

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА ПРОБЛЕМ ХИМИЧЕСКОЙ
ФИЗИКИ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

БЕЛЯЕВА Анастасия Александровна

**МУЛЬТИСТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ
ПОЛИ(N-ИЗОПРОПИЛАКРИЛАМИДА) ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ
СКАФФОЛДОВ И АКТЮАТОРОВ**

1.4.7 - Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель

к.х.н. С.М. Морозова

Черноголовка 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Термочувствительность водных растворов ПНИПАМ	11
1.2 Методы получения гидрогелей из ПНИПАМ	15
1.2.1 Реологические свойства гелей.....	21
1.3 Применение мягких материалов на основе ПНИПАМ	30
1.3.1 Для оптики	31
1.3.2 Для биоэлектроники	34
1.3.3 Для биомедицины	36
1.3.4 Для создания актюаторов.....	45
1.4 Выводы по главе	56
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	57
2.1. Химические реактивы	57
2.2. Методы и оборудование.....	57
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	72
3.1 Физический гель на основе ПНИПАМ.....	72
3.1.1 Формирование и характеристика физического геля.....	72
3.1.2 Термочувствительное поведение и эффект рН.....	81
3.1.3 Реологические свойства геля	85
3.1.4 Биологические свойства физического геля	93
3.1.5 3D-печать	95
3.2 Гель на основе ПНИПАМ, привитого к нанокристаллической целлюлозе	98
3.2.1 Получение модифицированных наночастиц НКЦ.....	98
3.2.2 Термообратимое гелирование НКЦ-графт-ПНИПАМ.....	102
3.2.3 Реологические свойства	105
3.2.4 Биосовместимость гелей НКЦ-графт-ПНИПАМ	109
3.2.5 Цитотоксичность	113

3.2.6 Ингибирующая активность НКЦ-графт-ПНИПАМ / ПТК	114
3.3 Мультистимул-чувствительный однослойный актюатор	122
3.3.1 Формирование чернил и их характеристика	122
3.3.2 Реологические свойства чернил	129
3.3.3 Формирование однослойного актюатора	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	138
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	140
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Биосовместимые гидрогели, перспективные для 3D-печати и способные изменять свои свойства под воздействием внешних стимулов (температура, магнитное поле, pH и т. д.), представляют интерес для медицины в качестве имплантов и клеточных скаффолдов. Это становится актуальным, поскольку гидрогели схожи по механическим свойствам с биологическими тканями, что позволяет использовать их для различных задач биомедицины. Гидрогели на основе нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) вызывают интерес из-за их биосовместимости, механической прочности, фибриллярной структуры, а также возможности модификации поверхности наночастиц. Введение в гидрогели веществ, реагирующих на стимулы, приводит к получению «умных» материалов, которые перспективны для культивации клеток, доставки лекарств и перевязок ран. Поли(N-изопропилакриламид) (ПНИПАМ) является одним из наиболее распространенных материалов, водные растворы которого обладают термочувствительностью, связанной с изменением молекулярной конформации «клубок-глобула» выше нижней критической температуры растворения.

Цель исследования

Целью диссертационной работы является получение стимул-чувствительных клеточных скаффолдов и актюаторов с использованием методов экструзионной 3D-печати на основе биосовместимых компонентов, а именно, нанокристаллической целлюлозы и поли(N-изопропилакриламида).

Основные задачи исследования:

1. Построение диаграмм состояния водной коллоидной системы ПНИПАМ / НКЦ при комнатной температуре (25 °C) и постоянной температуре человеческого тела (37 °C).

2. Определить диапазоны массовой концентрации компонентов ПНИПАМ / НКЦ в водной коллоидной системе и их соотношений для получения физического геля с заданными механическими свойствами.
3. Оптимизировать соотношение ПНИПАМ / НКЦ и общую массовую концентрацию компонентов, чтобы получить физический гель, подходящий для экструзионной 3D-печати.
4. Синтезировать НКЦ с привитым ПНИПАМ методом псевдоживой полимеризации с обратимой передачи цепи (ОПЦ) с молекулярной массой 40 кДа и узким молекулярно-массовым распределением, к модифицированной алкиновыми группами НКЦ.
5. Определить диапазон массовой концентрации водной коллоидной системы НКЦ-графт-ПНИПАМ для образования термочувствительного тиксотропного геля при 37 °С, изучить реологические свойства, подобрать необходимую концентрацию для имитации механики разных отделов серого вещества мозга.
6. Оптимизировать состав чернил для 3D-печати на основе термочувствительного ПНИПАМ и магниточувствительного смешанного оксида железа Fe_3O_4 , для реакции достижения нескольких стимулов (температура и постоянный магнит). Подобрать условия печати, времени УФ-полимеризации и концентрацию компонентов.
7. Создать биосовместимый мультистимульный актюатор, способный имитировать движение растений за счет исходного рисунка (паттерна). Показать возможность получения различных форм (ролл, спираль, лепесток и захватчик) под действием температуры, а также перемещения актюатора под действием магнитного поля.

Научная новизна работы

Впервые изучена фазовая диаграмма состояния водной коллоидной системы на основе НКЦ и ПНИПАМ при 25 °С и 37 °С. На основании полученных диаграмм выделены области золя, геля и осадка. Были выбраны составы, образующие гель как при 25 °С, так и при 37 °С, и изучены их реологические свойства в зависимости от состава и температуры. Продемонстрирована их тиксотропность и возможность использования в экструзионной 3D-печати. Полученный материал демонстрирует необходимые физические свойства для биологических применений. Впервые показана возможность использования водной коллоидной системы НКЦ с привитым ПНИПАМ (НКЦ-графт-ПНИПАМ) для имитации механики серого вещества головного мозга. Продемонстрирована вариабельность механических свойств, фибриллярности и биосовместимости с первичными клетками мозга (астроцитами, эндотелиоцитами) в зависимости от массовой концентрации, а также возможность контролируемого релиза лекарственных средств. Впервые собран однослойный мультистимул-чувствительный актюатор, реагирующий одновременно на изменение температуры и на приложенное магнитное поле. Для этого было получено два вида чернил на основе ПНИПАМ и НКЦ: термо- и магниточувствительные. Полученный актюатор может имитировать различные виды движения растений, что может быть использовано в инвазивной хирургии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе работы, могут использоваться в различных направлениях биомедицины: для создания каркасов для выращивания клеток, моделей исследования релиза лекарственных средств, создания различных форм актюатора для использования в инвазивной микрохирургии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На основе физических взаимодействий водного раствора ПНИПАМ и водной коллоидной дисперсии НКЦ при вариации массовой концентрации от 8 масс. %, а также в соотношении компонентов от 0,5 до 2 получают термочувствительные фибриллярные гидрогели. Варьируя концентрации и соотношения, можно получить материалы с различными механическими и реологическими свойствами, использовать их в экструзионной 3D-печати и применять в биомедицине для создания платформ для выращивания клеток.

2. Показано, что коллоидная система с термочувствительным гелеобразованием на основе НКЦ, к которой привит ПНИПАМ, является жидкой при комнатной температуре и гелем при постоянной температуре человеческого тела (37 °C).

3. Полученная система проявляет нелинейные механические свойства, настраиваемый механический модуль в зависимости от массовой концентрации НКЦ-графт-ПНИПАМ. Такие характеристики можно настроить, чтобы имитировать механические свойства разных отделов головного мозга, поместив внутрь системы различные лекарственные препараты, можно добиться контролируемого релиза.

4. Благодаря биосовместимости с клетками эндотелия микрососудов головного мозга и астроцитами коры головного мозга (первичными клетками мозга) гель перспективен для применения в качестве имплантата участков мозга, удаленных хирургическим путем, а также для микрофлюидных моделей мозга на чипе, пригодных для эффективного скрининга кандидатов на лекарственные препараты и анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера при патогенезе физиологических состояний.

5. Разработаны два типа чернил для экструзионной 3D-печати, из которых был изготовлен однослойный мягкий актюатор с заданным распределением чернил, который реагировал на температуру и магнитное

поле. Термочувствительность чернил достигалась благодаря ПНИПАМ. Магнитные свойства чернил обусловлены наличием в составе биосовместимого магнетита Fe_3O_4 . Показана возможность получения различных форм (ролл, спираль, лепесток и захватчик), а также возможность перемещения актюатора под действием магнитного поля.

6. Мультистимульный актюатор, содержащий ПНИПАМ, при помещении в воду, нагретую до 40 °С, принимает запрограммированную за счет распределения компонентов форму и способен к перемещению за счет притяжения к постоянному магниту. Сочетание независимой реакции на стимулы и возможность программирования 3D-структуры актюатора делают его подходящим для производства медицинских устройств и инвазивных биомедицинских применений.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации

Основные результаты работы были представлены на XX Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» 4-10 июля 2024 г., п. Эльбрус, Россия; XXV Юбилейной Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера 20-24 мая 2024 г., г. Томск, Россия; XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists «MENDELEEV 2024» 2-6 сентября 2023 г., г. Санкт-Петербург, Россия; XVII Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения», 3-8 июля 2023, п. Эльбрус, Россия; XXIV Международная научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 15-19 мая 2023 г., Томск, Россия; Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023», 10-21 апреля 2023, Москва, Россия; Школа-конференция для молодых ученых «Самоорганизация в «мягких» средах: достижения и современное состояние»,

10–11 ноября 2022 г., ИНЭОС РАН, Москва; XVIII Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» 4-9 июля 2022 г. п. Эльбрус, Россия; XXIII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера. 16–19 мая 2022 г. Томск.

Публикации

Опубликовано 15 работ, в том числе 3 статьи, индексируемые в Web of Science и Scopus, а также 12 тезисов докладов в сборниках конференций различного уровня.

Статьи по теме диссертации:

1. Belyaeva A. A., Tretyakov, I. V., Kireynov, A. V., Nashchekina, Y. A., Solodilov, V. I., Korzhikova-Vlakh, E. G., Morozova, S. M. Fibrillar biocompatible colloidal gels based on cellulose nanocrystals and poly (N-isopropylacrylamide) for direct ink writing //Journal of Colloid and Interface Science. – 2023. – Т. 635. – С. 348-357. DOI: 10.1016/j.jcis.2022.12.106.
2. Belyaeva A. A., Eksakusto P. O., Morozova S. M. Thermally and magnetically responsive single layer bioinspired soft actuator with patterned structure obtained by direct ink writing //Materials Today Communications. – 2024. – Т. 39. – С. 108879. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2024.108879.
3. Belyaeva A. A., Averchuk, A. S., Rozanova, N. A., Alexandrova, O. P., Solomakha, O. A., Nashchekina, Y. A., Korzhikov-Vlakh V. A, Yurchenko S. O, Salmina A. B, Korzhikova-Vlakh E.G., Morozova, S. M. Thermosensitive injectable fibrillar gels based on cellulose nanocrystals grafted with poly (N-isopropylacrylamide) as biocompatible brain implants //Carbohydrate Polymers. – 2024. – С. 122596. DOI: 10.1016/j.carbpol.2024.122596.

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие в поиске и анализе литературы по теме исследования. Совместно с научным руководителем к.х.н. Морозовой С.М. были сформулированы задачи исследования, разработаны методики проведения экспериментов. Результаты получены автором или при его непосредственном участии. Автором были выполнен синтез поли(N-изопропилакриламида) различной молекулярной массы и магнетита, модификация нанокристаллической целлюлозы, прививка полимера к наночастицам, построение фазовых диаграмм от массовых концентраций, соотношений и температуры. Самостоятельно проведена съемка и обработка результатов реологических экспериментов, измерение размеров частиц методом динамического рассеяния света, а также анализ размеров частиц по изображениям сканирующей электронной и просвечивающей электронной микроскопии. Нанотомография была выполнена к.т.н. Кирейновым А.В. (МГТУ им. Баумана). Исследование цитотоксичности веществ было выполнено к.х.н. Коржиковой-Влах Е.Г., Соломаха О.А. (ИВС РАН) и к.б.н. Нащекиной Ю.А. (ИЦ РАН). Исследование релиза лекарственного средства было выполнено к.х.н. Коржиковым-Влах В.А. (СПбГУ Институт Химии). Выделение, культивирование и эксперименты на первичных клетках серого вещества мозга мышей было выполнено к.б.н. Александровой О.П., к.б.н. Аверчуком А.С. (Российский центр неврологии и нейронаук). Измерение магнитных свойств, съемка изображений сканирующей и просвечивающей микроскопии было выполнено в Ресурсном центре СПбГУ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с изложением и обсуждением результатов собственных исследований, заключения, списка литературы и списка сокращений. Диссертация изложена на 166 страницах, иллюстрирована 5 таблицами и 73 рисунками. Список литературы включает 257 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Термочувствительность водных растворов ПНИПАМ

Поли(N-изопропилакриламид) (ПНИПАМ, рисунок 1а) в последние десятилетия привлекает к себе большое внимание благодаря своим термочувствительным свойствам в водных растворах. Этот полимер обладает низшей критической температурой растворения (НКТР) в водных средах и выпадает в осадок при повышении температуры [1,2] (рисунок 1б). Температура НКТР при которой он переходит из растворимого состояния в нерастворимое, известна также как точка помутнения и составляет 32 °С [3]. Первое исследование, посвященное описанию фазовой диаграммы водных растворов ПНИПАМ, было опубликовано в 1968 году [2]. С тех пор он известен как термочувствительный или «умный» полимер в водных растворах, чувствительный к изменению температуры [4].

