены два метода получения трековых мембран из одного полимера – полилактида, а также приведены результаты исследований характеристик, разработанных ТМ, что позволило сравнить их.

Формирование латентных треков в плёнке полилактида возможно путем облучения пучком заряженных ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ или альфа-частицами $^4\text{He}^{2+}$, но для тяжелых ионов необходимы большие затраты энергии (160 МэВ), чем для легких частиц (28 МэВ). В то же время ионы ксенона с заявленной энергией позволяют

создать поры в материале при равных условиях травления (1 М раствор NaOH, температура 38 °С – 44 °С) с большим диаметром (от 0,2 мкм до 1,56 мкм (таблица 4.1)) и в более широком диапазоне, чем ${}^4\text{He}^{2+}$, где размер входного отверстия мембраны варьирует от 0,46 мкм до 0,75 мкм (таблица 4.4). Мембраны, полученные облучением ${}^{132}\text{Xe}^{23+}$ и травлением в растворе температурой 38 °С, имеют более «правильную» цилиндрическую форму геометрию сквозного канала (рисунок 4.9), чем мембраны, полученные облучением ${}^4\text{He}^{2+}$ в тех же условиях травления (форма глухих конических пор). Плотность пор в ${}^{132}\text{Xe}^{23+}$ трековых мембранах составляет $(3,2 \pm 0,4) \times 10^6$ пор/см² для всех режимов травления, в ${}^4\text{He}^{2+}$ трековых мембранах – варьируется от $(0,022 \pm 0,010) \times 10^6$ пор/см² до $(0,200 \pm 0,050) \times 10^6$ пор/см². Известно, что при равных значениях объемной пористости мембраны с более высокой плотностью пор имеют несколько худшие механические характеристики, чем мембраны с меньшей плотностью пор [151]. Мембраны, полученные облучением ионами ${}^{132}\text{Xe}^{23+}$, имеют лучшую селективность, чем ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$. При этом видно, что обнаруживается зависимость избирательности травления треков от заряда ядра и радиуса ионов, так в плёнках облученных пучком ионов ${}^{32}\text{Xe}^{23+}$ (заряд ядра $Z = 54$, радиус R иона = 0,1239 нм) при фиксированных условиях травления избирательность травления выше чем в плёнках облученных пучком ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ ($Z = 2$, $R = 0,093$ нм) [73].

Если рассматривать физико-химические и оптические свойства полученных мембран, то ТМ на пучке ионов ${}^{132}\text{Xe}^{23+}$ как прототип роговичного имплантата и подложка для культуры клеток выглядит более подходящей. Так, например, шероховатость ${}^{132}\text{Xe}^{23+}$ мембраны (на примере параметра R_a) варьирует от 5,5 нм до 6,0 нм (внутренняя поверхность образца) и от 5 нм до 18 нм (внешняя сторона) (табл. 4.2). В то время как ТМ на пучке ионов ${}^4\text{He}^{2+}$ имеет параметры шероховатости ($R_a = 7,4 \pm 1,0$ нм), приближенные к значениям исходной необлученной плёнки. Известно [152, 153], что более рельефная поверхность материала способствует лучшей адгезии клеток, в связи с чем мембрана с на пучке ионов ${}^{32}\text{Xe}^{23+}$ более подходящая в качестве культуральной подложки.

Коэффициент пропускания мембран, полученные облучением ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$, в области видимого спектра варьируется от 91% до 96% (рис. 4.16), в то время как ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ в том же диапазоне имеет коэффициент на 4% – 9% ниже (рисунок 4.28). Так как трековая мембрана разрабатывается для лечения заболеваний роговицы, а роговица – одна из главных преломляющих сред в оптической системе глаза [154], то имплантату необходимо иметь высокую пропускную способность, и мембрана на пучке ионов $^{32}\text{Xe}^{23+}$ в сравнении с $^4\text{He}^{2+}$ ТМ – более подходящая.

В то же время краевой угол смачиваемости мембран, полученные разными способами облучения, составляет $70^\circ - 73^\circ$, что определяет разрабатываемый материал как умеренно-гидрофильный.

Таким образом, сравнительный анализ трековых мембран из полилактида показал, что для создания роговичного имплантата необходимо облучать биodeградируемую плёнку пучком ионов $^{32}\text{Xe}^{23+}$, травить ее в 1 М растворе гидроксида натрия температурой $38^\circ\text{C} - 44^\circ\text{C}$. По данной методике возможно получение мембраны с необходимыми – для кератопластики – характеристиками.

4.7. Результаты исследования цитотоксичности полученных мембран

Оценку цитотоксичности полученных ТМ осуществляли методом анализа проточной цитофлуориметрии. Для подсчёта процента жизнеспособных клеток к ним добавляли реагент Guava ViaCount, содержащий краситель трипановый синий, который способен проникать только через измененную мембрану некротических клеток, что позволяет отличить жизнеспособные клетки от мертвых (рисунок 4.23).

Согласно полученным результатам жизнеспособность клеток, культивируемых с биорезорбируемыми трековыми мембранами на основе плёнки полилактида (на пучках ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$) составила 94%, с ТМ на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ составила 93% (таблица 4.5). В контрольной группе образцов (без трековой мембраны) жизнеспособность клеток была 95% (таблица 4.5).

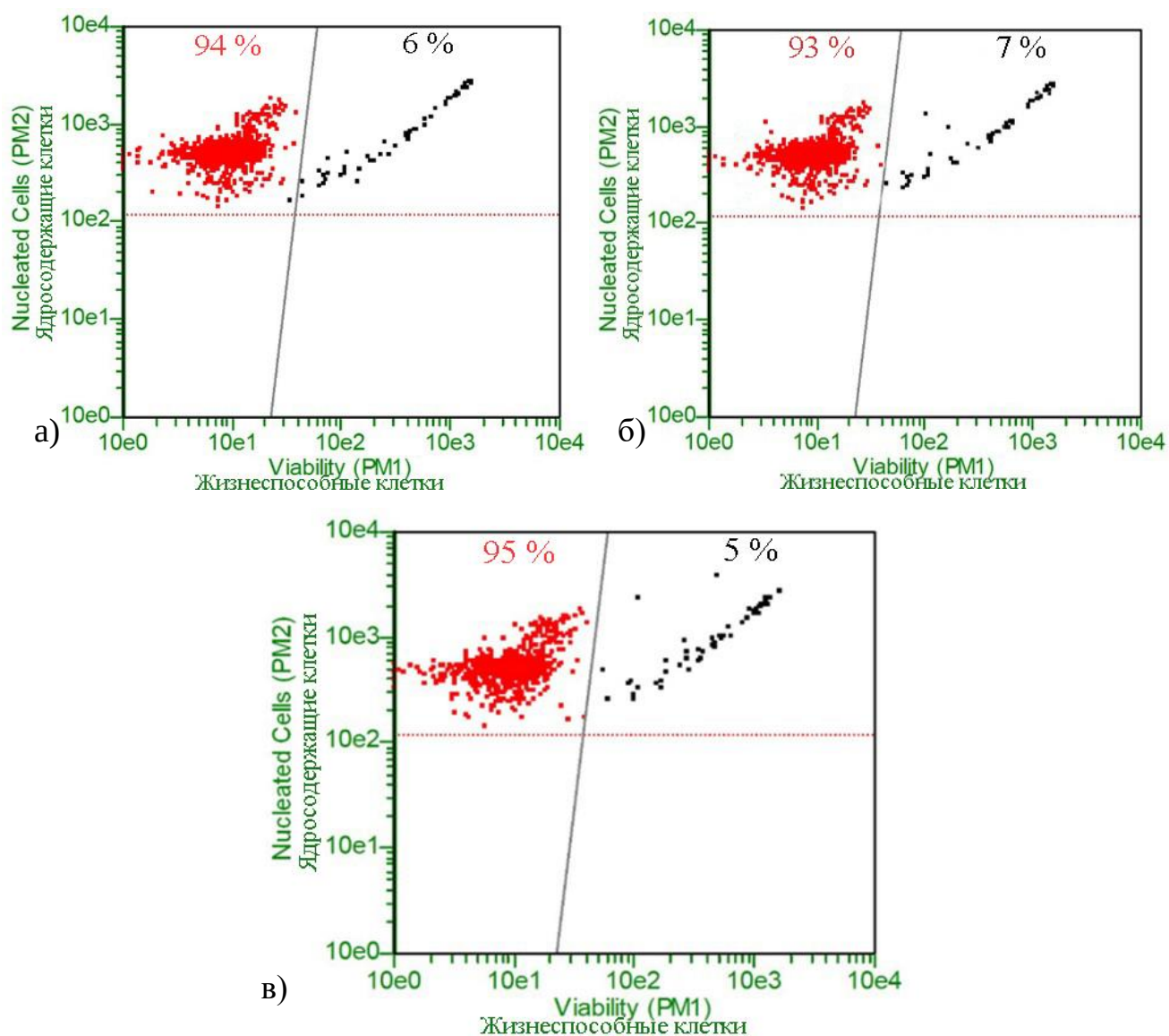


Рисунок 4.23 – Количество жизнеспособных (черные) и погибших аутологических мононуклеарных клеток периферической крови (красные) *in vitro*, культивируемых с трековыми мембранами из полилактида на пучках ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ (а), трековыми мембранами из полилактида на пучках ионов $^4\text{He}^{2+}$ (б) и контрольной группы (в), оценивали методом проточной цитофлуориметрии

Таким образом, результаты проведенной цитофлуориметрии свидетельствуют об отсутствии цитотоксического действия полученных биорезорбируемых трековых мембран на основе плёнки полилактида на культуру мононуклеарных лейкоцитов крови.

Таблица 4.5 – Количество жизнеспособных и погибших клеток *in vitro* (анализ не менее 1000 клеток)

Образцы	Клетки	Результаты подсчета методом Guava Viacount	
		Количество клеток, шт	Количество клеток, %
Контроль	живые	949 ± 2	94,9
	мертвые	51 ± 2	5,1
ТМ $^{132}\text{Xe}^{23+}$	живые	942 ± 2*	94,2
	мертвые	58 ± 2*	5,8
ТМ $^4\text{He}^{2+}$	живые	931 ± 2*	93,1
	мертвые	69 ± 2*	6,9

Примечание: *достоверность различий между контрольной группой и трековой мембраной $p < 0,01$

4.8. Биосовместимость разработанной биорезорбируемой трековой мембраны на основе плёнки полилактида на биологических моделях *in vivo*

У всех животных через 2 недели после формирования буллезной кератопатии наблюдались слезотечение, блефароспазм, диффузный отек и складки десцеметовой мембраны роговицы (рисунок 4.24). Спустя 2 недели от начала лечения, у 2-й, 3-й и 4-й группы наблюдалось уменьшение блефароспазма и слезотечения. На 4 неделе после имплантации у животных 3-й и 4-й группы указанные симптомы полностью купировались, отек роговицы заметно уменьшился, складки десцеметовой мембраны полностью расправились. У 2-й группы сохранялись слезотечение, единичные складки десцеметовой мембраны, отек роговицы. На 4 неделе после имплантации у животных 3-й и 4-й группы роговица была прозрачная, у 2-й группы наблюдался локальный отек роговой оболочки.

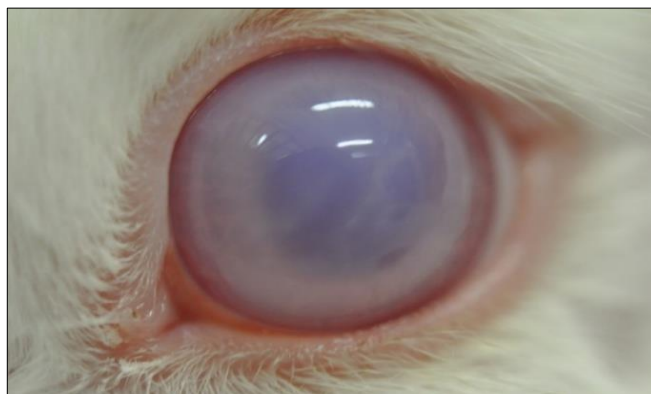


Рисунок 4.24 – Диффузный отек роговицы глаза кролика через 2 недели после формирования буллезной кератопатии

Согласно данным ОКТ, через 2 недели после формирования буллезной кератопатии толщина роговицы животных всех групп составляла 760 ± 35 мкм. Спустя 2 недели от начала лечения у 2-й группы толщина роговой оболочки составила 722 ± 43 мкм, у 3-й группы - 704 ± 24 мкм, у 4-й группы - 710 ± 32 мкм, $p < 0,05$. На 4-й неделе после имплантации у животных 2-й группы толщина роговицы уменьшилась до 706 ± 39 мкм, у 3-й группы до 654 ± 43 мкм, у 4-й группы до 681 ± 38 мкм, $p < 0,05$. На 6-й неделе от начала лечения у 2-й группы роговой оболочки составила 664 ± 55 мкм (рисунок 4.25), у 3-й группы до 590 ± 49 мкм, у 4-й группы до 615 ± 43 мкм, $p < 0,05$. У животных 1-й группы на протяжении всего эксперимента наблюдался диффузный отек роговицы с ее толщиной 712 ± 64 мкм.

В ходе гистологического исследования были получены следующие результаты.

У животных 3-й группы на 6-й неделе после имплантации передний эпителий был представлен 4 – 5 слоями плоского эпителия с нормохромными ядрами (рисунок 4.26). Боуменова мембрана была неизменной и визуализировалась как однородная эозинофильная полоска. В строме обнаруживались тонкостенные новообразованные кровеносные сосуды с удельным объемом не более $5,0 \pm 1,4\%$, $p < 0,05$ (рисунок 4.27). Коллагеновые волокна располагались преимущественно

компактно. В некоторых местах коллагеновые волокна имели увеличенный извитый ход (рисунок 4.26). В строме отмечалась слабая инфильтрация лейкоцитов

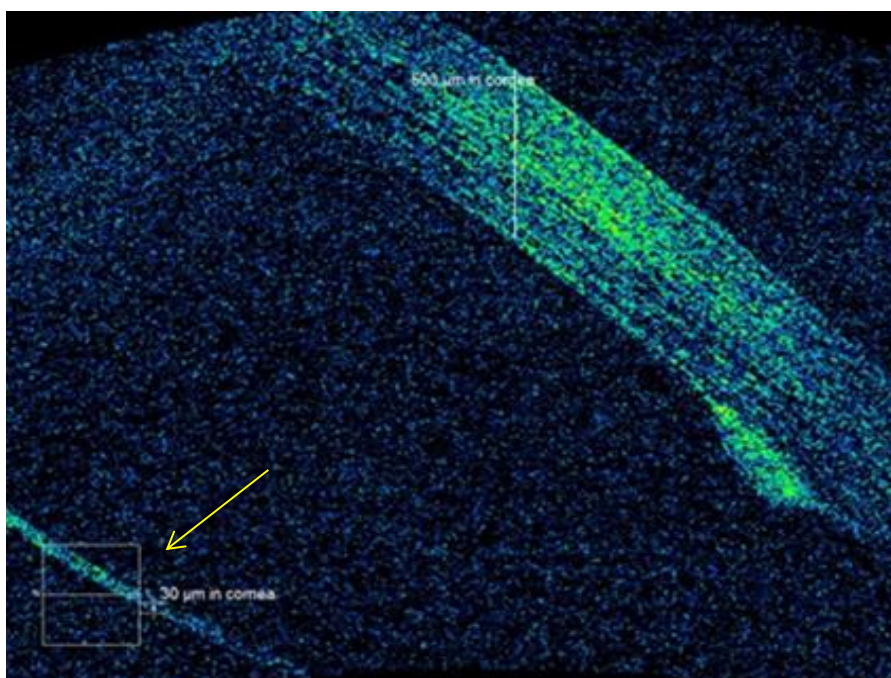


Рисунок 4.25 – ОКТ роговицы и передней камеры с плёнкой (желтая стрелка) на основе полилактида глаза животного 2- й группы на 6- й неделе после имплантации

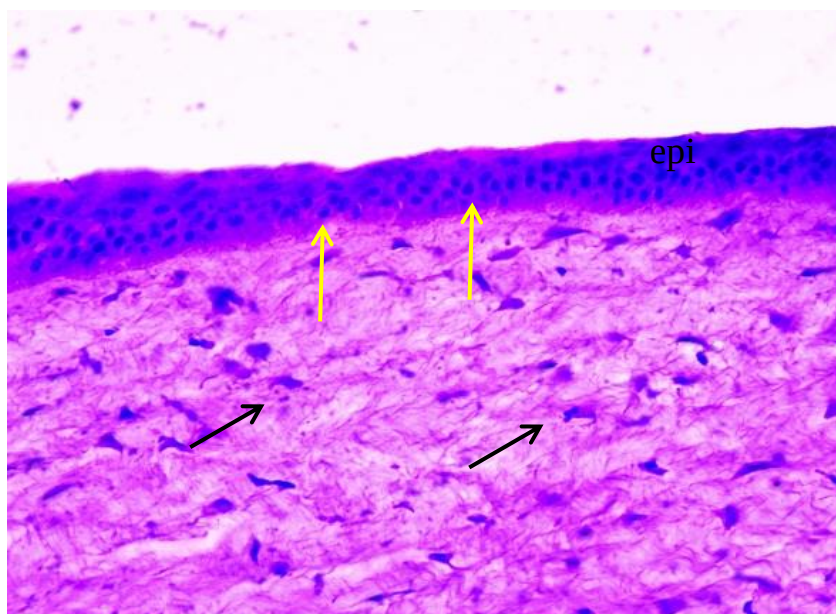


Рисунок 4.26 – Передний эпителий (epi), Боуменова мембрана (желтые стрелки) и умеренно повышенный извитой ход (указано черными стрелками) коллагеновых волокон глаза животного 3-й группы на 6-й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

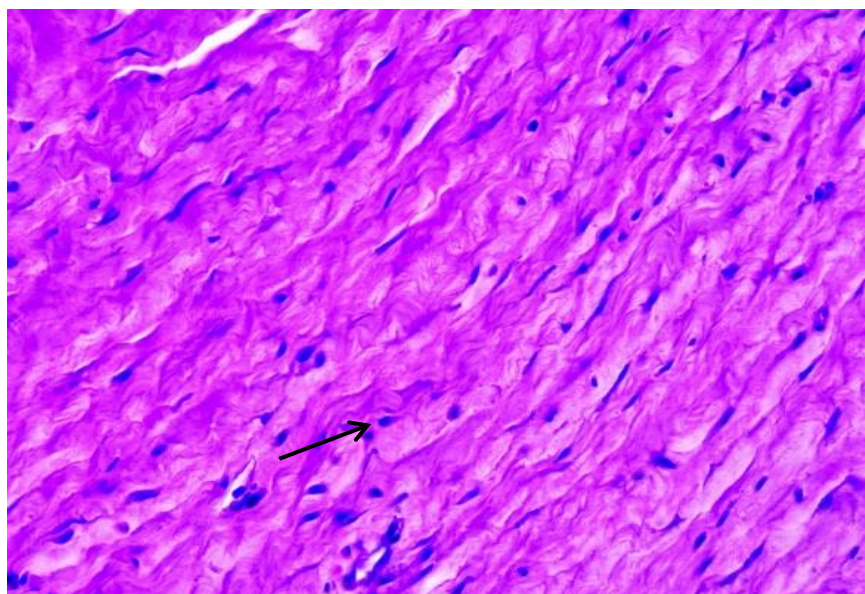


Рисунок 4.27 – Тонкостенный новообразованный кровеносный сосуд (стрелка) в строме роговицы глаза животного 3- й группы на 6- й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

(удельный объем лейкоцитов был менее $3,2 \pm 1,0\%$, $p < 0,05$). Десцеметова мембрана визуализировалась на всем протяжении. В некоторых местах со стороны эндотелия наблюдалась пролиферация эндотелиальных клеток в виде клеток отростчатой формы.

У животных 4- й группы на 6- й неделе после имплантации передний эпителий был представлен 4 – 5 слоями плоского эпителия с нормохромными ядрами (рисунок 4.28). Боуменова мембрана была неизменной и визуализировалась как однородная эозинофильная полоска. В строме обнаруживались тонкостенные новообразованные кровеносные сосуды с удельным объемом не более $3,1 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$. В строме обнаруживались щели между коллагеновыми волокнами, свидетельствующие о наличии отека, удельным объемом $8,5 \pm 4,3\%$, $p < 0,05$. Коллагеновые волокна располагались преимущественно компактно. В некоторых местах коллагеновые волокна имели увеличенный извитый ход. В строме отмечалась слабая инфильтрация лейкоцитов (удельный объем лейкоцитов был

менее $2,3 \pm 1,0\%$, $p < 0,05$). Десцеметова мембрана визуализировалась на всем протяжении.

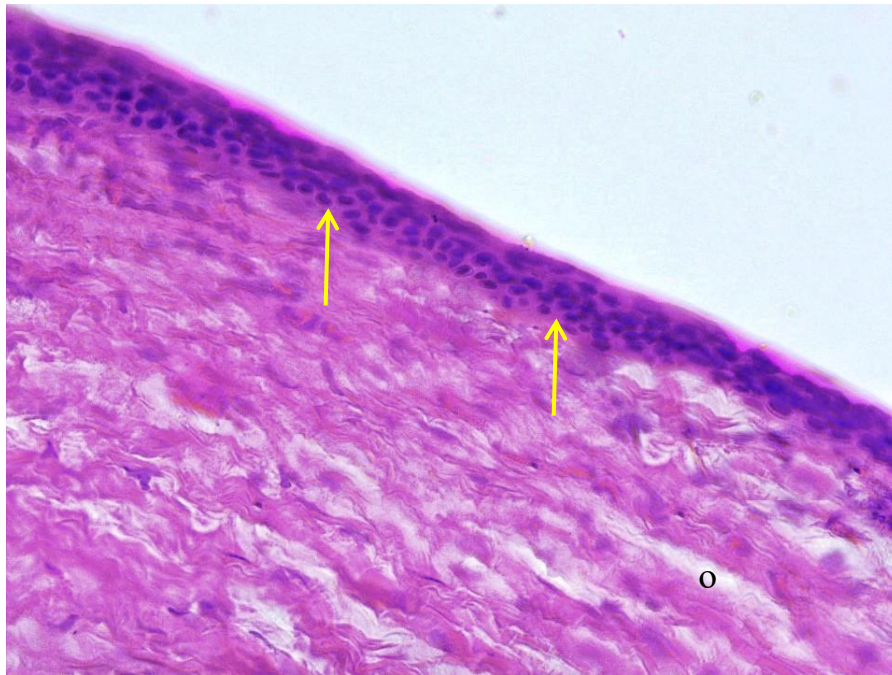


Рисунок 4.28 – Передний эпителий, Боуменова мембрана (желтые стрелки) отек (о) и умеренно повышенный извитой ход коллагеновых волокон глаза. глаза животного 4- й группы на 6-й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

У животных 2- й группы на 6- й неделе после имплантации передний эпителий был представлен 4 – 5 слоями плоского эпителия с нормохромными ядрами (рисунок 4.29). Боуменова мембрана визуализировалась, как однородная эозинофильная полоска, местами утолщена. В строме обнаруживались тонкостенные новообразованные кровеносные сосуды с удельным объемом $8,9 \pm 2,3\%$, $p < 0,05$ (рисунок 4.30). Коллагеновые волокна преимущественно располагались компактно, местами имели увеличенный извитый ход (рисунок 4.31). В строме отмечалась слабая инфильтрация лейкоцитов (удельный объем лейкоцитов составил $5,1 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$). Десцеметова мембрана визуализировалась на всем протяжении.