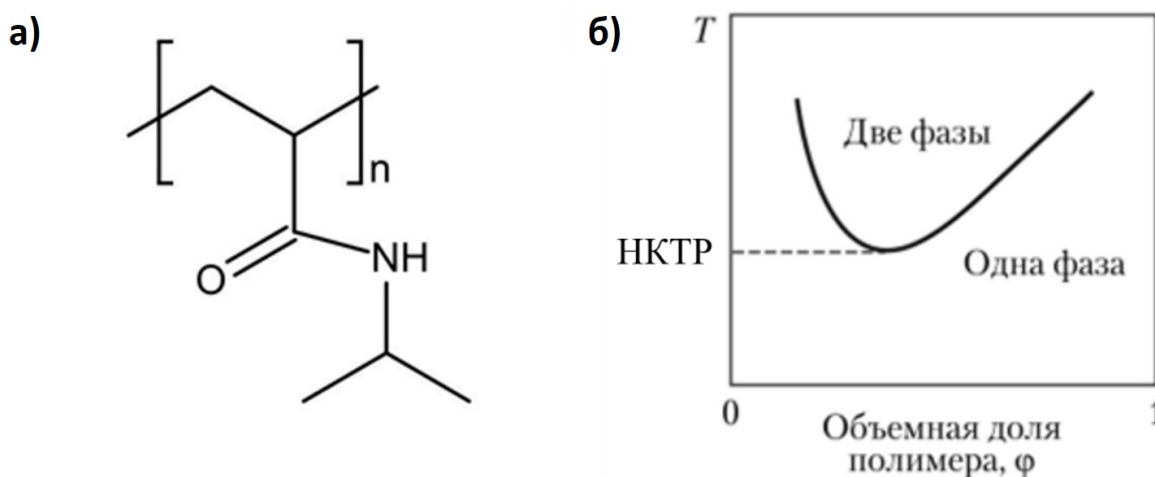


Рисунок 1 – (а) Структурная формула поли(N-изопропилакриламида),
(б) диаграммы фазового равновесия полимера с НКТР в водном растворе

В точке помутнения ПНИПАМ демонстрирует объемный фазовый переход из гидратированного состояния, называемого гидрофильным состоянием с расширенной структурой (клубок), в сжатое дегидратированное состояние, называемое сжатой структурой (глобула) (рисунок 2) [5–7].

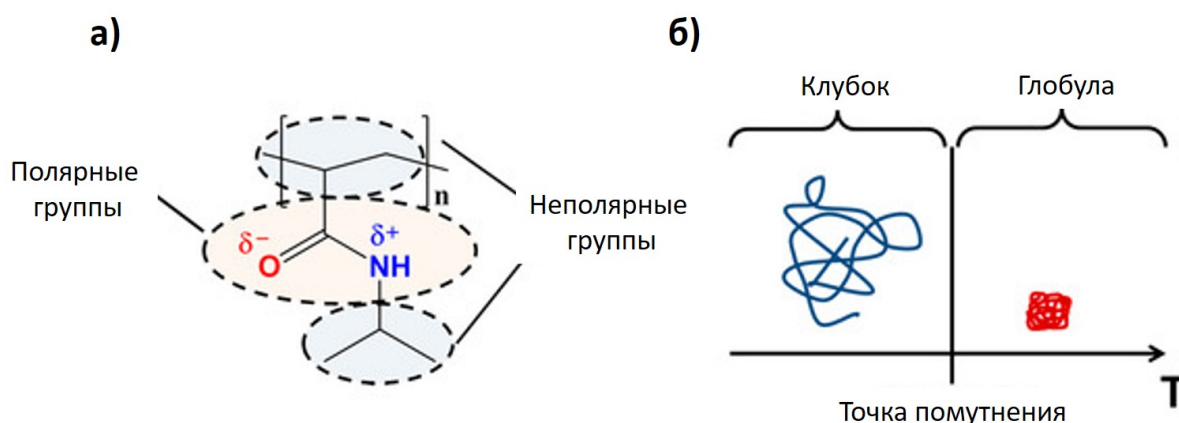


Рисунок 2 - (а) Полярность групп ПНИПАМ, (б) объемный фазовый переход между конформациями: клубок (слева) и глобула (справа) [8]

ПНИПАМ в несшитой форме при низких температурах образует гомогенный раствор при растворении в воде, но при повышении температуры образуются два отдельных водных слоя с различной концентрацией полимера [9]. Наличие гидрофильных и гидрофобных групп внутри нейтрального полимера отвечает за это обратимое золь-гель поведение гомополимера ПНИПАМ в водных растворах.

Когда полимер растворяется в воде, могут иметь место три типа взаимодействий: между макромолекулами полимера, полимерными цепями и молекулами воды, а также только между молекулами воды [10]. В гидратированном состоянии ниже НКТР молекулы воды образуют водородные связи между карбонилем и атомом азота амидной группы (рисунок 3а) [11].

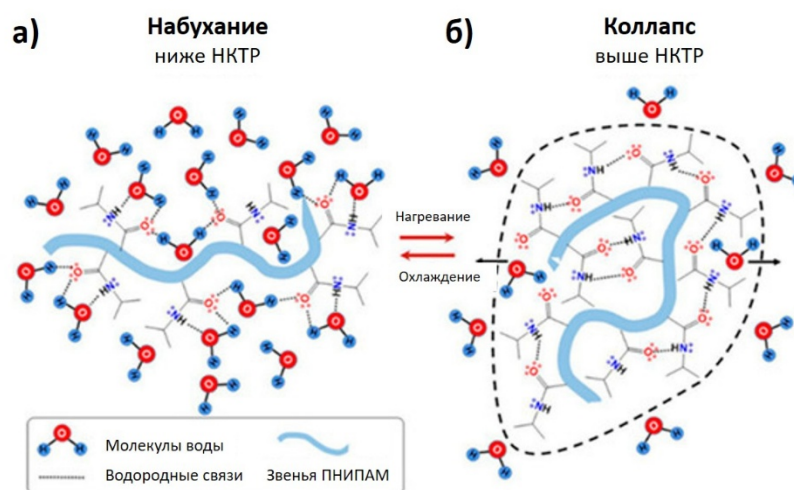


Рисунок 3 - Схематическое изображение конформаций и взаимодействий цепей ПНИПАМ: (а) набухание и (б) коллапс [11]

Выше НКТР внутримолекулярные водородные связи перестраиваются, уменьшая количество водородных связей между молекулами ПНИПАМ и водой, что приводит к образованию внутрицепочечных водородных связей (рисунок 3б). Компьютерное моделирование подтвердило [12] что помимо уменьшения межмолекулярных водородных связей, происходит значительное уменьшение площади поверхности, доступной растворителю.

Обратимость гидрофильных / гидрофобных состояний происходит при изменении температуры ниже или выше значения НКТР (32 °С) [8]. НКТР зависит от критической концентрации полимера и его молекулярной массы [13,14]. При определенной критической концентрации полимера сольватированные молекулы ПНИПАМ становятся нерастворимыми в воде при нагревании выше НКТР. НКТР в основном зависит от водородных связей между молекулами воды и структурой функциональных мономерных звеньев полимера ПНИПАМ; а именно связей N–H и C=O [15–18]. Варьируя состав (получая смеси или сополимеры ПНИПАМ), можно контролировать температуру перехода: включение гидрофильных единиц обычно увеличивает температуру перехода, тогда как добавление гидрофобных единиц оказывает противоположный эффект.

Значение НКТР, определенное при низкой концентрации полимера, принимается за температуру объемно-фазового перехода (ТОФП) гидрогеля [19,20]. Более того, сшитые гидрогели в набухшем состоянии можно рассматривать как концентрированный раствор полимера, связанный с количеством воды, удерживаемой гидрогелем [21]. Гидрогели ПНИПАМ претерпевают обратимые фазовые переходы при изменении температуры, увеличиваясь в объёме до 1000 раз во время перехода [22].

Температуру фазового перехода и степень набухания / усадки в гидрогелях на основе ПНИПАМ можно настраивать через сополимеризацию с гидрофильными или гидрофобными мономерами [23,24]. «Умные» гидрогели на основе ПНИПАМ, синтезированные путем сшивания ПНИПАМ или его производных, демонстрируют резкий и обратимый объемный фазовый переход через набухание / усадку вблизи НКТР [9,25,26]. Кроме изменения размера при объемном фазовом переходе, этот процесс сопровождается изменением многих других свойств, таких как гидрофильность [27,28], прозрачность [29,30] и кажущаяся диэлектрическая проницаемость [31].

Таким образом, ПНИПАМ является перспективным термочувствительным полимером для применения в биомедицине и фармацевтики из-за его более низкой критической температуры растворения в водных средах, отличающейся от большинства полимеров, и составляющей 32 °С, что близко к физиологической температуре (37 °С). Этот переход обратим, и ПНИПАМ снова растворяется, когда температура падает ниже его НКТР [3]. НКТР водных растворов ПНИПАМ и температура объемного фазового перехода гидрогелей ПНИПАМ можно контролировать изменением условий, окружающих полимерные цепи, таких как концентрация растворителя [32], ионная сила [33], молекулярная масса полимера и его структура.

1.2 Методы получения гидрогелей из ПНИПАМ

Гидрогели в последнее время приобрели значительный интерес из-за своих уникальных свойств, включая высокое содержание воды, мягкость, гибкость и биосовместимость [34]. Они представляют собой полимерные сети, образованные посредством химического или физического связывания водорастворимых полимеров [35,36]. Обратимые или физические гели удерживаются нековалентными связями или взаимодействиями между полимерными цепями, в то время как постоянные или химические гидрогели образуются посредством химического ковалентного сшивания [37,38]. Термочувствительное поведение систем на основе ПНИПАМ, в частности НКТР, можно легко отрегулировать, изменив баланс между гидрофобными и гидрофильными компонентами. Было показано, что плотность прививки влияет на термочувствительные свойства полимеров. ПНИПАМ является наиболее изученным полимером в отношении эффектов его прививки к другим материалам, поскольку он претерпевает конформационное изменение выше своего НКТР.

Получение гидрогелей с различными функциональными свойствами можно осуществить с помощью физического и химического сшивания (рисунок 4) [39].

гидрогель ПНИПАМ / поли(акрилат натрия) [46], гидрогель метакрилоилхитозан / ПНИПАМ [47].

Другой метод физического сшивания включает использование динамического взаимодействия водородных связей, которое часто нестабильно в водной среде, но может восстанавливаться после разрыва. Такой подход может улучшить самовосстановление, клеточную биосовместимость и биоразлагаемость конечного материала. В исследованиях сообщают о препаратах на основе гидрогеля ПНИПАМ для биомедицинского применения, например, гидрогель ПНИПАМ / хитозан / поливиниловый спирт (ПВС) [48], гидрогель ПНИПАМ / диальдегиддекстрина с гидразидом [49], где гидрогель образуется посредством динамического механизма водородных связей.

Гидрофильные полимеры с гидрофобными концевыми группами / боковыми цепями / мономерами могут быть связаны посредством физического сшивания, что приводит к высокой механической прочности за счет сильного гидрофобного взаимодействия [44]. Например, исследователями был получен гидрогель полиакриловой кислоты / ПНИПАМ [50] с высокой механической прочностью, подходящей для таргетной доставки лекарственных средств.

1.2.2 Гидрогели с взаимопроникающей полимерной сеткой

Взаимопроникающие полимерные сетки (ВПС) представляют собой тип полимерного материала, состоящего из двух или более полимерных сеток, которые физически переплетены на молекулярном уровне, но не связаны друг с другом ковалентно [51]. Эти сетки переплетены, но сохраняют свою различную химическую идентичность. Уникальная структура ВПС обеспечивает комбинацию свойств из составляющих полимеров, что часто приводит к улучшенным механическим, термическим и химическим характеристикам. Полу-ВПС (ПВПС) изготавливается аналогично ВПС, где

только одна из полимерных сетей является сшитой, в то время как другая остается линейным или разветвленным полимером.

Подход ВПС позволяет синтезировать множество мультичувствительных гидрогелей путем объединения односетевых гидрогелей, реагирующих на различные стимулы, например, температура и pH. ПНИПАМ часто образует термочувствительные сети в мультичувствительных ВПС [3,52]. Он сочетается с анионными полимерами, чувствительными к pH, такими как полиакриловая кислота [53], полиаспарагиновая кислота [54] (рисунок 5) или гиалуроновая кислота [55], демонстрируя переход «клубок-глобула» ниже НКТР и при более высоких уровнях pH.

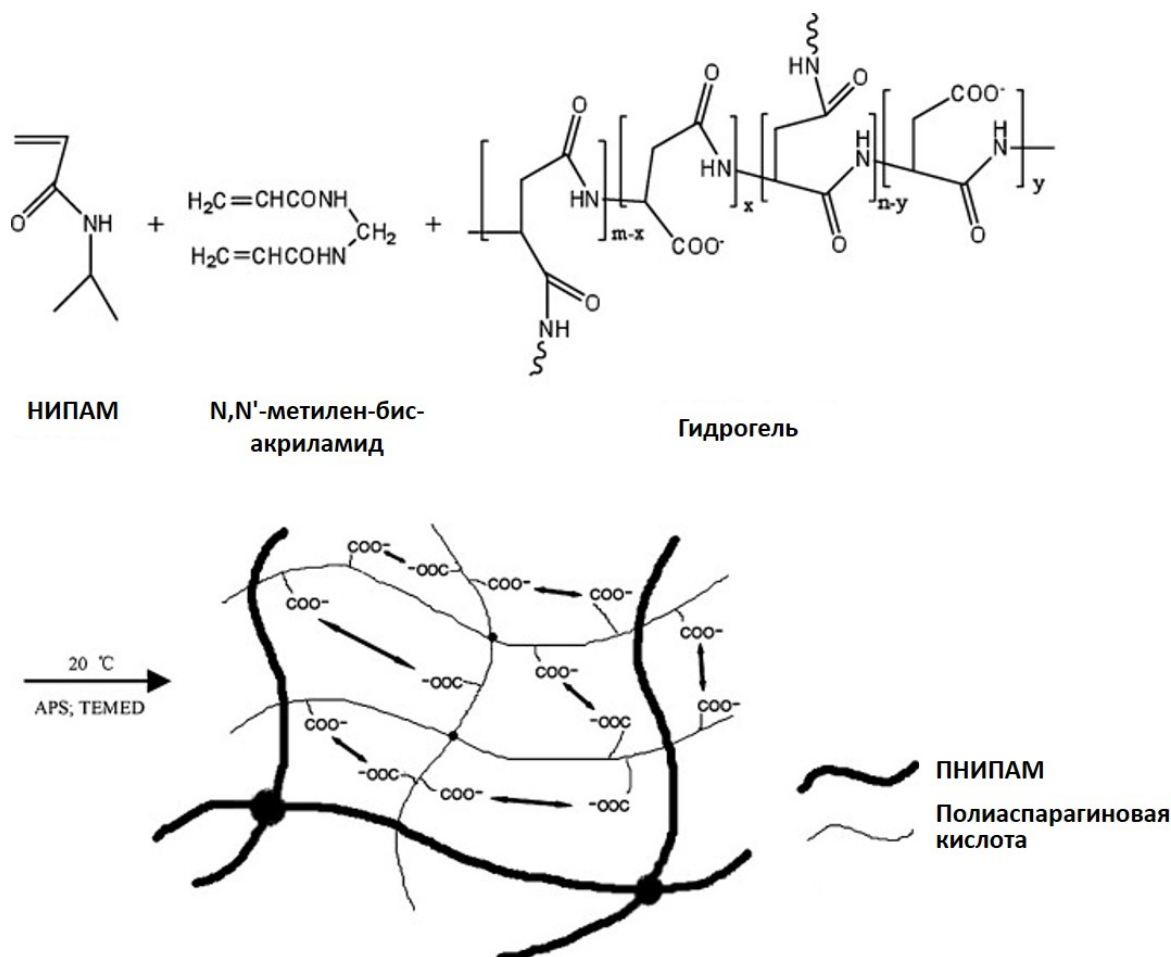


Рисунок 5 - Синтез гидрогеля ВПС на основе ПНИПАМ / полиаспарагиновой кислоты и электростатическое отталкивание внутри ВПС [56]

С синтетической точки зрения ВПС могут иметь две различные последовательности синтеза: (1) одновременные ВПС, где обе полимерные сетки синтезируются одновременно посредством процессов полимеризации, которые происходят в одно и то же время, или (2) последовательные ВПС, где сначала синтезируется одна полимерная сетка, а затем вторая сетка формируется в пределах уже существующей. Этот процесс обычно включает в себя погружение односетчатых гидрогелей в раствор, содержащий мономеры, инициаторы и активаторы, и, опционально, сшивающий агент (рисунок 6) [57].

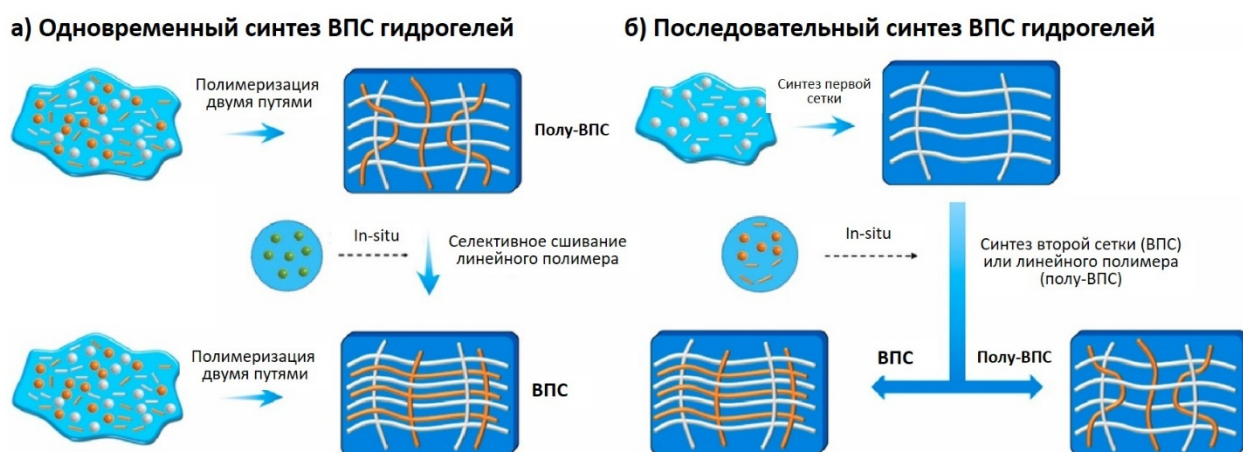


Рисунок 6 - Методы получения ВПС [57]

Когда температура поднимается выше ТОФП, возникают гидрофобные взаимодействия между полимерными цепями, что приводит к разрушению трехмерной структуры гидрогеля и вытеснению почти всей содержащейся воды. На поверхности гидрогеля образуется плотный слой из-за разделения фаз. Этот слой значительно затрудняет внешнюю диффузию молекул воды. В результате кинетика сжатия типичных гидрогелей ПНИПАМ относительно медленная, что ограничивает их полезность в областях с требованиями к быстрому времени отклика [58,59].

Для получения гидрогелей с улучшенными механическими свойствами, высокой термической чувствительностью, исследователи предлагают

добавлять к гидрогелю ПНИПАМ второй полимер для создания структуры ВПС [60]. Этот метод регулирует температуру фазового перехода до температуры тела и увеличивает плотность полимера, улучшая механические свойства.

Часто для получения анизотропии в полимерных структурах используется двухслойная конструкция гидрогелей, реагирующих на стимулы. Эта конструкция состоит из инертного поддерживающего и набухающего слоя, реагирующего на стимулы, что приводит к неравномерному анизотропному расширению и изменению формы при внешнем стимуле. Например, Лю и др. создали двухслойную структуру с гидрогелем ВПС ПНИПАМ/полиакриламид (ПАМ) на субстрате ПАМ для имитации искусственной радужки человеческого глаза. Эта двухслойная структура демонстрирует обратимое изменение внутреннего и внешнего диаметра гидрогеля при освещении ближним инфракрасным светом, аналогично реакции радужной оболочки глаза человека на изменения света [61].

1.2.3 Химическая сшивка

Существуют различные механизмы химического ковалентного сшивания, например, свободнорадикальная полимеризация, ферментативная реакция и т. д., в которых гидрогель образуется благодаря ковалентным связям [62]. Ковалентные сшивки могут иметь следующую химическую природу: присоединение по Михаэлю [63], реакция Дильса-Альдера [64], которые являются зелеными методами синтеза, что способствует улучшению биоразлагаемости, прозрачности и адгезии получаемой гидрогелевой системы [44,65]. Свободнорадикальная полимеризация может быть проведена с помощью нагревания, ультрафиолетового излучения, электролиза и т.д., что позволяет получить гидрогели с улучшенными свойствами (набухание, пористость и механическая прочность) [65]. Исследователи использовали

свободнорадикальную полимеризацию для приготовления гидрогеля на основе ПНИПАМ для улучшения механической прочности и стабильности, например, для получения гидрогеля на основе наночастиц магнетита и ПНИПАМ [66], гидрогеля ПНИПАМ, который включает люминесцентные комплексы лантаноидов [67], гидрогеля ПНИПАМ, включающего нанокластеры золота [68].

1.2.1 Реологические свойства гелей

3D-печать — это процесс аддитивного производства, в котором 3D-конструкция создается слой за слоем. Экструзионная (выдавливанием) печать гидрогелями вызывают интерес в различных областях, таких как пероральная и местная доставка лекарств, тканевая инженерия, регенеративная медицина и биологическая терапия при комнатной температуре с использованием широкого спектра полимеров [69–77]. Также этот метод позволяет создавать сложные трехмерные структуры слой за слоем, которые идеально имитируют натуральные ткани (например, биоматериалы для трансплантации и регенерации тканей), что способствует успешной интеграции имплантатов в организм пациента и снижает риск отторжения. Причем слои могут состоять из разных полимеров [78,79].

Изучение реологических свойств гидрогелей имеет решающее значение для их использования в экструзионной 3D-печати, поскольку эти характеристики влияют на поведение материала под воздействием различных внешних факторов [80]. Реология оценивает отклик материалов на деформацию для достижения оптимального текучего состояния во время нанесения слоев [81]. Понимание реологических характеристик помогает достичь необходимой вязкости и текучести, что, в свою очередь позволяет оптимизировать печатный процесс. Это особенно актуально для полимерных гидрогелей, учитывая разнообразие их составов и значительные различия в поведении. Корректная настройка реологических параметров обеспечивает

точность печати, сохраняет форму и предотвращает образование дефектов, таких как усадка или деформация готовых изделий [82].