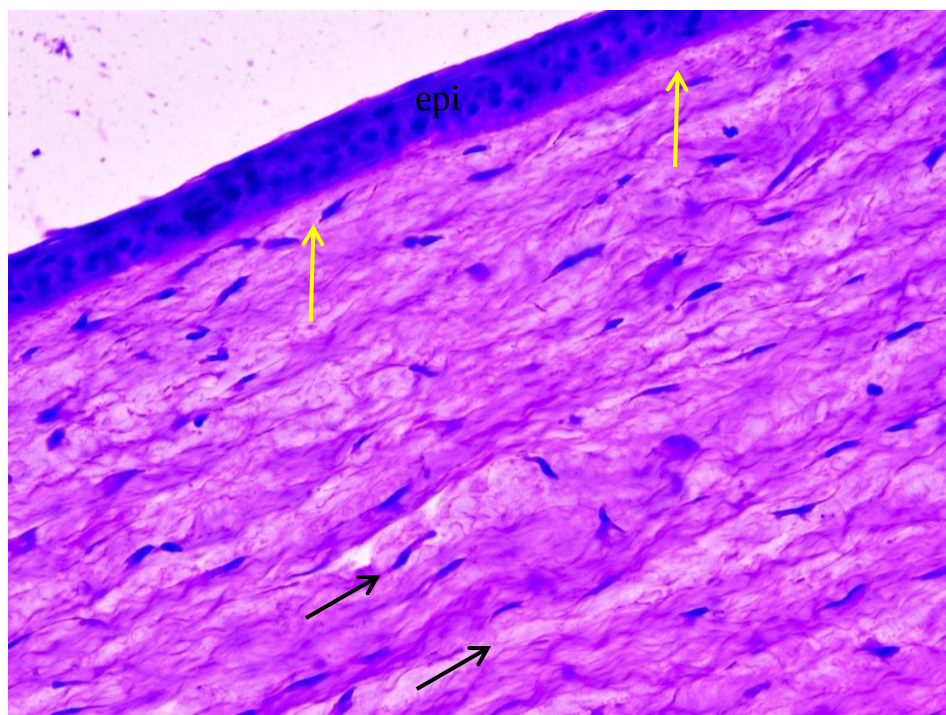


Рисунок 4.29 – Передний эпителий (epi), Боуменова мембрана (желтые стрелки) и умеренно повышенный извитой ход (указано черными стрелками) коллагеновых волокон глаза животного 2- й группы на 6- й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение x200

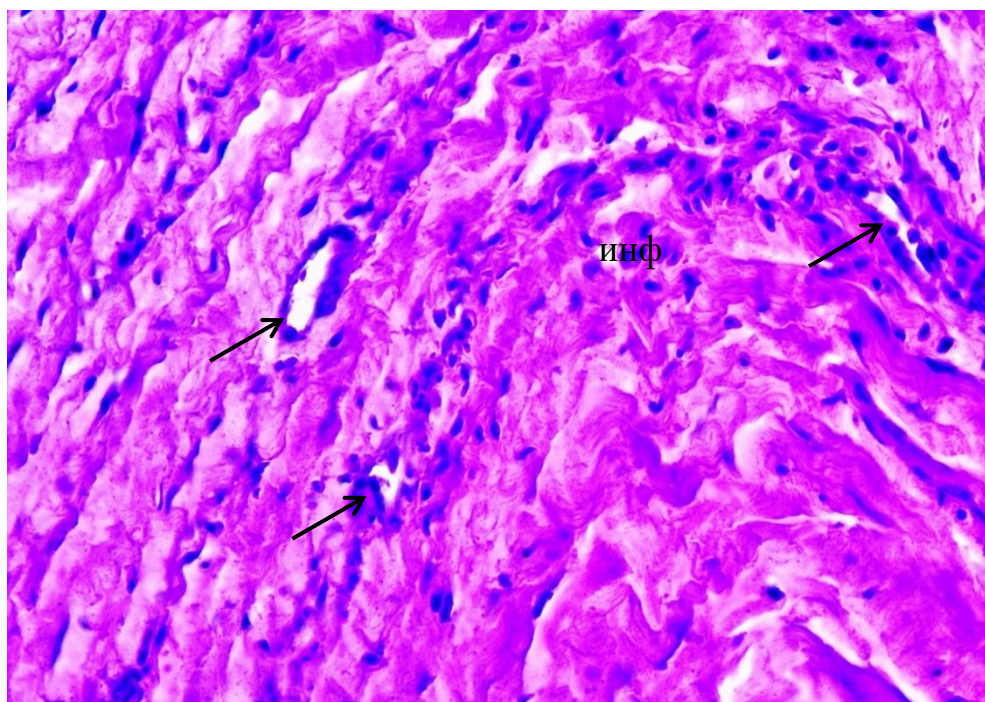


Рисунок 4.30 – Новообразованные кровеносные сосуды (черные стрелки) и лейкоцитарная инфильтрация (инф) в строме роговицы глаза животного 2- й группы на 6- й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

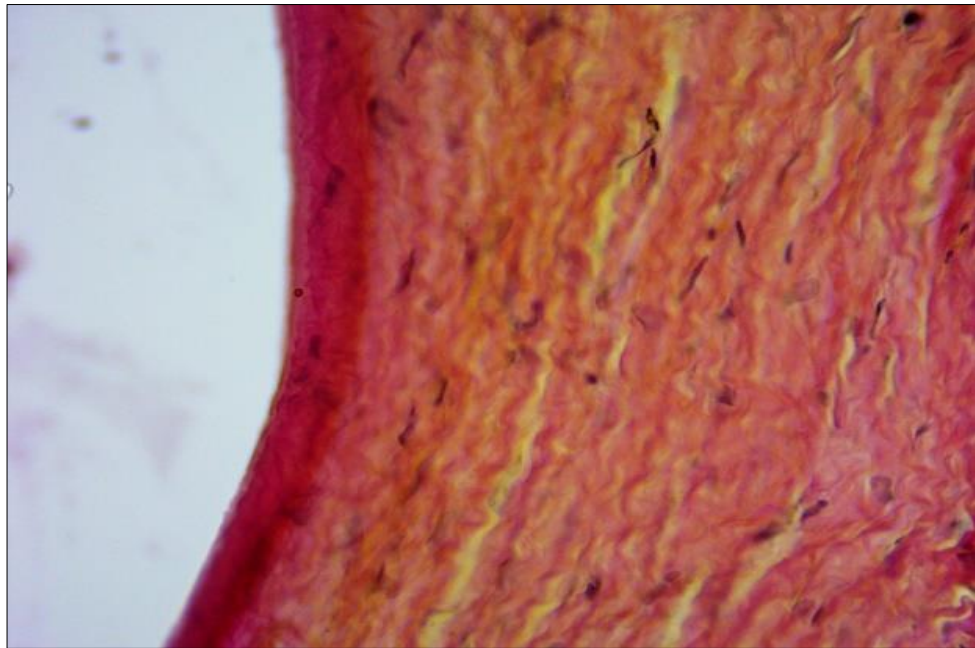


Рисунок 4.31 – Умеренно повышенный извитой ход коллагеновых волокон роговицы глаза животного 2- й группы на 6- й неделе после имплантации. Окраска по методу Ван Гизона.

Увеличение x200

У животных 1- й группы на 6 неделе от начала лечения передний эпителий был представлен 4 – 5 слоями плоского эпителия с нормохромными ядрами, местами эпителий утолщен (рисунок 4.32). Боуменова мембрана визуализировалась нечетко на всем протяжении. В строме обнаруживались щели между коллагеновыми волокнами, свидетельствующие о наличии отека, удельным объемом $12,5 \pm 5,4\%$, $p < 0,05$. Местами встречались тонкостенные новообразованные кровеносные сосуды с удельным объемом $3,9 \pm 2,3\%$, $p < 0,05$ (рисунок 4.33). Коллагеновые волокна с увеличенным извитым ходом (рисунок 4.33). Десцеметова мембрана визуализировалась не на всем протяжении. Эндотелий отсутствовал.

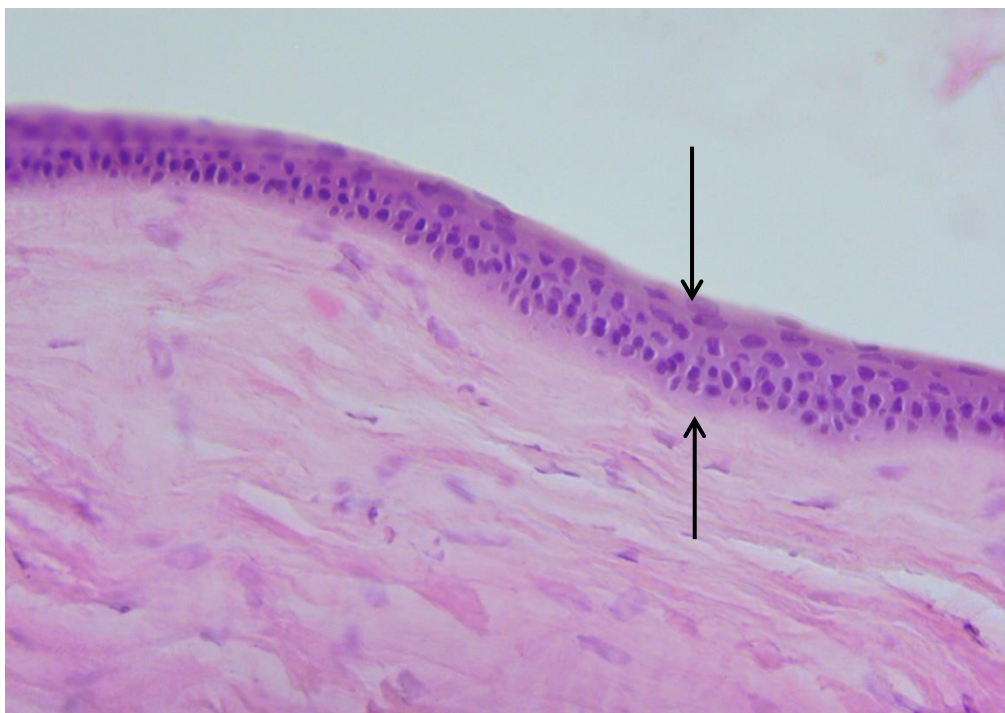


Рисунок 4.32 – Утолщенный эпителий (указано стрелками) роговицы глаза животного 1-й группы на 6-й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

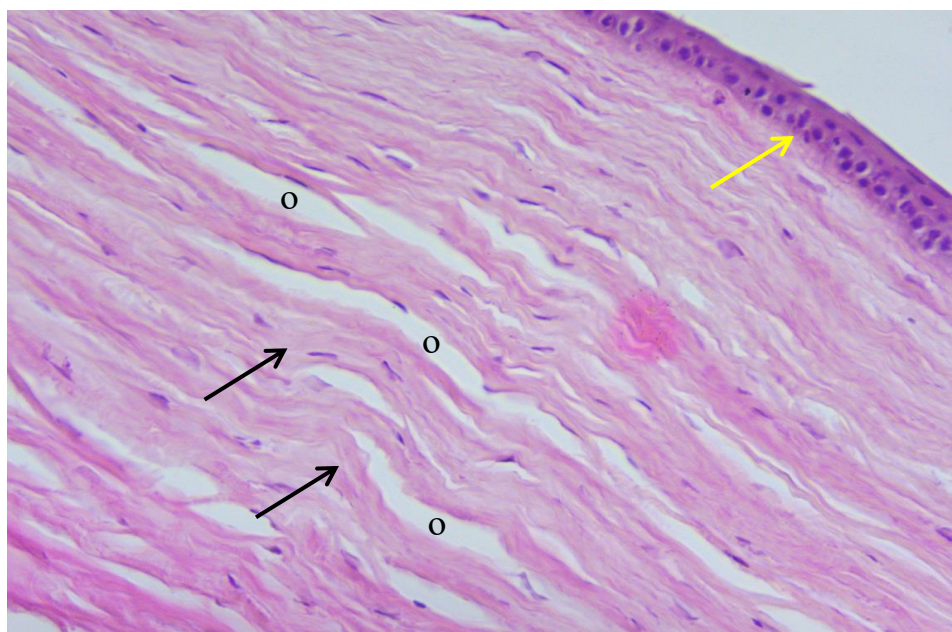


Рисунок 4.33 – Слабо выраженная Боуменова мембрана (желтая стрелка), отек (о) и умеренно повышенный извитой ход (черными стрелки) коллагеновых волокон глаза животного 1-й группы на 6-й неделе после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 200$

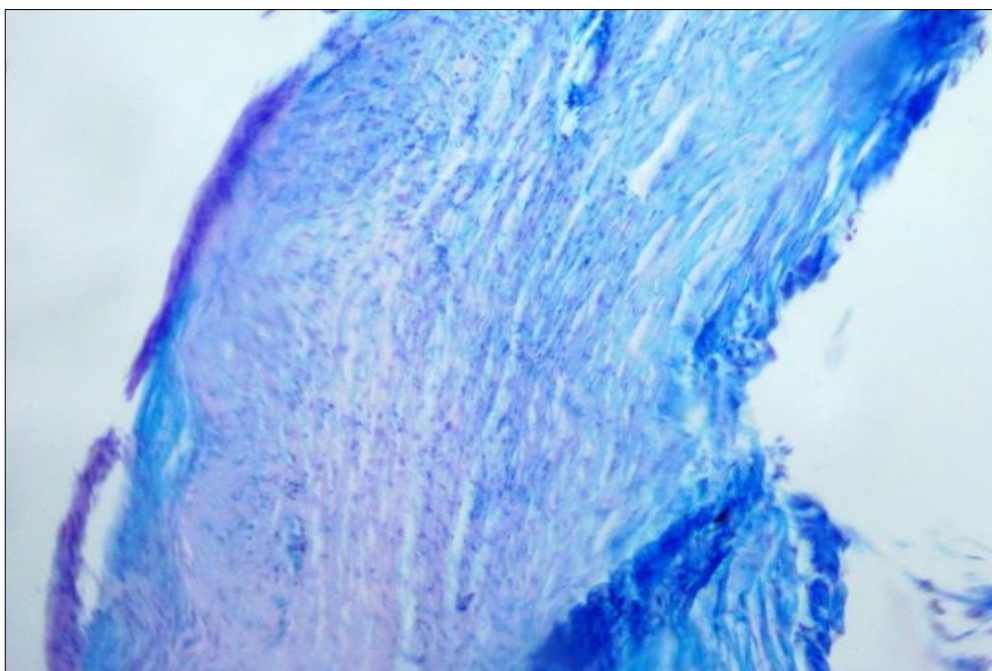


Рисунок 4.34 – Сульфатированные гликозаминогликаны в строме роговицы глаза животного 3- й группы на 6- й неделе после имплантации. Окраска альциановым синим (рН 2,5). Увеличение $\times 100$

Окрашивание альциановым синим при рН 2,5 показало наличие сильноокислых сульфатированных гликозаминогликанов в строме роговицы глаза животного 4- й, 3- й и 2- й групп на 6- й неделе после имплантации (рисунок 4.34).

Электронно-микроскопическое исследование роговицы животных всех групп на 6 неделе от начала эксперимента показало, что эпителиоциты имели крупное, светлое ядро и крупное ядрышко с выраженными гранулярным, фибриллярным и аморфным компонентами, преобладал эухроматин (рисунок 4.35). Вокруг ядра присутствовала хорошо развитая гранулярная ЭПС. Также в цитозоле определялось много свободных рибосом, полисом и митохондрий с нормальной структурой. Между эпителиальными клетками обнаруживались хорошо заметные плотные контакты.

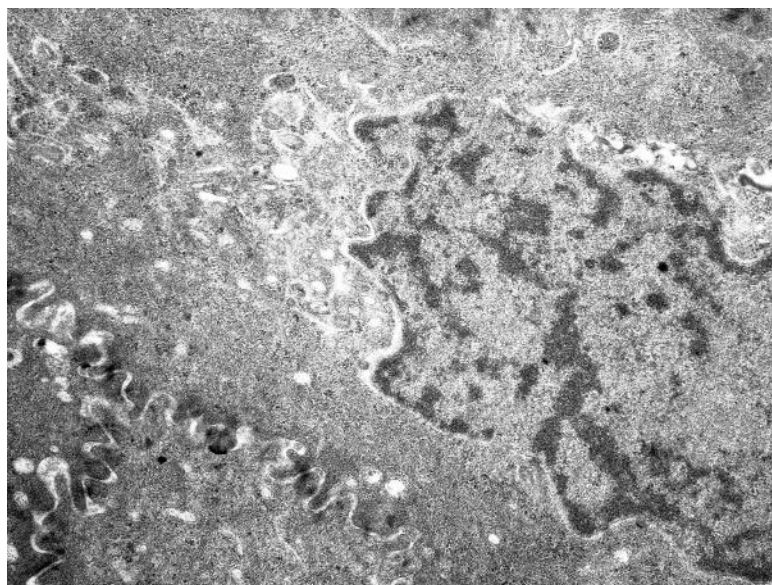


Рисунок 4.35 – ПЭМ-микрофотография эпителиоцитов роговицы экспериментального животного 3- й группы на 6- й неделе от начала эксперимента. Увеличение $\times 5800$

Анализ ПЭМ-микрофотографий роговицы выявил, что у всех групп животных определялись тонкие коллагеновые волокна, при этом для групп 2 и 4 наблюдался в сравнении с 3- й группой, более увеличенный извитый и неупорядоченный ход (рисунок 4.36, 4.37), при этом между пучками волокон располагались преимущественно веретеновидной и вытянутой формы клетки с относительно большими ядрами - фибробласты.

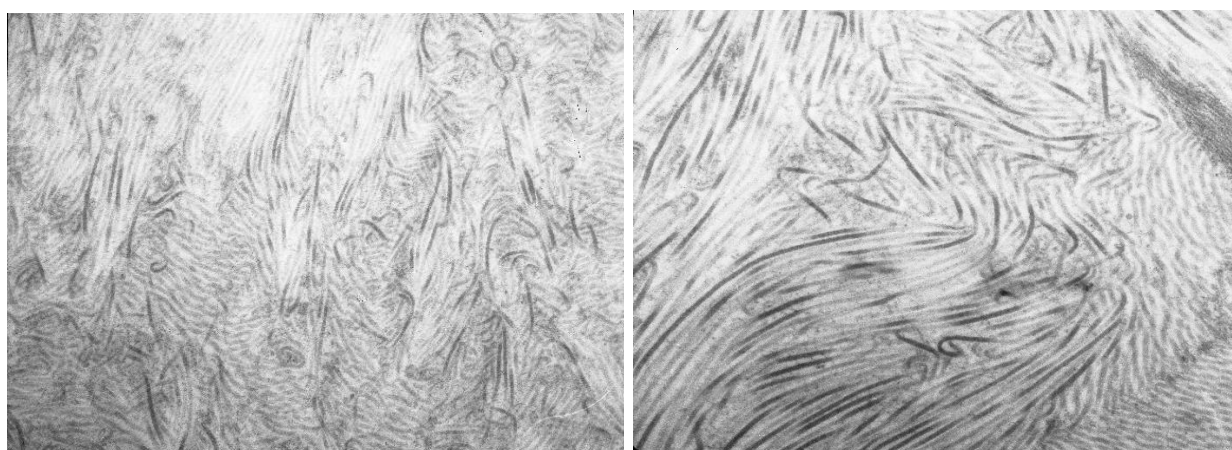


Рисунок 4.36 – ПЭМ-микрофотография пучков коллагеновых волокон с повышено извитым ходом роговицы экспериментального животного 3- й группы (а) и 4- й группы (б) на 6- й неделе от начала эксперимента. Увеличение $\times 5800$

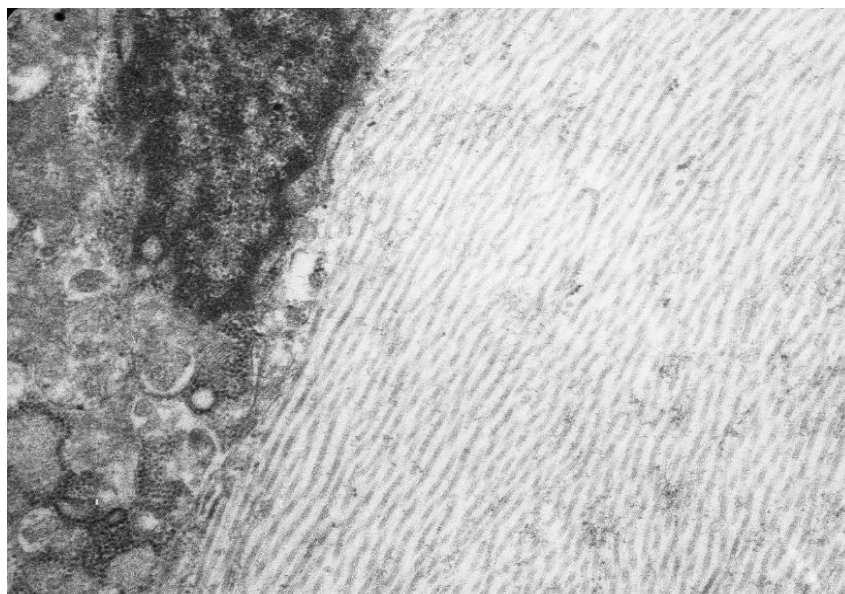


Рисунок 4.37 – ПЭМ-микрофотография фибробласта и пучков коллагеновых волокон роговицы экспериментального животного 4-й группы на 6-й неделе от начала эксперимента. Увеличение $\times 5800$

Фибробласты стромы роговицы животных всех групп имели нормальное строение (большое овальное ядро с четко выраженными хроматинами, нормальная структура митохондрий, не удлинённые резервуары эндоплазматической сети) (рисунок 4.37, 4.38).