Тем не менее, экструзионная печать гидрогелями – сложная задача, поскольку гидрогель в основном состоит из воды [77], что может препятствовать достижению адекватной точности печати и сохранению формы при осаждении. Кроме того, вязкоупругие свойства гидрогелей могут затруднять печать высоких структур (более 1 см) или сложных структур с четко определенными углами, включая скругления [79]. В результате большинство полимерных гидрогелевых чернил не являются самоподдерживающимися и имеют тенденцию к существенному разрушению или растеканию после печати из-за гравитационных сил (что приводит к общей потере структуры из-за сжатия) и поверхностного натяжения [79,83]. Поэтому гидрогели часто не могут сохранять свою трехмерную форму [84], и могут потребоваться вторичные вмешательства для гелеобразования гидрогелевых чернил с использованием физического, ионного или радиационного сшивания [79,85,86]. Таким образом, исследование реологических свойств материалов позволяет настраивать параметры печати, обеспечивая стабильную экструзию и высокую скорость работы принтера. Это помогает избежать таких проблем, как засоры сопла или нестабильный поток материала.

В процессе печати чернила изначально находятся в состоянии покоя без текучести внутри шприца или картриджа для выдавливания, а при приложении сил они переходят в состояние, выдерживающее деформацию и текучесть в условиях высокого сдвига при движении через стенки сопла. Впоследствии они приобретают новую форму, пока, наконец, не вернуться в новое состояние покоя (рисунок 7) [87,88]. Основными реологическими свойствами, которые связаны с этими переходами, являются вязкость, вязкоупругие модули сдвига, поведение восстановления вязкости и напряжение сдвига, которые могут быть связаны с характеристиками чернил

до (покой и начало течения), во время (текучесть - экструдирруемость) и после печати (точность печати, точность формы и адгезивность) [87,89].

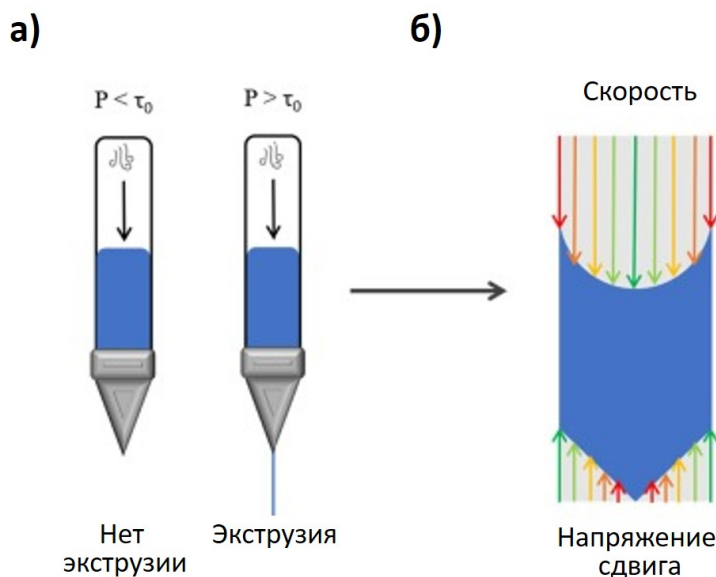


Рисунок 7 – (а) Сила, вызывающая экструзию, должна быть больше предела текучести материала, чтобы противодействовать сопротивлению движению, (б) скорость чернил увеличивается в центре сопла и уменьшается вблизи стенки сопла. Напротив, напряжение сдвига больше рядом со стенками сопла и меньше вблизи центра [90]

Поведение потока. Ньютоновские жидкости обладают линейной зависимостью между реологическими параметрами напряжения сдвига и скорости сдвига, в то время как жидкости, демонстрирующие отклонения от этой линейности, описываются как неньютоновские. Их можно дополнительно классифицировать на независимые от времени (например, разжижающие и загустевающие при сдвиге) или жидкости, зависящие от времени (например, тиксотропные и антитиксотропные) (рисунок 8) [87,91,92].

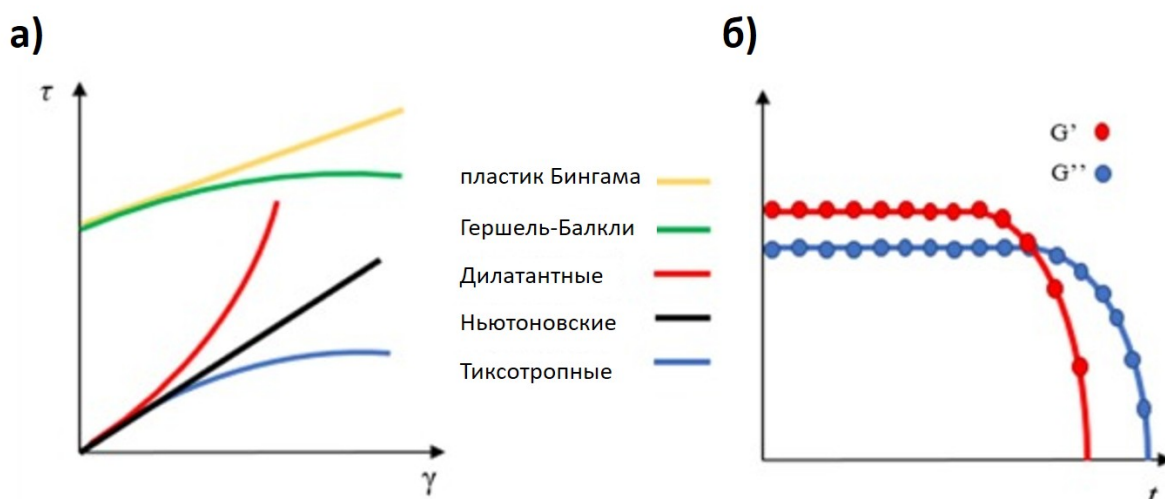


Рисунок 8 – Поведение потока: (а) соотношение между напряжением сдвига и скоростью сдвига в различных материалах, где наклон функции - вязкость.

Материалы можно классифицировать на основе полученного профиля кривой, (б) тест с колебательной частотой с контролируемой деформацией сдвига, показывающий точку пересечения, представляющую фазу перехода
золь-гель

Поведение ньютоновских жидкостей можно описать с помощью закона Ньютона [93,94]:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

где τ - напряжение сдвига (Па), η - вязкость (Па·с), а $\dot{\gamma}$ - скорость сдвига (с⁻¹).

Поведение неньютоновских жидкостей можно описать с помощью модели степенной вязкости, предложенной Оствальдом в 1925 году [55,56]:

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

где K - индекс консистенции (Па·сⁿ), а n - индекс текучести (безразмерный).

В зависимости от значения n можно выделить различные области:
1) $n < 1$: разжижение при сдвиге; 2) $n = 1$: ньютоновская; 3) $n > 1$: загустевание при сдвиге.

Идеальные чернила должны обладать двумя свойствами: 1) они должны демонстрировать свойство разжижения при сдвиге при приложении деформирующей силы, и 2) их вязкость должна быстро увеличиваться после

снятия силы, чтобы гарантировать высокую точность формы и печати [89,95]. Большинство чернил, используемых для 3D-печати (например, термочувствительные гидрогели, частично сшитые гидрогели и коллоидные суспензии), можно классифицировать как неньютоновские системы со свойствами истончения при сдвиге, вязкость которых уменьшается с увеличением напряжения сдвига.

Вязкость. Вязкость можно определить как сопротивление жидкости течению во время приложения напряжения, и она является основным фактором, влияющим на экструдированность, точность печати и точность формы. На практике вязкость определяется как отношение напряжения сдвига к скорости сдвига. На вязкость гидрогелевых чернил влияют: температура, концентрация полимера (рисунок 9), молекулярные взаимодействия, и молекулярный вес полимера [87].

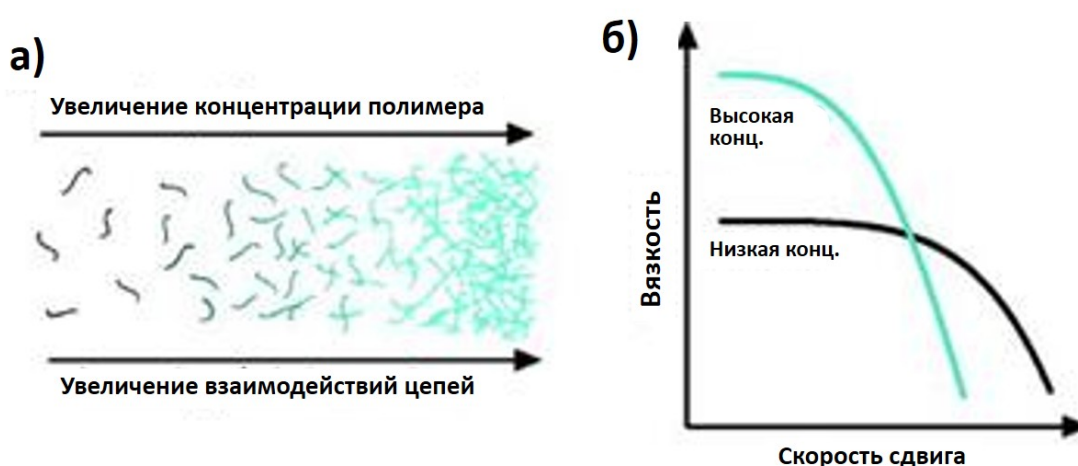


Рисунок 9 - Влияние концентрации полимера на (а) взаимодействие цепей и (б) вязкость по отношению к скорости сдвига [91]

Обычно чернила с более высокой вязкостью обеспечивают более высокую точность печати и могут легче сохранять форму после экструзии. Однако увеличение вязкости требует увеличения напряжения сдвига при экструзии, что также может влиять на форму конечного материала. Чтобы избежать необходимости увеличения напряжения сдвига экструзии, можно также контролировать экструдированность, используя различные геометрии или

размеры сопел у 3D-принтера или регулируя параметры печати. Гидрогелевые чернила с низкой вязкостью могут минимизировать засорение сопел во время печати, но могут привести к плохой точности печати и сохранению формы [96].

Предел текучести. Предел текучести указывает на предел упругого поведения, соответствующий минимальному напряжению, необходимому для возникновения потока, и может быть измерен с помощью испытаний на сдвиговое напряжение. Идеальными чернилами являются те, у которых предел текучести сопровождается высоким эффектом сдвига, поэтому они соответствуют уравнению Гершеля-Балкли [89,92,94,97]. Некоторые авторы предполагают, что предел текучести можно считать важным параметром для вывода о точности печати и качестве формы, и он также может служить косвенным указанием на способность чернил поддерживать последующие уложенные слои [89]. Кук и др. [92] подчеркнули, что определение предела текучести чернил может быть полезным для предположения необходимого давления для экструзии. Однако Аморим и др. [89] подчеркнули, что эффект предела текучести сам по себе не является индикатором хорошей пригодности для печати, поскольку для вывода этой величины необходимо проанализировать другие параметры.

Тиксотропность. Также можно провести трехинтервальный тест тиксотропии для исследования поведения восстановления вязкости 3D-печатной структуры и времени, необходимого для этого. Этот тест измеряет вязкость в 3 интервалах сдвига: 1) интервал низкого сдвига (до значения скорости сдвига 1 с^{-1}) для проверки вязкости чернил перед печатью; 2) интервал высокого сдвига для моделирования напряжения внутри стенок сопла; и 3) интервал низкого сдвига для мониторинга способности к восстановлению вязкости [89,91,98,99] (рисунок 10).



Рисунок 10 - Печатные материалы должны восстанавливать свое вязкоупругое поведение при деформации, вызванной напряжением сдвига, чтобы производить 3D-конструкции с надлежащей точностью формы [90]

Однако как подчеркивается [89], измерение поведения восстановления с помощью колебательных испытаний (модуль накопления сдвига в зависимости от времени) может быть более полезным, чем вращательные испытания, поскольку колебательные испытания интегрируют модуль упругости, который играет не менее важную роль в этом процессе.

Таким образом, чтобы чернила подходили для экструзионной 3D-печати, они должны обладать следующими свойствами:

- Вязкость - гидрогели должны обладать оптимальной вязкостью для экструзии через сопло 3D-принтера. Слишком высокая вязкость может затруднить подачу материала, а слишком низкая - привести к неконтролируемому вытеканию. Идеальная вязкость должна обеспечивать легкую экструзию при высокой скорости сдвига и стабильную форму после экструзии.
- Обратимость деформации – чернила должны иметь возможность восстанавливаться после деформации. Это означает, что после экструзии материал должен сохранять заданную форму и не терять своих структурных характеристик, что важно для создания точных и стабильных изделий.