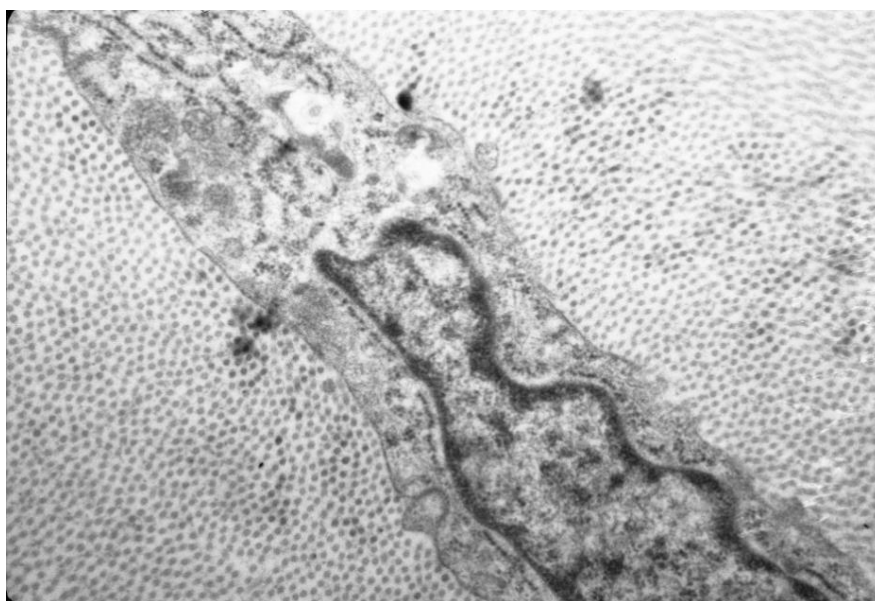


Рисунок 4.38 – ПЭМ-микрофотография фибробласта роговицы экспериментального животного 3-й группы на 6-й неделе от начала эксперимента. Увеличение $\times 5800$

Таким образом, в результате исследований *in vivo* выявлено, что имплантация трековых мембран на основе плёнки полилактида с наслоением аутологичных мононуклеарных лейкоцитов способствует значительному уменьшению отека роговой оболочки по сравнению с имплантацией плёнки полилактида. При этом проведенная прижизненная конфокальная микроскопия показала, что имплантация трековых мембран на пучке ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ в сравнении с плёнкой и трековых мембран на пучке ионов $^4\text{He}^{2+}$ приводит к более ускоренному снижению отека и сопровождается развитием умеренно выраженной воспалительной реакции, что может объясняться строением и поверхностными характеристиками полученных материалов. Кроме того, имплантация как плёнки полилактида, так и биорезорбируемых трековых мембран сопровождается легкой инфильтрацией лейкоцитов, образованием тонкостенных кровеносных сосудов и присутствием сильноокислых сульфатированных гликозаминогликанов. Данную реакцию можно расценить как ответа на имплантацию инородного материала.

4.9. Выводы к 4 главе

1. Установлено, что облучение тяжёлыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ энергией 160 МэВ и/или ионами $^4\text{He}^{2+}$ энергией 28 МэВ позволяет сформировать латентные треки в плёнке полилактида;

2. Установлено, что наиболее эффективным режимом получения трековых мембран на основе биodeградируемой плёнки полилактида, облучённой ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$, является травление треков в 1 М растворе NaOH при температуре 44 ± 1 °С. Варьирование времени нахождения плёнок в травителе позволяет получать поры контролируемого диаметра.

3. Выявлено предельное время нахождения в травителе биорезорбируемых плёнок из полилактида, облучённых тяжёлыми ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$, которое составляет 20 минут. Дальнейшее выдерживание образца в травителе, приводит к деформированию, многократному наложению пор, к потере прочности и к разрушению трековой мембраны.

4. Облучение потоком ионов $^4\text{He}^{2+}$ с энергией 28 МэВ плёнки полилактида и последующее её травление в 1 М растворе гидроксида натрия при температуре 44 °С приводит к образованию пор диаметром от 0,47 до 0,65 мкм и открыло новые возможности в создании трековых мембран.

5. Выявлено, что в биорезорбируемой плёнке, облучённой ионами $^4\text{He}^{2+}$, в отличие от облучённой ионами $^{132}\text{Xe}^{23+}$ травление в гидроксиде натрия при температуре 38 °С от 5 до 25 минут не позволяет сформировать сквозные поры, при этом температура раствора 50 °С значительно увеличивается скорость растравливания треков в плёнках в обоих случаях и приводит к разрушению мембраны.

6. Установлено, что ТМ на основе плёнки полилактида обладают свойствами, близкими к гидрофобным с краевым углом смачивания (θ) $70^\circ - 73^\circ$, при этом шероховатость не оказывает заметного влияния на величину θ .

7. Облучение пучком ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ плёнки полилактида и последующее её травление в 1 молярном растворе NaOH при температуре (44 ± 1) °С в течение 15

минут позволяют сформировать трековую мембрану с большим диаметром пор 0,7 мкм, более шероховатой поверхностью 18 нм и высоким значением коэффициента пропускания (92 – 96%) в области видимого спектра, чем у трековых мембран, полученных облучением пучком ионов $^4\text{He}^{2+}$ при тех же условиях травления.

8. Передний эпителий роговицы при имплантации ТМ на основе плёнки полилактида не претерпевает изменений и представлен эпителиоцитами с нормохромными ядрами и органеллами с нормальной структурой.

9. По результатам *in vitro* и *in vivo* трековые мембраны на пучках ионов $^{132}\text{Xe}^{23+}$ и $^4\text{He}^{2+}$ на основе биорезорбируемой плёнки полилактида не оказывают цитотоксического действия, не приводит к воспалительным процессам, повышению внутриглазного давления и другим послеоперационным осложнениям и могут быть предложены в качестве материала для дальнейших клинических исследований в области лечения буллезной кератопатии.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;

ГПХ – гель проникающая хроматография;

г – грамм;

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия;

МСК – мезенхимальные стромальные клетки;

ОКТ – оптическая когерентная томография;

отн.ед. – относительные единицы;

ПМК – полимолочная кислота;

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;

РЭМ – растровая электронная микроскопия;

СЭП – свободная энергия поверхности;

ТМ – трековая мембрана;

УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение;

ЭЭД – эндотелиально-эпителиальная дистрофия;

ЭПС – эндоплазматическая сеть или эндоплазматический ретикулум (ЭПР).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему дорогому научному руководителю д.ф.-м.н., профессору Пичугину Владимиру Федоровичу за неоценимую помощь и поддержку на всех этапах подготовки диссертационной работы. Глубокую благодарность автор выражает профессору д.ф.-м.н. Юрию Юрьевичу Крючкову за консультации, поддержку и возможность дойти до защиты. Автор также благодарит к.т.н. Филиппову Екатерину Олеговну за непосредственное участие в проведении экспериментов и апробации их *in vivo*. Автор выражает огромную благодарность коллективу лаборатории Плазменных гибридных систем Томского политехнического университета за предоставленные материалы и помещение под исследования, а также за своевременную поддержку и помощь в исследованиях: руководителю лаборатории к. ф.-м. н. С.И. Твердохлебову, научному сотруднику Е.Н. Больбасову, инженеру-исследователю С.И. Горенинскому и др. Отдельная благодарность профессору д.х.н. П.Ю. Апелю и сотрудникам лаборатории ядерных реакций им. Г.Н. Флерова ОИЯИ за содействие в работе. Также автор благодарит научного сотрудника В.В. Сохореву за содействие в облучении образцов на ускорителе Р-7М. И конечно, бесконечная благодарность дорогим и близким людям, которые меня поддерживали на всем пути.

Список литературы

1. World report on vision. World Health Organization – 2019. – P. 180.
2. Оганесян, О. Г. Результаты эндотелиальной кератопластики. Часть 1. Неавтоматизированная эндотелиальная кератопластика (DSEK) / О. Г. Оганесян, В. В. Нероев, Р. А. Гундорова, Д. Ю. Данилова, М. А. Сметанина // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2010. – Т. 10. – № 4. – С. 17-24.
3. Нероев, В. В. Организация офтальмологической помощи населению Российской Федерации / В. В. Нероев // Вестник офтальмологии. – 2014. – Т. 130. – № 6. – С. 8-12.
4. Каарова, Е. А. Клиническая эффективность персонализированной клеточной терапии заболеваний эндотелия роговицы / Е. А. Каарова, А. М. Суббот, А. И. Антохин, А. С. Павлюк // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2011. – Т. 11. – № 2. – С. 45-49.
5. Даниличев, В. Ф. Современная офтальмология: Руководство. 2-е изд / В. Ф. Даниличев; под ред. В. Ф. Даниличева. – СПб.: Питер, 2009. – 281 с.
6. Волков, В. В. Новое в лечении глубокой дистрофии роговицы / В. В. Волков, М. М. Дронов // Международная конференция по кератопластике и кератопротезированию: тезисы докладов. – Одесса, 1978. – 90-92 с.
7. Паштаев, Н. П. Влияние мягких контактных линз на структуру и биомеханические свойства роговицы / Н. П. Паштаев, С. Г. Бодрова, Н. В. Бородина, М. М. Зарайская, Н. В. Майчук // Офтальмохирургия. – 2009. – № 4. – С. 10-13.
8. Нероев, В. В. Влияние кросслинкинга на заживление экспериментальных хирургических ранений роговицы / В. В. Нероев, А. Б. Петухова, Р. А. Гундорова, О. Г. Оганесян // Практическая медицина. – 2012. – Т. 1. – № 59. – С. 107-110
9. Raiskup, F. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet AI Principles / F. Raiskup, E. Spoerl // The ocular surface. – 2013. – V. 11. – № 2. – P. 65-74.
10. Егоров, В. В. Поиск возможностей повышения эффективности лечения тяжелых индуцированных дистрофий роговицы методом эксимерной хирургии /

В. В. Егоров, В. Д. Посвалюк, Е. Л. Сорокин // Офтальмология. – 2008. – Т. 5. – № 3. – С. 35-40.

11. Дронов, М. М. Глубокая дистрофия роговицы и методы ее лечения / М. М. Дронов // Офтальмохирургия и терапия. – 2004. – Т. 4. – № 1. – С. 20-25.

12. Bruce, E. Chapter 29 – Highlights of ocular surgery / E. Bruce, M. D. Spivey // The Ophthalmic Assistant: A Text for Allied and Associated Ophthalmic Personnel. – 2006. – P. 528

13. Скачков, Д. П. Хирургические методы лечения эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы / Д. П. Скачков, А. Л. Штилерман // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 144-148.

14. Скачков, Д. П. Фототерапевтическая кератостромэктомия в сочетании с интрастромальной амниопластикой в лечении индуцированной дистрофии роговицы / Д. П. Скачков, А. Л. Штилерман // Практическая медицина. – 2015. – № 2-1. – С. 87.

15. Труфанов, С. В. Оценка влияния сопутствующей глаукомы на результаты эндотелиальной кератопластики при буллезной кератопатии / С. В. Труфанов, С. А. Моложен, В. И. Сипливый, Е. А. Пивин // Национальный журнал глаукома. – 2015. – Т. 14. – № 1. – С. 62-67.

16. Душин, Н. В. Кератопластика в лечении заболеваний глаз (оптическая, рефракционная, лечебная, косметическая) / Н. В. Душин, М. А. Фролов, П. А. Гончар. – М.: РУДН, 2008. – 224 с.

17. McCarey, B. E. Hydrogel keratophakia: a freehand pocket dissection in the monkey model / B. E. McCarey, G. van Rij, W. H. Beekhuis, G. O. Waring // British journal of ophthalmology. – 1986. – V. 70. – № 3. – P. 187-191.

18. Гончар, П. А. Межслойная рефракционная тоннельная кератопластика в коррекции близорукости и астигматизма / П. А. Гончар, В. С. Беляев, В. В. Кравнинина // Вестник офтальмологии. – 1988. – Т. 104. – № 4. – С. 25-30.

19. Мушкова, И. А. Гистоморфологические изменения роговицы кролика после имплантации внутрироговичных линз и электронно-микроскопическое обоснование полученных результатов / И. А. Мушкова, С. А. Борзенко,

А. Н. Каримова, Ю. В. Шкандина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – № 12. – С. 187.

20. Andreghetti, E. Biocompatibility of Ferrara intracorneal ring segment with and without chondroitin sulfate coating. Clinical and histopathological evaluation in rabbits / E. Andreghetti, M. Hashimoto, MAC. Domingues, VAC. Antunes, PDS. Segundo, MRBD. Silva // Acta Cirurgica Brasileira. – 2013. – V. 28. – № 9. – P. 632-40.

21. Краснов, М. М. Первый опыт имплантации искусственной роговицы (аллопластическое кератопротезирование) / М. М. Краснов, Е. А. Орлова // Вестник офтальмологии. – 1967. – № 6. – С. 11-16.

22. Филиппова, Е. О. Применение полимерных материалов в лечении заболеваний роговицы / Е. О. Филиппова, А. С. Черняков, Н. М. Иванова // Вестник Авиценны. – 2019. – Т. 21. – № 3. – С.496-501.

23. McCarey, B. E. Refractive keratoplasty with intrastromal hydrogel lenticular implants / B. E. McCarey, D. T. Andrews // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1991. – V. 21. – P. 107-115.

24. McCarey, B. E. Hydrogel implants for refractive keratoplasty: corneal morphology / B. E. McCarey // Cur. Eye Res. – 1982. – V. 2. – P. 29-38.

25. Багров, С. Н. Способ улучшения биосовместимости интракорнеальных линз из гидрогелей с тканями роговицы, методом насыщения их раствором гликозаминогликанов / С. Н. Багров, И. А. Маклакова, Е. В. Ларионов, Н. Т. Тимошкина, И. Б. Медведев, А. А. Карамян // Офтальмохирургия. – 1999. – Т. 1. – С.71-72.

26. Гурбанов, Р. С. Интрастромальная кератопластика в коррекции миопии и миопического астигматизма при кератоконусе: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Гурабанов Рашадат Сади оглы. – М., 2010. – 151 с.

27. Шустеров, Ю. А. Морфологические аспекты рефракционной кератопластики гидрогелевым эксплантатом / Ю. А. Шустеров // Современные технологии в офтальмологии. – 2014. – Т. 3. – С.113.

28. Патент 2082364 Российская Федерация, МПК51 C1, A 61 F 9/007. Способ лечения буллезной кератопатии / Дронов, М. М., Каранов, К. С., Бобырь, А. Б.

заявитель и патентообладатель Дронов, М. М., Каранов, К. С., Бобырь, А. Б. – № 810235; заявл. 08.06.1993; опубл. 27.06.1997. – 4с.

29. Патент 208236410–4М Российская Федерация, МПК51 С1, А 61 F 9/007. Способ лечения буллезной кератопатии / Дронов, М. М., Каранов, К. С. заявитель и патентообладатель Дронов, М. М., Каранов, К. С. заявл. 21.01.2006; опубл. 27.06.2008. – 4 с.

30. Патент 2405513 Российская Федерация, МПК51 С1, А 61 F 9/007. Способ лечения буллезной кератопатии / Дружинин, И. Б. заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение "Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" имени академика С. Н. Федорова Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи". – № 2009137637/14. заявл. 13.10.2009; опубл. 10.12.2010, Бюл. – № 34. – 6 с.

31. Tyler, B. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications / B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, H. Brem // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – V. 107. – P. 163-175.

32. Li, W. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus / W. Li, Y. Hayashida, Y. T. Chen, S. C. Tseng // Cell Res. – 2007. – V. 17. – P. 26-36.

33. Brunette, I. Alternatives to eye bank native tissue for corneal stromal replacement / I. Brunette, C. J. Roberts, F. Vidal, M. Harissi-Dagher, J. Lachaine, H. Sheardown, M. Griffith // Progress in retinal and eye research. – 2017. – V. 59. – P. 97-130.

34. Cotsarelis, G. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells / G. Cotsarelis, S. Z. Cheng, G. Dong, T. T. Sun, R. M. Lavker // Cell. – 1989. – V. 57. – № 2. – P. 201-209.

35. Basu, S. Human limbal biopsy-derived stromal stem cells prevent corneal scarring / S. Basu, A. J. Hertsenbergh, M. L. Funderburgh, M. K. Burrow, M. M. Mann, Y. Du, J. L. Funderburgh // Science translational medicine. – 2014. – V. 6. – № 266. – P. 266ra172-266ra172.

36. Rama, P. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration / P. Rama, S. Matuska, G. Paganoni, A. Spinelli, M. De Luca, G. Pellegrini // *New England journal of medicine*. – 2010. – V. 363. – № 2. – P. 147-155.

37. Ma, Y. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells / Y. Ma, Y. Xu, Z. Xiao, W. Yang, C. Zhang, E. Song, L. Li // *Stem cells*. – 2006. – V. 24. – № 2. – P. 315-321.

38. Gu, S. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo / S. Gu, C. Xing, J. Han, M. O. Tso, J. Hong // *Molecular vision*. – 2009. – V. 15. – P. 99.

39. Liu, H. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype / H. Liu, J. Zhang, C. Y. Liu, Y. Hayashi, W. W. Y. Kao // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2012. – V. 16. – № 5. – P. 1114-1124.

40. Liu, X. W. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of corneal endothelium damages in rabbits / X. W. Liu, J. L. Zhao // *Chinese journal of ophthalmology*. – 2007. – V. 43. – № 6. – P. 540-545.

41. Katikireddy, K. R. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells / K. R. Katikireddy, R. Dana, U. V. Jurkunas // *Stem Cells*. – 2014. – V. 32. – № 3. – P. 717-729.

42. Zuk, P. A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. I. N. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, M. H. Hedrick // *Tissue engineering*. – 2001. – V. 7. – № 2. – P. 211-228.

43. Arnalich-Montiel, F. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma / F. Arnalich-Montiel, S. Pastor, A. Blazquez-Martinez, J. Fernandez-Delgado, M. Nistal, J. L. Alio, M. P. De Miguel // *Stem Cells*. – 2008. – V. 26. – № 2. – P. 570-579.

44. Романенков, Н. С. Методики выделения мезенхимальных стволовых клеток из аутологичной жировой ткани [Электронный ресурс] / Н. С. Романенков, К. Н. Мовчан // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 2. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24416>.

45. Amouzegar, A. Peripheral Blood or Bone Marrow Stem Cells? Practical Considerations in Hematopoietic Stem Cell Transplantation / A. Amouzegar, B. R. Dey, T. R. Spitzer // *Transfusion medicine reviews*. – 2019. – V. 33. – № 1. – P. 43-50.

46. Mariotti, J. Peripheral blood stem cells versus bone marrow for T cell–replete haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide in Hodgkin lymphoma / J. Mariotti, R. Devillier, S. Bramanti, L. Giordano, B. Sarina, S. Furst, M. Kogan // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2019. – V. 25. – № 9. – P. 1810-1817.

47. Guo, C. Long-term Outcomes of Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients With Cirrhosis / C. Guo, G. Guo, X. Zhou, Y. Chen, Z. Han, C. Yang, M. E. Gershwin // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2019. – V. 17. – № 6. – P. 1175-1182. e2.

48. Park, H. Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells of a Senior-Loken syndrome patient / H. Park, J. Han, Y. Lee, S. Kwak, S. K. Ko // *Stem cell research*. – 2019. – V. 41. – P. 101648.

49. Norooznezhad, A. H. Peripheral blood stem cell apheresis in low-weight children: A single centre study / A. H. Norooznezhad, A. M. Mohammadi, H. K. Fumani, P. Aminian, M. Jalili, M. Nikbakht, K. Alimoghaddam // *Transfusion and Apheresis Science*. – 2019. – V. 58. – № 3. – P. 300-303.

50. Menzel-Severing, J. Stem cell–based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future / J. Menzel-Severing, F. E. Kruse, U. Schlötzer-Schrehardt // *Canadian Journal of Ophthalmology*. – 2013. – V. 48. – № 1. – P. 13-21.

51. Chen, J. Study on biocompatibility of complexes of collagen–chitosan–sodium hyaluronate and cornea / J. Chen, Q. Li, J. Xu, Y. Huang, Y. Ding, H. Deng, S. Zhao, R. Chen // *Artificial organs*. – 2005. – V. 29. – P. 104-113.

52. Alaminos, M. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold / M. Alaminos, M.D.C. Sánchez-Quevedo, J.I. Muñoz-Ávila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras, A. Campos // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2006. – V. 47. – № 8. – P. 3311-3317.

53. Луканина, К. И. Разработка научных и технологических основ создания перевязочных средств из биодеструктируемых и биосовместимых волокнистых материалов: дис... канд. тех. наук: 05.11.17 / Луканина Ксения Игоревна. – М., 2011. – 157 с.

54. Jürgens, C. Biodegradable Films in Trauma and Orthopedic Surgery / C. Jürgens, A. P. Schulz, T. Porté, M. Faschingbauer, K. Seide // Eur. J. Trauma. – 2006. – V. 32. – № 2. – P. 160-171.

55. Middleton, J. C. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices / J. C. Middleton, A. J. Tipton // Biomaterials. – 2000. – V. 21. № 23. – P. 2335-2346.

56. Jain, R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices / R. Jain // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – № 23. – P. 2475 – 2490.

57. Da Silva, D. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems / D. da Silva, M. Kaduri, M. Poley, O. Adir, N. Krinsky, J. Shainsky-Roitman, A. Schroeder // Chemical Engineering Journal. – 2018. – V. 340. – P. 9-14.

58. P De Miguel, M. Cornea and ocular surface treatment / M. P De Miguel, J. L. Alio, F. Arnalich-Montiel, S. Fuentes-Julian, L. de Benito-Llopis, F. Amparo, L. Bataille // Current stem cell research & therapy. – 2010. – V. 5. – № 2. – P. 195-204.

59. Kulkarni, R. K. Polylactic Acid for Surgical Implants / R. K. Kulkarni, K. C. Pani, C. Neuman, F. Leonard // Arch. Surg. – 1966. – V. 93. – № 5. – P. 839-843.

60. Sin, L. E. Polylactic Acid. PLA Biopolymer Technology and Applications / L. T. Sin, A. R. Rahmat, W. A. W. A. Rahman // Elsevier Inc. – 2012. – P. 1-149.

61. Lopes, M. S. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications / M. S. Lopes, A. L. Jardini, R. Maciel Filho // Procedia Engineering. – 2012. – V. 42. – P. 1402-1413.

62. Peesan, M. Electrospinning of hexanoyl chitosan/polylactide blends / M. Peesan, R. Rujiravanit, P. Supaphol // Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition. – 2006. – V. 17. – № 5. – P. 547-565.

63. Sangsanoh, P. In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds / P. Sangsanoh, S. Waleetorncheepsawat, O. Suwantong, P. Wutticharoenmongkol, O. Weeranantanapan, B. Chuenjitbuntaworn, P. Supaphol // *Biomacromolecules*. – 2007. – V. 8. – № 5. – P. 1587-1594.

64. Ramot, Y. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers / Y. Ramot, M. Haim-Zada, A. J. Domb, A. Nyska // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – V. 107. – P. 153-162.