- Сдвиговая зависимость (тиксотропия) - важно, чтобы гидрогели демонстрировали сдвиговую зависимость вязкости, позволяющую им становиться более текучими при экструзии, но при этом сохранять высокую вязкость в состоянии покоя. Это способствует предотвращению оседания и деформации напечатанных объектов.

- Температурная устойчивость - изменение температуры может повлиять на реологические свойства гидрогелей. Они должны сохранять свои характеристики в диапазоне температур, используемых во время печати и после нее. Это особенно важно для процессов, включающих термообработку или последующую сшивку.

- Скорость сдвига - гидрогели должны быстро реагировать на изменения скорости сдвига, т.е. они должны эффективно утрачивать вязкость, иначе подача и экструзия могут стать трудными.

- Устойчивость во времени - время жизни гидрогелей до затвердевания также важно. После смешивания или подготовки материала он должен оставаться экструзируемым в течение определенного времени, чтобы сохранить удобство обработки.

Основные реологические испытания включают измерение вязкости от скорости сдвига, измерение вязкости от напряжения, измерение модулей от колебательного изменения напряжения (амплитудное изменение), измерение модулей при изменении частоты, изменение скорости сдвига, изменение колебательной деформации, вращательная температурная развертка (рисунок 11).

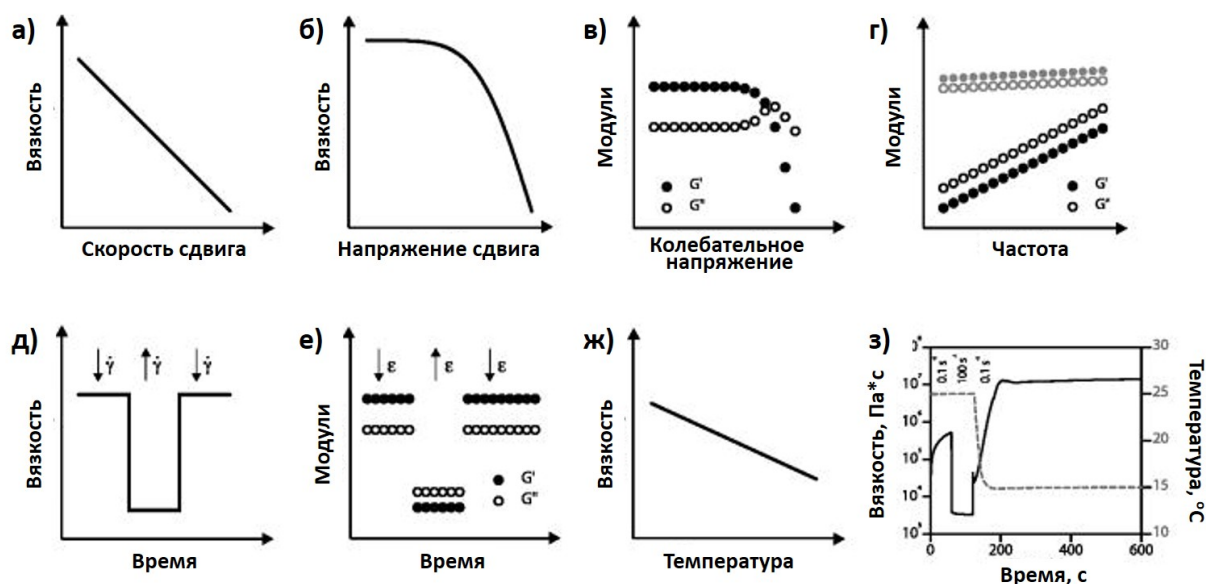


Рисунок 11 - Обычные реологические тесты для чернил. (а) Изменение скорости сдвига, (б) изменение напряжения, (в) колебательное изменение напряжения (амплитудное изменение), (г) изменение частоты материалов с различным поведением: твердообразные гели (серые) и вязкоупругие жидкости (черные), (д) вращательная тиксотропия (изменение скорости сдвига, (е) колебательная тиксотропия (изменение колебательной деформации), (ж) вращательная температурная развертка и (з) пример теста тиксотропии для моделирования экструзии желатино-альгинатных биочернил [91]

1.3 Применение мягких материалов на основе ПНИПАМ

В настоящее время обширный исследовательский интерес к умным гидрогелям на основе ПНИПАМ вызван их свойствами и функциями. Свойства, проявляемые этим полимером, могут быть использованы в различных областях, например, электронике, оптике, биомедицине, доставке лекарств и в различных сенсорах (рисунок 12).

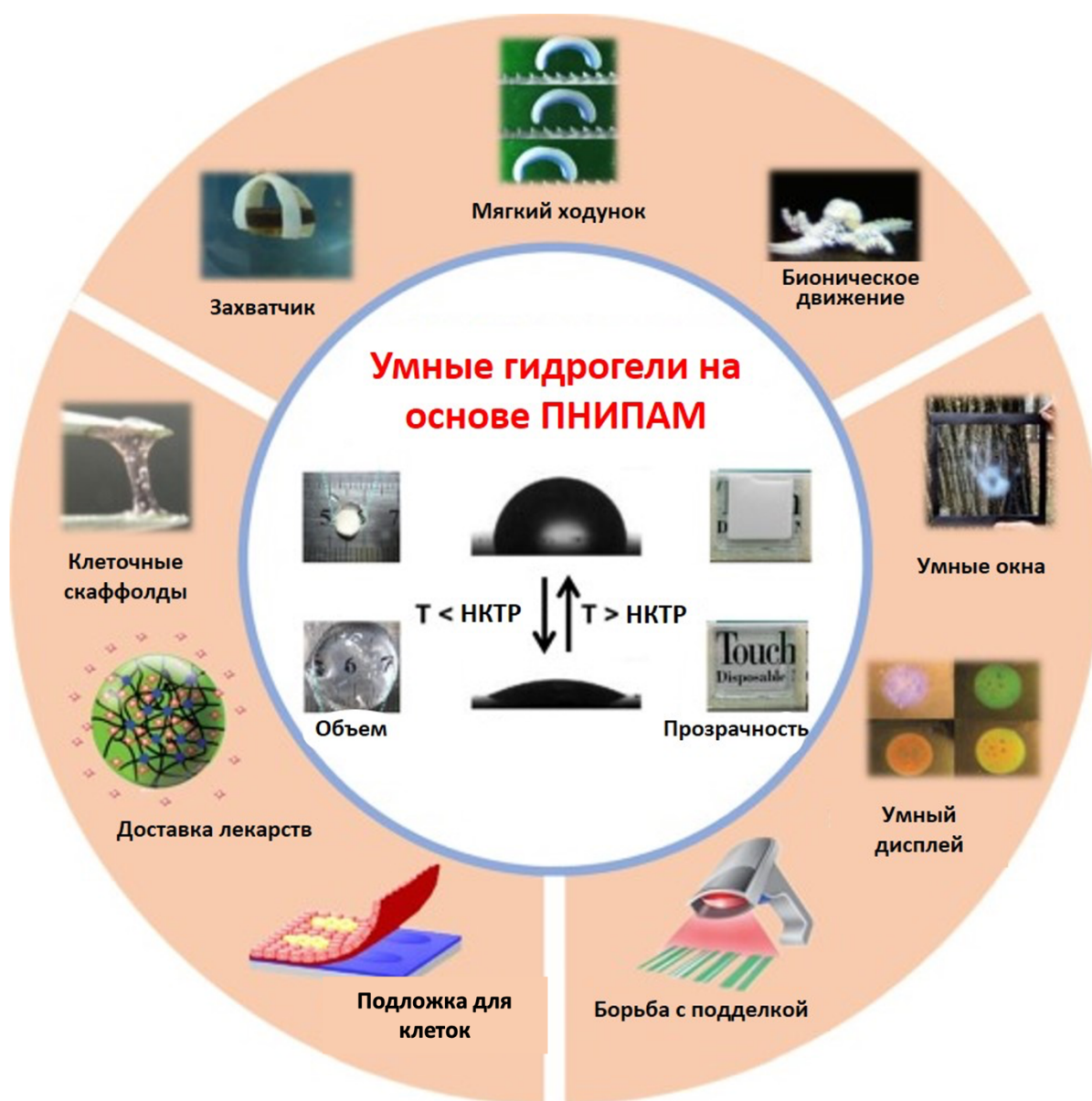


Рисунок 12 - Области применения умных гидрогелей на основе ПНИПАМ, например, актюаторы, в доставке лекарств, каркасах для клеток и клеточных покрытиях и т. д. [100]

1.3.1 Для оптики

Оптические материалы и структуры могут демонстрировать уникальные и четко определенные оптические свойства манипулируя светом через поглощение, рассеяние, отражение, интерференцию, дифракцию и комбинации двух или более из этих эффектов [101], что вызывает большой интерес для различных приложений [102]. Благодаря переключаемым оптическим свойствам, синхронизированным с термочувствительными характеристиками гидрогелей на основе ПНИПАМ (например, температурно-индуцированным изменениям объема и прозрачности), были созданы интеллектуальные оптические материалы для формирования чувствительных фотонных кристаллов и интеллектуальных дисплеев [103,104].

Встраивание фотонных кристаллов в гидрогелевую матрицу на основе ПНИПАМ может помочь изменить длину волны оптической запрещенной зоны, таким образом, меняя цвет. Это достигается путем изменения объема гидрогеля для адаптации постоянной решетки фотонных кристаллов. Например, при повышении температуры с 22 °C до 40 °C наблюдалось изменение цвета дифракции при температуре около 32 °C из-за того, что иммобилизованная ПНИПАМ коллоидная кристаллическая сфера начинала быстро сжиматься [103] (рисунок 13).

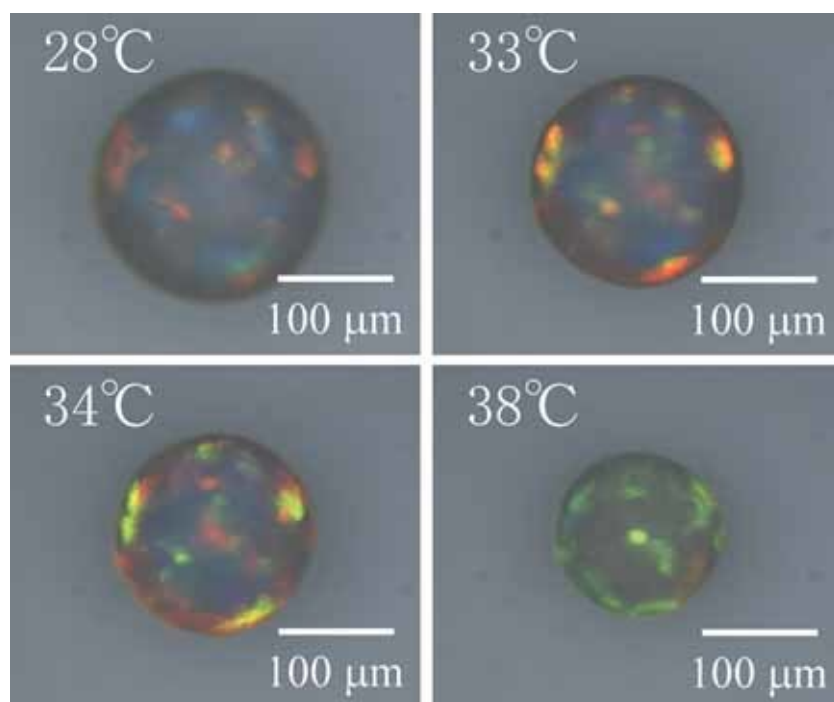


Рисунок 13 - Фотографии отражения коллоидной кристаллической сферы, иммобилизованной ПНИПАМ, при различных температурах [103]

Учитывая, что огромная часть мирового потребления энергии идет на отопление и охлаждение помещений в жилых и коммерческих зданиях [105], умные окна рассматриваются как перспективный кандидат для приложений по энергосбережению и управлению температурным режимом [106]. Это связано с тем, что они могут динамически и обратимо регулировать передачу солнечного света в здание, обеспечивая переменные требования к солнечному отоплению и визуальным условиям в зависимости от погодных условий и личных предпочтений [107–110], тем самым экономя большое количество энергии. Для создания идеальных умных окон необходима хорошая модуляция солнечной энергии ($\Delta T_{\text{сол}}$), требуется сформировать значительную разницу в передаче солнечного света при температурах выше и ниже критической температуры (T_k). В то же время передача видимого света ($T_{\text{люм}}$) в диапазоне длин волн 380–780 нм предпочтительно должна поддерживаться выше 70% для обеспечения лучшего внутреннего освещения. Кроме того, T_k должна находиться в диапазоне 25–35 °C. Из-за термочувствительного

фазового перехода гидрогели на основе ПНИПАМ имеют обратимый переход между прозрачностью и непрозрачностью, что может помочь регулировать $\Delta T_{\text{сол}}$ и $T_{\text{люм}}$. Также, настраиваемые значения НКТР ПНИПАМ могут помочь удовлетворить требование T_k . Таким образом, умные гидрогели на основе ПНИПАМ широко используются для изготовления умных окон, позволяющих управлять энергопотреблением [111]. Основной метод изготовления умных окон на основе гидрогеля заключается в размещении гидрогеля между двумя плоскостями стекла.