65. de la Mata, A. Poly-l/dl-lactic acid films functionalized with collagen IV as carrier substrata for corneal epithelial stem cells / A. de la Mata, M. A. Mateos-Timoneda, T. Nieto-Miguel, S. Galindo, M. López-Paniagua, J. A. Planell, M. Calonge // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – V. 177. – P. 121-129.

66. Iesavand, H. Investigation on absorption and release of mercaptopurine anticancer drug from modified polylactic acid as polymer carrier by molecular dynamic simulation / H. Iesavand, M. Rahmati, D. Afzali, S. Modiri // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – V. 105. – P. 110010.

67. Sharma, A. K. Overview of biopolymers as carriers of antiphlogistic agents for treatment of diverse ocular inflammations / A. K. Sharma, A. Arya, P. K. Sahoo, D. K. Majumdar // *Materials Science and Engineering*. – 2016. – V. 67. – P. 779-791.

68. Moritera, T. Feasibility of drug targeting to the retinal pigment epithelium with biodegradable microspheres / T. Moritera, Y. Ogura, N. Yoshimura, S. Kuriyama, Y. Honda, Y. Tabata, Y. Ikada // *Current eye research*. – 1994. – V. 13. – № 3. – P. 171-176.

69. Tokiwa, Y. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide) / Y. Tokiwa, B. P. Calabia // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – № 72. – P. 244-251.

70. Mohammadi, M. S. Polylactic acid (PLA) biomedical foams for tissue engineering / M. S. Mohammadi, M. N. Bureau, S. N. Nazhat // *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*. Woodhead Publishing. – 2014. – P. 313-334.

71. Spohr, R. Ion Tracks and Microtechnology / R. Spohr // *Principles and Applications*. Braunschweig. – 1990. – P. 269-272.

72. Флеров, Г. Н. Синтез сверхтяжелых элементов и применение методов ядерной физики в смежных областях / Г. Н. Флеров // Вестник Академии наук СССР. – 1984. – № 4. – С. 35.

73. Кравец, Л. И. Полипропиленовые трековые мембраны для микро-и ультрафильтрации химически агрессивных сред / Л. И. Кравец, С. Н. Дмитриев, П. Ю. Апель // Высокомолекулярные соединения. – 2000. – С. 1-34.

74. Ярославцев, А. Б. Мембраны и мембранные технологии / А. Б. Ярославцев. – М.: Научный ми. – 2013. – 612 с.

75. Апель, П. Ю. Кондуктометрические исследования структуры треков многозарядных ионов в различных полимерах / П. Ю. Апель // Химия высоких энергий. – 1991. – Т. 25. – С. 132.

76. Fleischer, R. L. Nuclear Tracks in Solids / R. L. Fleischer, P. B. Price, R. M. Walker // CA: University of California Press. – 1975. – P. 605.

77. Apel P. Y. Tracks of very heavy ions in polymers / P. Yu. Apel, A. Schulz, R. Spohr, C. Traumann, V. Vulsadakis // Nucl. Instrum. Meth. in Phys. Res. – 1997. – V. B130. – P. 55-63.

78. Ярославцев А. Б. Мембраны и мембранные технологии. – М.: Научный мир, 2013. – 163 с.

79. Рязанцева, Т. В. Экспериментальное исследование полиэтилен-терефталатных трековых мембран с наноструктурированной поверхностью в качестве эксплантодренажа / Т. В. Рязанцева, Л. И. Кравец // Известия Томского политехнического университета. – 2012. – Т. 320. – № 2. – С. 120 – 125.

80. Ryazantseva, T. V. Modified by air plasma polymer tack membranes as drainage material for antiglaucomatous operations / T. V. Ryazantseva, L. I. Kravets, V. M. Elinson // Journal of Physics: Conference Series. – 2014. – № 1. – V. 516. – P. 12009.

81. Рапуано, К. Дж. Роговица / Дж. Р. Кристофер, Х. Ви-Джин. – М.: Геотар-Медия, 2010. – 320 с.

82. Копаева, В. Г. Глазные болезни. Основы офтальмологии / В. Г. Копаева; под ред. В. Г. Копаева. – М.: ОАО Медицина, 2012. – 560 с.

83. Босых, Е. О. Исследование возможности применения ядерных трековых мембран для офтальмологии / Е. О. Босых, В. В. Сохорева, В. Ф. Пичугин // Мембраны и мембранные технологии. – 2014. – Т. 4. – № 4. – С. 267- 271.

84. Патент 2594447 Российская Федерация, МПК51 С1, А61F 9/007. Способ лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы / Филиппова Е. О., Запускалов И. В., Кривошеина О. И.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. – № 2015131871/14; заявл. 30.07.2015; опубл. 20.08.2016, Бюл. – № 23 – С. 7.

85. Ferrández-Montero A. Development of biocompatible and fully bioabsorbable PLA/Mg films for tissue regeneration applications / A. Ferrández-Montero, M. Lieblisch, J. L. González-Carrasco, R. Benavente, V. Lorenzo, R. Detsch, B. Ferrari // Acta biomaterialia. – 2019. – V. 98. – P. 114-124.

86. Иванова, Н. М. Свойства тонких пленок на основе полимолочной кислоты после паровой стерилизации / Н. М. Иванова, Е. О. Филиппова, Д. А. Карпов, В. Ф. Пичугин // Перспективные материалы. – 2019. – Т. 9. – С. 42-52.

87. Ryazantseva, T. V. Plasma nanostructuring of the surface layer in track membranes for producing a highly efficacious biocompatible explantodrainage for the surgical management of refractory glaucoma / T. V. Ryazantseva, L. I. Kravets, V. M. Elinson // Inorganic Materials: Applied Research. – 2012. – V. 3. – № 5. – P. 408-416.

88. Khorasani, M. T. Plasma surface modification of poly (L-lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells adhesion / M. T. Khorasani, H. Mirzadeh, S. Irani // Radiation Physics and Chemistry. – 2008. – V. 77. – № 3. – P. 280-287.

89. Zhao, Y. Effects of gas atmospheres on poly (lactic acid) film in acrylic acid plasma treatment / Y. Zhao, A. Fina, A. Venturello, F. Geobaldo // Applied surface science. – 2013. – V. 283. – P. 181-187.

90. Мчедлишвили, Б. В. Физическая кристаллография / Б. В. Мчедлишвили, В. В. Березкин, В. А. Олейников // Кристаллография. – 1992. – Т. 51. – № 25. – С. 169.

91. Гольданский, В. И. О гидродинамическом эффекте при прохождении осколков деления через конденсированное вещество / В. И. Гольданский, Е. Я. Ланцбург, П. А. Ямпольский // Письма в ЖЭТФ. – 1975. – Т. 21. – № 12. – С. 365.
92. Каплан, И. Г. Специфика взаимодействия ионизирующего излучения с молекулярной средой и роль треков в радиационной химии / И. Г. Каплан, А. М. Митерев // Успехи химии. – 1986. – Т. 44. – № 5. – С. 713.
93. Fleischer, R. L. Nuclear tracks in solids: principles and applications / R. L. Fleischer, P. B. Price, R. M. Walker // Univ of California Press. – 1975. – P. 20.
94. 12. Апель, П. Ю. Треки ускоренных тяжелых ионов в полимерах: дис. ...д-ра хим.наук: 02.00.09 / Апель Павел Юрьевич. – М, 1998. – 163 с.
95. Гикал, Б. Н. Ускорительный комплекс ИЦ-100 для проведения научно-прикладных исследований / Б. Н. Гикал, С. Н. Дмитриев, Г. Г. Гульбекян, П. Ю. Апель, В. В. Башевой, С. Л. Богомолов, Н. Ю. Казаринов // Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2008. – Т. 5. – № 1. – С. 59-85.
96. Забаев, В. Н. Применение ускорителей в науке и промышленности / В. Н. Забаев. – Томск: Изд-во ТПУ, 2008. – 175 с.
97. Апель, П. Ю. Изучение процессов травления следов тяжелых заряженных частиц кондуктометрическим методом / П. Ю. Апель, С. П. Третьякова // Приборы и техника эксперимента. – 1980. – № 3. – С. 58-61.
98. Mashentseva, A. A. Calculation of bulk etch rate's semi-empirical for polymer track membranes in stationary and dynamic modes / A. A. Mashentseva, D. S. Orazbayeva, E. G. Gorin, A. Yu. Antonov, M. V. Zdorovets // Chemical Bulletin of Kazakh National University. – 2013. – № 1. – С. 70-76.
99. Hallab, N. J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion / N. J. Hallab, K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses, J. J. Jacobs // Tissue engineering. – 2001. – V. 7. – № 1. – P. 55-71.
100. ГОСТ 2789–73 Шероховатость поверхности. Параметры и характеристики. – М.: Стандартинформ, 2018. – 16 с.

101. ГОСТ 2.309-73 Обозначения шероховатости поверхностей. – М.: Стандартиформ, 2007. – 14 с.
102. ИСО Р 468 Шероховатость поверхности. Параметры, их значения и общие правила установления технических требований. – М.: Стандартиформ, 2018. – 5 с.
103. Емелина, А. Л. Дифференциальная сканирующая калориметрия / А. Л. Емелина. – М.: Лаборатория химического факультета МГУ, 2009. – 42 с.
104. Паниковровский, Т. Л. Об использовании дифференциальной сканирующей калориметрии для исследования структурных особенностей органических и неорганических соединений / Т. Л. Паниковровский, С. Н. Бритвин // РЦ РДМИ СПбГУ. – 2013. – С. 1-4.
105. Jamshidian, M. Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies / M. Jamshidian, E. Arab-Tehrany. M. Imran, M. Jacquot, S. Desobry // Comprehensive reviews in food science and food safety. – 2010. – V. 9. – № 5. – P. 552-571.
106. Kodal, M. The mechanical, thermal and morphological properties of γ -irradiated PLA/TAIC and PLA/OvPOSS / M. Kodal, A. A. Wis, G. Ozkoc // Radiation Physics and Chemistry. – 2018. – V. 153. – P. 214-225.
107. Чердынцев, В. В. Термическая устойчивость полимерных нанокомпозитов на основе сверхвысокомолекулярного полиэтилена и полисульфона / В. В. Чердынцев, А. А. Бойков // Наукоедение. – 2013. – № 4. – С.1-8.
108. Мельникова, Н. Б. Межфазная энергия на границе раздела «полимер жидкость» как критерий адгезионных свойств полиимидов / Н. Б. Мельникова, В. И. Игнатов, В. Д. Должикова, Б. Д. Сумм // Вестник московского университета. Серия. – 1998. – Т. 39. – № 6. – С. 413-417.
109. Kara, F. Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties / F. Kara, E. A. Aksoy, Z. Yuksekdog, N. Hasirci, S. Aksoy // Carbohydrate polymers. – 2014. – V. 112. – P. 39-47.