Путем инъекции плотно упакованных микрогелей поли(НИПАМ-*co*-2-аминоэтилметакрилат гидрохлорид) (поли(НИПАМ-АЭМА)) между двойными стеклянными предметными стеклами ученые добились получения умного окна с эффективной модуляцией пропускания в ИК-области и высокой $T_{\text{люм}}$ [112]. После 1000 циклов нагрева-охлаждения $\Delta T_{\text{ик}}$ уменьшилось менее чем на 4%, а гидрогелевая пленка не показала усадки. Кроме того, оконное устройство можно было изготовить в больших масштабах, что продемонстрировало перспективу практического применения умных окон (рисунок 14). Подобно регулированию размера частиц гидрогеля и внутренней структуры, управление толщиной гидрогелевой пленки и создание гибридных гидрогелей также являются эффективными подходами для оптимизации характеристик умных окон [113–115].

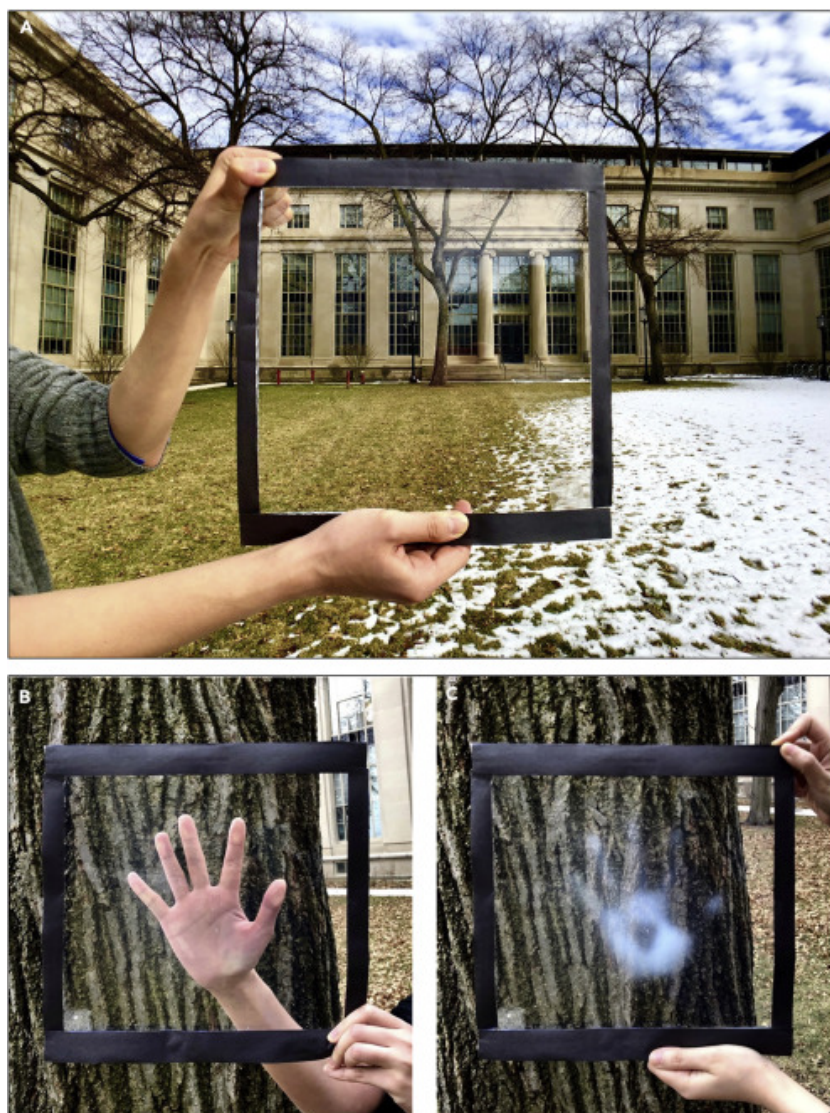


Рисунок 14 - Изображения устройства поли(НИПАМ-АЭМА) размером 12×12 дюймов и изменение его прозрачности, вызванное теплотой руки [116]

1.3.2 Для биоэлектроники

Многие биоэлектронные технологии требуют бесшовной интеграции на поверхности жизненно важных органов, где интерфейсы обеспечивают мягкое механическое соединение, а также эффективный электрический, оптический, термический и химический обмен. В последние годы ПНИПАМ широко используется для разработки биоэлектронных интерфейсов следующего поколения.

Электронные устройства и компьютеры могут использоваться для создания терапевтических интерфейсов «тело-машина» с применением электрически активных тканей, таких как мозг, сердце и скелетные мышцы. Недавно Багерифард и др. разработали систему доставки лекарств на основе ПНИПАМ, которая позволяет высвобождать лекарства и факторы роста для лечения кожных заболеваний [117]. Они создали платформу, использующую термочувствительные микрочастицы, гибкий слой гидрогеля, нагреватель для стимуляции микрочастиц, контроллер и источник питания. ПНИПАМ был выбран в этом исследовании из-за его термочувствительного поведения, что увеличивает возможность модуляции скорости высвобождения лекарств в зависимости от температуры. Дermalный пластырь, использующий термочувствительные лекарственные микроносители, инкапсулированные в гидрогелевом слое, был прикреплён к гибкому нагревателю со встроенной электронной схемой управления. Сконструированный пластырь покрывал рану и позволял доставлять лекарства путем электронной регулировки температуры гидрогелевого слоя.

Недавние разработки в области биоэлектроники предоставили огромные возможности для применения различных методов мониторинга и лечения длительных заболеваний. Однако современные биосистемы «электроника–ткань» характеризуются слабыми физическими взаимодействиями, жесткостью и дислокацией при длительном применении. Электропроводящие гидрогели демонстрируют гибкость (благодаря гидрогелю) и электропроводность (благодаря проводящим компонентам) [118].

В другом исследовании Сюэ и др. продемонстрировали применение биоэлектроники на основе гидрогеля для создания имплантируемых изделий, которые могут использоваться для мониторинга и лечения длительных заболеваний, таких как гипертония, диабет и болезнь Паркинсона. Этот биоэлектронный интерфейс на основе гидрогеля позволяет регистрировать физиологические параметры (артериальное давление и электромиограмму) и

демонстрирует свойства отсоединения триггера, не вызывая повреждений кожи, тканей или органов [119].

1.3.3 Для биомедицины

С физиологической точки зрения, температурный переход гидрогелей на основе ПНИПАМ при температуре около 32 °С, близкой к температуре тела, делает их весьма привлекательными для различных биомедицинских применений. ПНИПАМ активно используется в области биомедицины благодаря своей совместимости с клетками и возможностям создания контрольно-высвобождающих систем. Исследования показывают, что материалы на основе ПНИПАМ могут служить каркасами для роста клеток и поддержки тканей, что открывает новые горизонты в тканевой инженерии [120,121]. Кроме того, ПНИПАМ используется в капсулах для контролируемого высвобождения лекарственных веществ, что позволяет минимизировать побочные эффекты и улучшить эффективность терапии [122,123].

1.3.3.1 Доставка противораковых препаратов

Устойчивая и адресная доставка лекарств является ключевым направлением исследований в этой области. Для решения проблем, возникающих в данной сфере, Мохан и др. [124] разработали чувствительный к стимулам сополимерный гидрогель на основе ПНИПАМ. Они синтезировали меламина-функционализированный сополимер поли(N-изопропилакриламид-со-глицидилметакрилат) и протестировали его на мультистимулчувствительные свойства: pH и температурно-зависимое высвобождение лекарств, таких как ибупрофен (гидрофобный) и 5-фторурацил (гидрофильный), в различных условиях. Результаты испытаний *in vitro* показали, что гидрогель высвобождал почти 100% обоих препаратов при pH 4,0 и 45 °С. Кроме того, анализ МТТ и анализ гемосовместимости

продемонстрировали, что гидрогель на основе ПНИПАМ является биосовместимым и гемосовместимым, что предполагает его потенциал для применения в доставке лекарств.

Исследователи [125] изготовили гидрогель для доставки доксирубина, состоящий из несшитой сети ПНИПАМ и поливинилового спирта (ПВС) для воздействия на клетки меланомы. ПВС был выбран за его сильные адгезивные свойства, биосовместимость и нетоксичность, позволяющие смягчить гидрофобность, часто наблюдаемую в гидрогелях ПНИПАМ, и повышающие плотность внутренней структуры. Эта модификация позволяет лучше контролировать скорость высвобождения веществ из гидрогеля. Гидрогель ПНИПАМ / ПВС (рисунок 15) продемонстрировал поведение, зависящее от температуры, с НКТР приблизительно 34 °С.

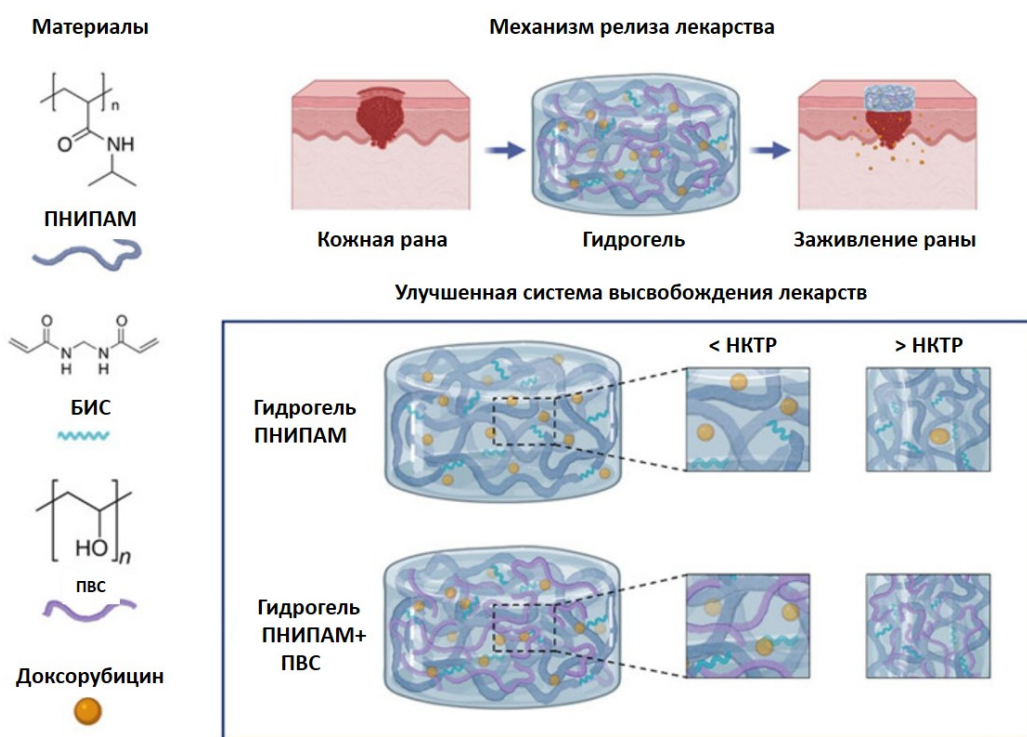


Рисунок 15 - Схематическая иллюстрация термочувствительного гидрогеля ПНИПАМ / ПВС [126]

Добавление ПВС увеличило пористость и ускорило высвобождение лекарства (78%). Тесты на биосовместимость *in vitro* показали, что гидрогель

нетоксичен и способствует пролиферации клеток. Более того, гидрогель проявил сильную противораковую активность против клеток меланомы благодаря быстрому высвобождению лекарства, что делает возможным его использование для регенерации кожи и терапии рака.

1.3.3.2 Фототермическая / фотодинамическая терапия

Фототерапевтические агенты, используемые в светоактивируемой терапии, безопасны для лечения различных злокачественных опухолей [127]. Двумя основными типами фототерапии являются фототермическая, которая наносит локализованный тепловой ущерб целевым областям, и фотодинамическая, которая производит активные формы кислорода, вызывающие локализованный химический ущерб [128,129]. Однако традиционные методы фототерапии сталкиваются со значительной проблемой в клинических условиях - фототоксичностью, обусловленной неконтролируемым распределением этих агентов в организме. Чтобы уменьшить побочные эффекты фототерапии и повысить её эффективность, значительное количество исследований было посвящено разработке фототерапии на основе гидрогеля для лечения опухолей. Использование гидрогелей в качестве носителей лекарств обеспечивает длительное высвобождение фототерапевтических агентов непосредственно в области опухоли, что помогает минимизировать их побочные эффекты [130].

Шин и др. [131] разработали многофункциональные нанокомпозиты на основе ПНИПАМ для химиофототермической терапии рака молочной железы. Акриловая кислота была добавлена к ПНИПАМ для повышения температуры перехода, сдвинув НКТР до 42 °С. Полипиррольные наночастицы были включены для создания фототермического эффекта под воздействием ИК-лазера (808 нм). Фолиевая кислота была конъюгирована с ПНИПАМ для целенаправленной доставки в раковые клетки. Высвобождение лекарств из нанокомпозита было вызвано изменениями температуры, вызванными ИК-

излучением. Наноккомпозит насыщался клетками рака молочной железы посредством эндоцитоза, опосредованного фолатными рецепторами, что улучшило лечение рака благодаря комбинированным эффектам химиотерапии и фототермической терапии (рисунок 16) [132].

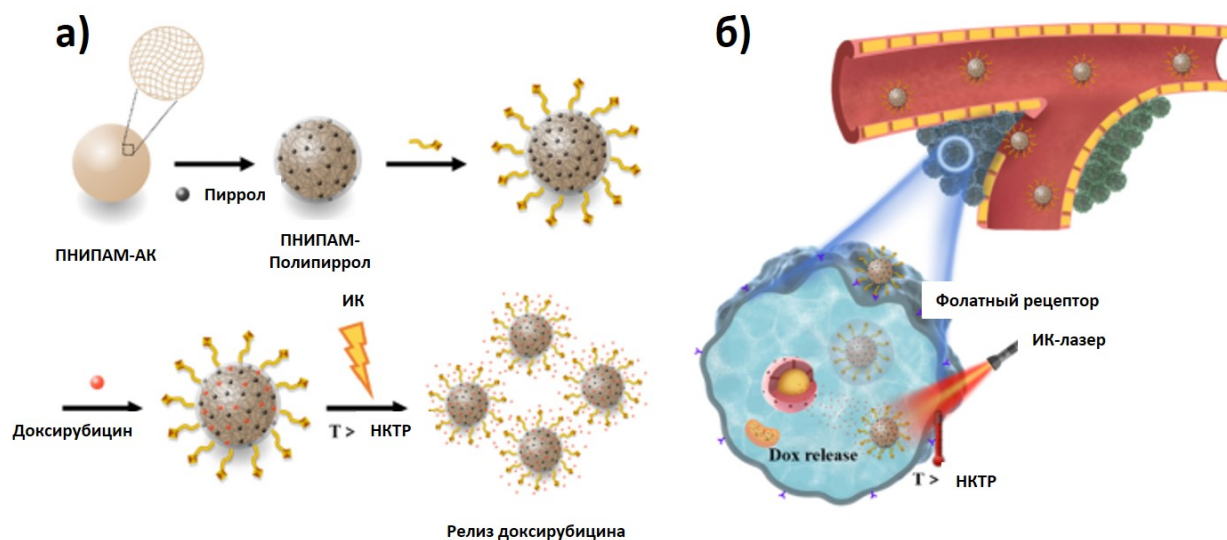


Рисунок 16 - (а) Схема синтеза наноккомпозитов на основе ПНИПАМ с использованием ближнего инфракрасного света и термоактивации, (б) применение композита для улучшенной химио-фототермической комбинированной терапии клеток рака молочной железы [132]

1.3.3.3 Заживление ран

Заживление ран обычно включает четыре взаимосвязанных фазы: гемостаз, воспаление, пролиферацию и ремоделирование [133]. Создание чистой влажной среды для раны может ускорить заживление, минимизируя воспаление. Гидрогелевые повязки могут улучшить процесс заживления, обеспечивая влажную среду, которая стимулирует регенерацию тканей [134]. Реализуя эту идею, Цзин и др. [135] разработали гидрогель ПНИПАМ, сшитый с композитными наночастицами для улучшения заживления ран. Частицы CeO_2 были равномерно распределены на поверхности мезопористого кремнезема, а затем физически сшиты с ПНИПАМ. Система на основе гидрогеля оставалась стабильной с течением времени, отличаясь низкой

биологической токсичностью и температурой фазового перехода, близкой к нормальной температуре тела. Исследования на животных показали, что массовое соотношение CeO_2 к мезопористому кремнезему 40:60 обеспечивало скорость заживления ран 78% к 10-му дню, значительно превосходя показатели других экспериментальных групп. Это исследование представляет собой новый подход и экспериментальную основу для использования функциональных гидрогелей в заживлении ран [136].

Пэн и др. [137] разработали многофункциональный гидрогель с замедленным высвобождением, предназначенный для динамического регулирования воспалительной микросреды раны на разных стадиях заживления. Двухслойный гидрогель объединил альгинат натрия с наночастицами оксида цинка (ZnO) и ПНИПАМ, загруженный нанозимами $\text{Cu}_{5.4}\text{O}$. Гидрогель устранял бактериальные инфекции на ранней стадии, генерируя активный кислород из ZnO под видимым светом и постепенно разрушая нижний слой. Когда верхний слой контактировал с раневой поверхностью, он высвобождал нанозимы $\text{Cu}_{5.4}\text{O}$ для нейтрализации избытка активного кислорода, уменьшая воспаления. Кроме того, нанозимы $\text{Cu}_{5.4}\text{O}$ улучшили ангиогенез и доставку кислорода и питательных веществ к поврежденной ткани (рисунок 17). Исследования показали, что композитный гидрогель значительно ускорил заживление диабетических ран с бактериальными инфекциями у мышей, демонстрируя сильные антибактериальные и противовоспалительные эффекты с течением времени [138].

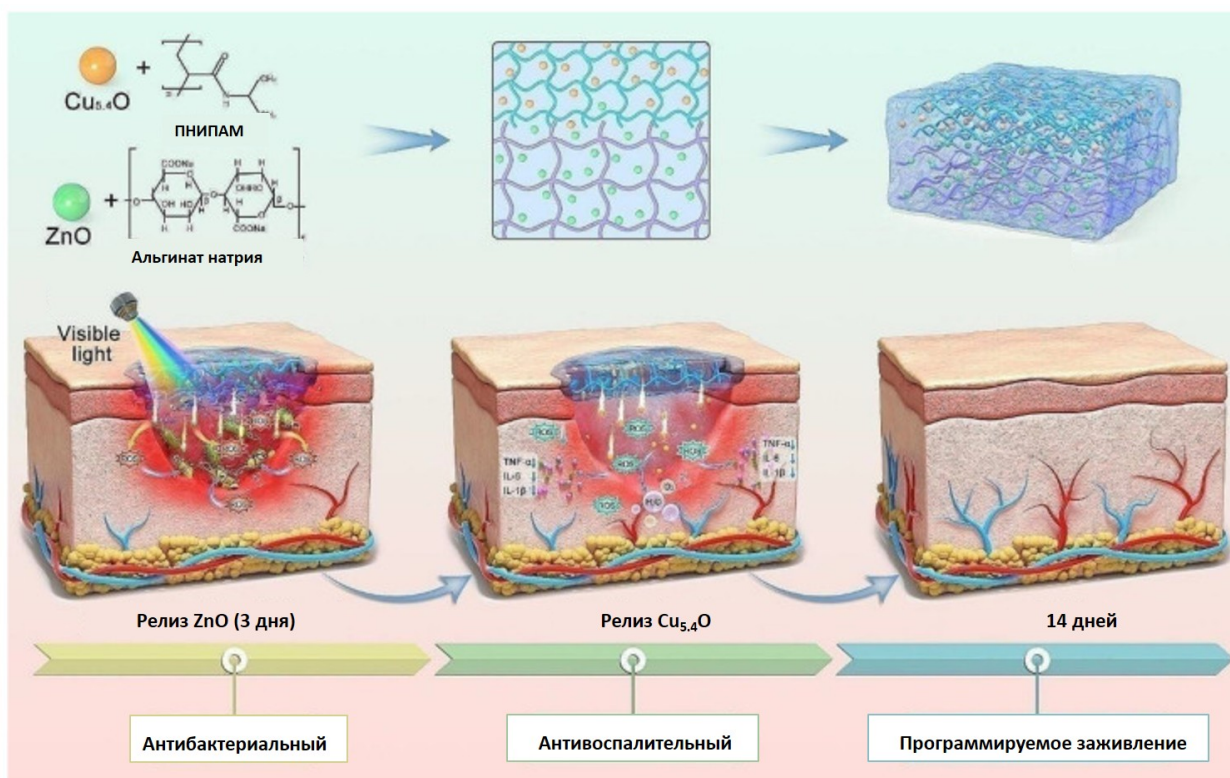


Рисунок 17 - Структура и терапевтический процесс гидрогеля на основе ПНИПАМ заживления ран [138]

1.3.3.4 Тканевая инженерия

Были разработаны различные методы создания трехмерных биомиметических каркасов из гидрогелей, которые недавно приобрели популярность в тканевой инженерии. Например, была разработана новая серия термочувствительных биоразлагаемых гидрогелей [139] путем объединения N-изопропилакриламида (НИПАМ) с двумя биоразлагаемыми сшивающими агентами: поли(ϵ -капролактон)диметакрилатом и бисакрилоилцистамином. В гидрогели загрузили левофлоксацин, чтобы исследовать его высвобождение, контролируемое температурой. При физиологическом pH и 37 °C гидрогель медленно биоразлагался в присутствии глутатиона. Благодаря однородному размеру пор, взаимосвязанной структуре, биоразлагаемым компонентам и термочувствительным свойствам эти гидрогели обладают большим потенциалом для создания каркасов в тканевой инженерии [140].

Также термочувствительный ПНИПАМ был прикреплен к желатину через радикальную полимеризацию с переносом атома [141]. Система желатин-ПНИПАМ претерпевала золь-гель переход при физиологической температуре и была протестирована в качестве инъекционного гидрогеля для регенерации костных дефектов в краниальной модели (рисунок 18).