110. Кузнецов, В. Д. Поверхностная энергия твердых тел / В. Д. Кузнецов // Государственное издательство технико-теоретической литературы. – 1954. – С. 220.
111. Gonçalves, C. M. Optical properties / C.M. Gonçalves, J. O. A. Coutinho, I. M. Marrucho // Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications. – 2010. – P. 97-112.
112. Kim, Y. S. Real-Time Imaging of Crystallization in Polylactide Enantiomeric Monolayers at the Air – Water Interface / Y. S. Kim, C. M. Snively, Y. Liu, J. F. Rabolt, D. B. Chase // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – № 19. – P. 10791-10796.
113. Raman, C. V. The Optical Analogue of the Compton Effect / C. V. Raman, K. S. Krishnan // *Nature*. – 2008. – V. 121. – P.711.
114. Kun, L. Mesoporous TiO₂ Micro-Nanometer Composite Structure: Synthesis, Optoelectric Properties, and Photocatalytic Selectivity / L. Kun, Z. Lianjie, J. Tengfei, S. Youguang // *International Journal of Photoenergy*. – 2012. – P. 1-9.
115. Коваленко, А. А. Спектроскопия комбинационного рассеяния / А. А. Коваленко, А. А. Елисеев // Москва. – 2011. – С. 37.
116. Blanco-Pascual, N. Effect of different protein extracts from *Drosophila* muscle co-products on edible films development / N. Blanco-Pascual, F. Fernández, M. P. Martín Montero // *Food Hydrocolloids*. – 2013. – V. 33. – № 1. – P. 118-131.
117. ГОСТ 14236–81 Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1992. – 12 с.
118. ГОСТ 11262–80 Пластмассы. Метод испытания на растяжение. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1986. – 23 с.
119. Апель П. Ю. Определение диаметра пор в ядерных фильтрах методом пузырька / П. Ю. Апель, Т. И. Соболева, А. И. Соловьев // Деп. публ. ОИЯИ Б1-18-88-857, ОИЯИ, Дубна. – 1988. – С. 1-18.
120. ГОСТ Р ИСО 13781-2011 Смолы и отформованные элементы на основе поли(-лактида) для хирургических имплантатов. Исследование деградации методом *in vivo*. – М.: Стандартинформ, 2011. – 16 с.

121. Гольдберг, Е. Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов, В. В. Новицкий. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. – 272 с.
122. Куприенко, Н. В. Статистические методы изучения связей. Корреляционно-регрессионный анализ / Н. В. Куприенко, О. А. Пономарева, Д. В. Тихонов. – СПб: Изд политехнического ун-та, 2008. – 118 с.
123. Гайдышев, И. Анализ и обработка данных. Специальный справочник / И. Гайдышев. – СПб: Питер, 2001. – 753 с.
124. Zandén, C. Surface characterisation of oxygen plasma treated electrospun polyurethane fibres and their interaction with red blood cells / C. Zandén, M. Voinova, J. Gold, D. Mörsdorf, I. Bernhardt, J. Liu // *European Polymer Journal*. – 2012. – V. 48. – № 3. – P. 472-482.
125. Shafei, S. Short oxygen plasma treatment leading to long-term hydrophilicity of conductive PCL-PPy nanofiber scaffolds / S. Shafei, J. Foroughi, Z. Chen, C. S. Wong, M. Naebe // *Polymers*. – 2017. – V. 9. – № 11. – P. 614.
126. Vijayendran, B. R. Polymer polarity and surfactant adsorption / B. R. Vijayendran // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1979. – V. 23. – № 3. – P. 733-742.
127. Auras, R. A. Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications / R. A. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji. – John Wiley & Sons, 2011. – 528 p.
128. Kim, Y. S. Real-Time Imaging of Crystallization in Polylactide Enantiomeric Monolayers at the Air – Water Interface / Y. S. Kim, C. M. Snively, Y. Liu, J. F. Rabolt, D. B. Chase // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – № 19. – P. 10791-10796.
129. Козлов, П. М. Применение полимерных материалов в конструкциях, работающих под нагрузкой / П. М. Козлов. – Химия, 1966. – 362 с.
130. Брацыхин, Е. А. Технология пластических масс / Е. А. Брацыхин, Э. С. Шульгина. – Химия, 1982. – 328 с.

131. Williams, D. F. Biodeterioration/biodegradation of polymeric medical devices in situ / D. F. Williams, S. P. Zhong // International biodeterioration & biodegradation. – 1994. – V. 34. – № 2. – P. 95-130.

132. Karimi-Avargani, M. The special effect of the *Aspergillus flavus* and its enzymes on biological degradation of the intact polylactic acid (PLA) and PLA-Jute composite / M. Karimi-Avargani, F. Bazooyar, D. Biria, A. Zamani, M. Skrifvars // Polymer Degradation and Stability. – 2020. – V. 179. – P. 109295.

133. Труфанов, С. В. Дисфункция эндотелиального слоя роговицы: этиопатогенез и современные подходы к лечению / С. В. Труфанов, Е. П. Саловарова // РМЖ. Клиническая офтальмология. – 2019. – Т. 19. – № 2. – С. 116-119.

134. Chavan, V. Controlled development of pores in polyethylene terephthalate sheet by room temperature chemical etching method / V. Chavan, C. Agarwal, A. K. Pandey, J. P. Nair, P. Surendran, P. C. Kalsi, A. Goswami // Journal of membrane science. – 2014. – V. 471. – P. 185-191.

135. Tretyakova, S. A study of the registration properties of polyethylene-terephthalate / S. Tretyakova, P. Apel, L. Jolos, T. Mamonova, V. Shirkova // Solid State Nuclear Track Detectors. Pergamon. – 1980. – P. 283-289.

136. Apel, P. Track etching technique in membrane technology / P. Apel // Radiation Measurements. – 2001. – V. 34. – № 1-6. – P. 559-566.

137. Grasselli, M. Making porous membranes by chemical etching of heavy-ion tracks in β -PVDF films / M. Grasselli, N. Betz // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. – 2005. – V. 236. – № 1-4. – P. 501-507.

138. Ghanim, E. H. Etching Properties of Poly ethyleneterephthalate (PET) Melinex-E Nuclear Track Detectors (NTDs) / E. H. Ghanim, A. Hussein, H. M. El-Samman, S. P. Tretyakova // Radiation Physics and Protection Conference (RPCXI). – 2008. – P.323-332.

139. Lazea, A. Modification of polyester track membranes by plasma treatments / A. Lazea, L. I. Kravets, B. Albu, C. Ghica, G. Dinescu // *Surface and Coatings Technology*. – 2005. – V. 200. – № 1-4. – P. 529-533.

140. Eguizábal, A. Nanoporous PBI membranes by track etching for high temperature PEMs / A. Eguizábal, M. Sgroi, D. Pullini, E. Ferain, M. P. Pina // *Journal of Membrane Science*. – 2014. – V. 454. – P. 243-252.

141. Porfyrus, A. Accelerated ageing and hydrolytic stabilization of poly (lactic acid)(PLA) under humidity and temperature conditioning / A. Porfyrus, S. Vasilakos, C. Zotiadis, C. Papaspyrides, K. Moser, L. Van der Schueren, S. Vouyiouka // *Polymer Testing*. – 2018. – V. 68. – P. 315-332.

142. Korolkov, I. V. The effect of oxidizing agents/systems on the properties of track-etched PET membranes / I. V. Korolkov, A. A. Mashentseva, O. Güven, D. T. Niyazova, M. Barsbay, M. V. Zdorovets // *Polymer degradation and stability*. – 2014. – V. 107. – P. 150-157.

143. Виленский, А. И. Формирование пор трековых мембран в полимерах, облученных высокоэнергетичными частицами: автореф. дис. ...д-ра. хим. наук: 05.17.06 / Виленский Александр Исаакович. – М., 2005. – 44 с.

144. Митрофанов, А. В. Кинетика травления трековых мембран с высокой пористостью. – М.:ФИАН, 2003. – 48 с.

145. Косарев, С. А. Реакторные трековые мембраны. Структура и свойства / С. А. Косарев // *Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения*. – 2008. – Т. 8. – № 4. – С. 54-57.

146. Bacakova, L. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants / L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, V. Svorcik // *Biotechnology advances*. – 2011. – V. 29. – № 6. – P. 739-767.

147. Cassie, A. B. D. Wettability of porous surfaces / A. B. D. Cassie, S. Baxter // *Transactions of the Faraday Society*. – 1944. – V. 40. – P. 546-551.

148. Porfyrus, A. Accelerated ageing and hydrolytic stabilization of poly (lactic acid)(PLA) under humidity and temperature conditioning / A. Porfyrus, S. Vasilakos,

C. Zotiadis, C. Papaspyrides, K. Moser, L. Van der Schueren, S. Vouyiouka // Polymer Testing. – 2018. – V. 68. – P. 315-332.

149. Третьякова, С. П. Диэлектрические детекторы и их использование в экспериментальной ядерной физике / С. П. Третьякова // Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 1992. – Т. 23. – № 2. – С. 364.

150. Лосев, И. П. Химия синтетических полимеров / И. П. Лосев, Е. Б. Тростянская. – Изд-во "Химия", 1964. – 640 с.

151. Апель, П. Ю. Оптимизация формы пор трековых мембран / П. Ю. Апель, С. Н. Дмитриев // Критические технологии. Мембраны. – 2004. – № 3. – С. 32-37.

152. Chen, C. S. Geometric control of cell life and death / C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber // Science. – 1997. – V. 276. – P. 1425-1428.

153. Dalby, M. J. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nmhigh polymer demixed islands / M. J. Dalby, S. J. Yarwood, M. O. Riehle, H. J. Johnstone, S. Affrossman, A. S. Curtis // Exp Cell Res. – 2002. – V. 276. – P. 1-9.

154. Копаева, В.Г. Глазные болезни / В.Г. Копаева. – Издательство: Офтальмология, 2008. – 495 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А АКТ ВНЕДРЕНИЯ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИЯТШ ТПУ

/ О.Ю. Долматов

«__» _____ 2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Мы, нижеподписавшиеся, заведующий кафедрой - руководитель научно-образовательного центра Б.П. Вейнберга на правах кафедры, д.ф.-м.н., профессор В.П. Кривобоков, профессор научно-образовательного центра Б.П. Вейнберга, д.ф.- м.н., Г.А. Блейхер, доцент научно-образовательного центра Б.П. Вейнберга, к.ф. - м.н., С.И. Твердохлебов, подтверждаем, что результаты диссертационной работы Ивановой Нины Михайловны на тему «Получение трековой мембраны на основе полилактида для применения в кератопластике», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.11.17 – «Приборы, системы и изделия медицинского назначения», применяются по разделу «Использование ускорителей заряженных частиц в онкологии и для создания мембран» в учебном процессе Инженерной школы ядерных технологий, НОЦ Б.П. Вейнберга при изучении дисциплины «Плазменные технологии в биологии и медицине», преподаваемой студентам по специальности «14.03.02 Ядерные физика и технологии».

Заведующий кафедрой - руководитель

НОЦ Б.П. Вейнберга, д.ф. - м.н.

В.П. Кривобоков

Профессор НОЦ Б.П. Вейнберга, д.ф. - м.н.

Г.А. Блейхер

Доцент НОЦ Б.П. Вейнберга, к.ф. - м.н.

С.И. Твердохлебов

ПРИЛОЖЕНИЕ Б АКТ ВНЕДРЕНИЯ В НАУЧНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИЯТШ ТПУ

 / О.Ю. Долматов

« » 2021 г.

АКТ

О внедрении результатов диссертационной работы

Ивановой Нины Михайловны «Получение трековой мембраны на основе полилактида для применения в кератопластике», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.11.17 Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Настоящим актом подтверждается, что результаты диссертационной работы по формированию плёнок полимолочной кислоты и полилактида методом разлива для изготовления мембран для применения в офтальмологии, были использованы в период с 26.10.2018 г. по 15.11.2018 г. при выполнении научно-исследовательских работ по договору ГПХ № 21787 от 26.10.2018 по проекту ВИУ-НОЦ Б.П. Вейнберга-210/2018 «Разработка композитных биорезорбируемых материалов с цитостатическим и терапевтическим эффектами для лечения онкологических патологий» в рамках программы повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского политехнического университета за 2018 г.

Руководитель проекта:

доцент НОЦ Б.П. Вейнберга. к.ф.-м.н.

 — С.И. Твердохлебов