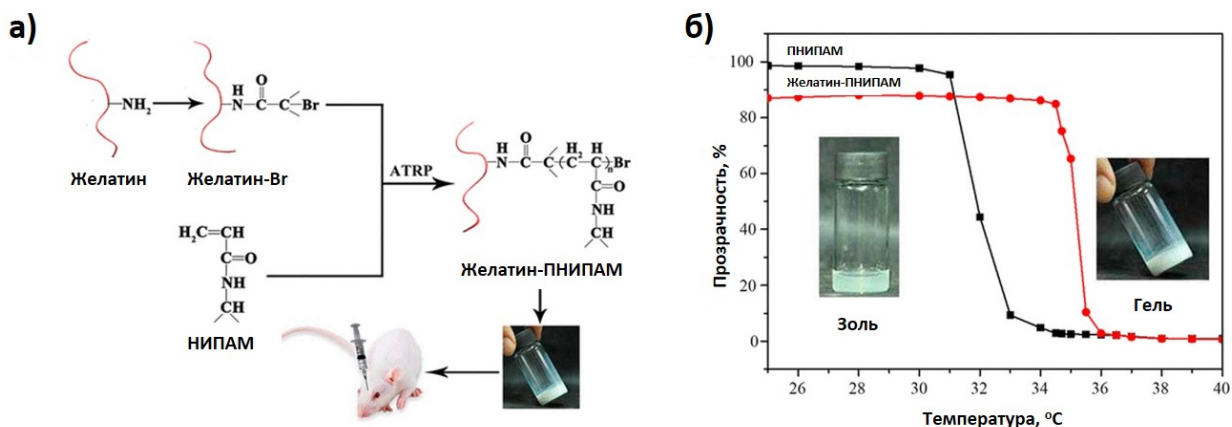


Рисунок 18 – (а) Схема приготовления термочувствительного гидрогеля желатин–ПНИПАМ, (б) Анализ фазового перехода водного раствора желатин–ПНИПАМ с использованием УФ спектрофотометрии [142]

Гидрогель показал хорошую биосовместимость и улучшенную регенерацию кости по сравнению с контрольной группой. Добавление мезенхимальных стволовых клеток кости крысы существенно улучшило регенерацию. Микро-КТ, гистология и иммуногистохимия продемонстрировали образование тканевой кости в течение 12 недель в группе с добавлением клеток. Таким образом полученный гидрогель является перспективной инъекционной системой для восстановления костных дефектов.

1.3.3.5 Глазные заболевания

Гидрогели могут поглощать значительное количество воды благодаря сшивкам в их структуре [143,144], но вместо того, чтобы растворяться в окружающей жидкости, они набухают [145]. Устойчивая доставка

дексаметазона в область глаза была оценена Блессингом и др. [146]. В этом исследовании дексаметазон был ковалентно связан с полимером посредством сополимеризации метакрилата дексаметазона с НИПАМ и N-акрилоксисукцинимидом с использованием ОПЦ-полимеризации с полиэтиленгликолем, функционализированным ОПЦ агентом. Термочувствительный гидрогель был сформирован путем смешивания полимерного раствора с цистамином при 37 °С, что привело к ковалентной сшивке. Гидрогель высвобождал дексаметазон посредством гидролиза эфира в течение 430 дней при 37 °С, поддерживая терапевтические уровни в стекловидном теле глаза более 500 дней. Инъекционность, длительное высвобождение и цитосовместимость гидрогеля делают его перспективным кандидатом для лечения воспалительных заболеваний глаз.

1.3.3.6 Кожные заболевания

В приложениях по доставке лекарств полимеры, такие как ПНИПАМ и поллоксамеры (блок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида) демонстрируют значительную температурную чувствительность, высвобождая лекарственное средство при воздействии более высоких температур [147,148]. НКТР, при котором происходят эти изменения, зависит от концентрации и химической структуры полимера, что позволяет оптимизировать его с помощью различных модификаций. Эти фазовые переходы могут быть активированы естественным температурным градиентом кожи, поскольку температура на поверхности кожи обычно ниже, чем температура внутри тела [149]. Дартора и др. [150] сосредоточились на загрузке проникающего в клетки пептида-ингибитора в полые термочувствительные наночастицы ПНИПАМ, включенные в гидрогель на основе хитозана (рисунок 19) для лечения атопического дерматита.

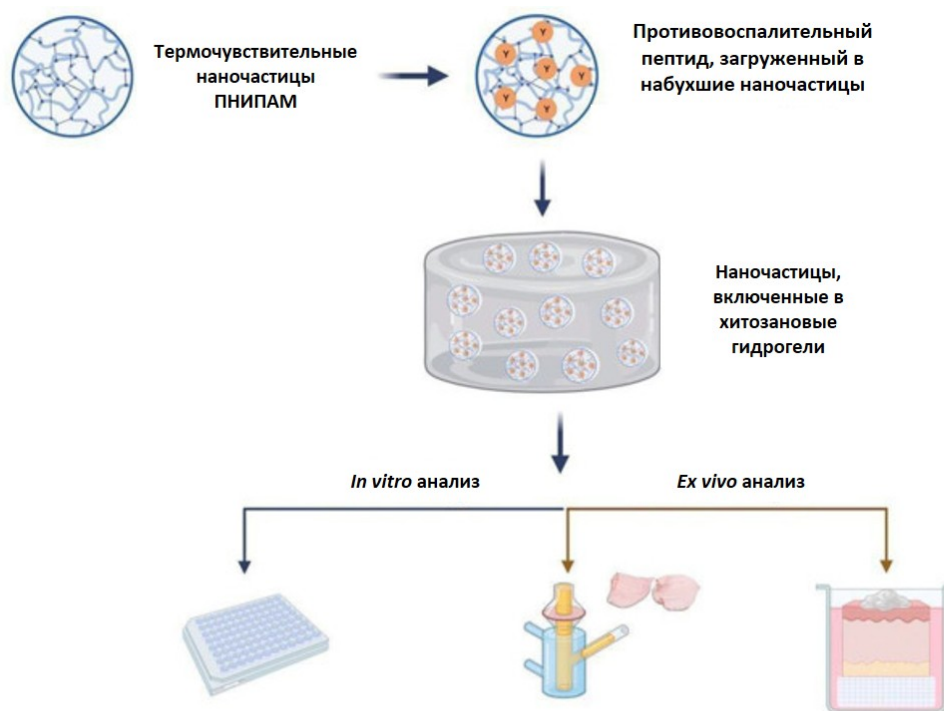


Рисунок 19 - Термочувствительные наночастицы ПНИПАМ в гидрогеле хитозана [151]

Наночастицы продемонстрировали высокую эффективность загрузки более 50%, а изображения СЭМ подтвердили, что гидрогели оставались пористыми после включения наночастиц. Как наночастицы, так и гидрогели обеспечивали устойчивое высвобождение пептида в течение 120 часов. Они доставляли значительно больше пептида в жизнеспособные слои свиной кожи *in vitro* по сравнению с неинкапсулированным соединением как в неповрежденных, так и в нарушенных барьерных условиях. Кроме того, они снижали уровни воспалительных цитокинов в кератиноцитах человека до 20 раз, а в модели кожи *ex vivo* уровни цитокинов снижались до 17 раз при использовании гидрогеля по сравнению с препаратом в растворе. Эти результаты свидетельствуют о том, что такая система предлагает многообещающую формулу для лечения атопического дерматита.

1.3.4 Для создания актюаторов

Активные движения присущи множеству живых существ, от одноклеточных организмов до людей. Искусственный умный актюатор – это тип устройства, способного преобразовывать определенную энергию, поставляемую внешними стимулами, такими как температура [152,153], свет [154–156], магнитное поле [157,158], и электрическое поле [159] в движения. Поэтому они являются перспективными материалами в различных применениях, включая захватчики, мягкие роботы, клапаны и бионику [160–162]. Благодаря свойству изменения объема под воздействием температуры интеллектуальные гидрогели на основе ПНИПАМ могут производить макроскопические движения и деформации при набухании и усадке. Как правило, если гидрогелевые актюаторы имеют однородное набухание / усадку во всех направлениях, то можно достичь только размерного изменения формы, что ограничивает их дальнейшее применение. В настоящее время, с развитием гидрогелевых актюаторов, сложные деформации, такие как изгиб и скручивание, исследуются для расширения их потенциальной области применения. Хорошо известно, что скорость и соотношение набухания/усадки гидрогелей на основе ПНИПАМ в значительной степени зависят от микро- и макрохарактеристик полимерных сетей, таких как плотность сшивки, гидрофильность, макропоры и т. д. Например, плотно сшитая гидрогелевая сеть ПНИПАМ демонстрирует меньшую степень набухания; более гидрофильный компонент в составе гидрогеля обеспечивает более высокую НКТР; гидрогели на основе ПНИПАМ с макропорами демонстрируют более высокую скорость набухания / усадки. Таким образом, правильное проектирование и изготовление структур с этими характеристиками позволяет получить структуры с гетерогенным набуханием / усадкой, что приведет к изменению формы. Текущие структуры и принципы проектирования можно разделить на следующие категории: двухслойные структуры [163–165],

градиентные структуры [166–168], паттернированные структуры [169,170], локализованные стимулы [171–173] (рисунок 20).

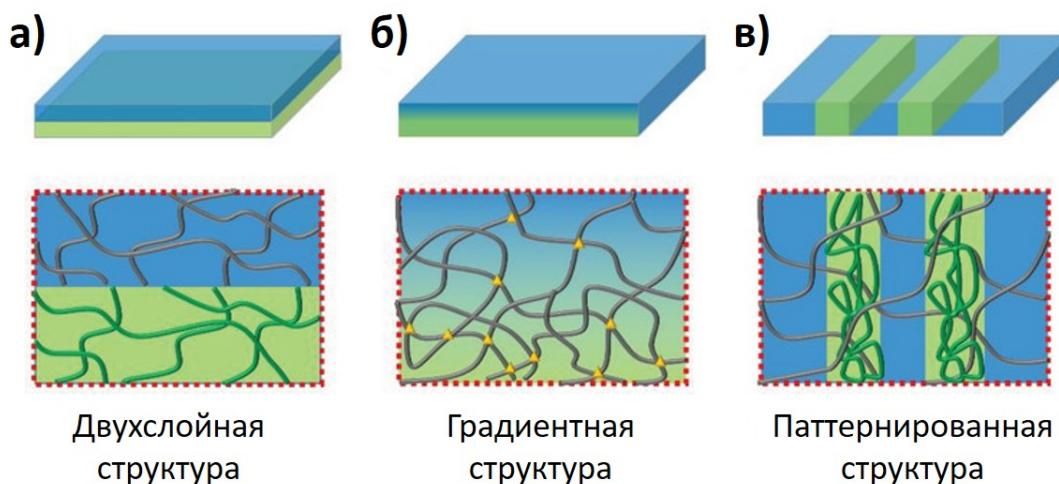


Рисунок 20 – Схематичное изображение различных структур для создания интеллектуальных актюаторов: (а) двухслойные структуры, (б) градиентные структуры, (в) паттернированные структуры [100]

1.3.4.1 Актюаторы с двухслойной структурой

Двухслойные гидрогелевые актюаторы, которые обычно состоят из двойных слоев с разными скоростями расширения/сжатия и/или соотношениями, были успешно разработаны для выполнения деформаций формы из-за асимметричных свойств реагирования двух частей. В работе Ху и др. [174] описали синтез двухслойного гидрогелевого актюатора на основе ПНИПАМ путем связывания слоя гидрогеля взаимопроникающей полимерной сети ПНИПАМ-полиакриламид со слоем гидрогеля полиакриламида. Когда двухслойная полоса была нагрета равномерно выше НКТР смеси ПНИПАМ-полиакриламид, слой гидрогеля ПНИПАМ-полиакриламид отреагировал резкой усадкой, тогда как слой полиакриламида был нечувствителен к изменению температуры. В результате несоответствие усадки, сохраняя ту же самую деформацию на границе между двумя частями, создало напряжение, заставив бислой согнуться в дугу по направлению к слою

ПНИПАМ-полиакриламид. Вдохновленные концепцией введения второго слоя для облегчения внутреннего гетерогенного набухания/усадки, многочисленные исследования посвящены двухслойным структурам для изготовления актюаторов. В соответствии с характеристиками материала двухслойные гидрогелевые актюаторы на основе ПНИПАМ можно разделить на две категории: (1) двухслойные структуры, включающие один чувствительный гидрогелевый слой на основе ПНИПАМ и другой слой, объем которого не реагирует на изменения температуры; (2) двухслойные структуры, включающие два гидрогелевых слоя на основе ПНИПАМ.

На сегодняшний день в качестве пассивных слоев для комбинирования с гидрогелями на основе ПНИПАМ для изготовления двухслойных актюаторов использовались многие виды материалов, включая полиакриламид [164,175,176], поли(этиленгликоль)диакрилат [177,178], поли(пропиленфумарат) [179,180], поликапролактон [181], поли(метилметакрилат) [182,183], полидиметилсилоксан [153], полиимид [184] и термопластичный полиуретан [185,186]. Свойства изменения формы материалов на основе ПНИПАМ (например, направление движения, скорость реакции и степень изгиба) тесно связаны с характеристиками двух слоев (например, набуханием/усадкой и механическими свойствами). Хорошо известно, что соотношение и скорость набухания/усадки в значительной степени зависят от плотности сшивки и архитектуры сети гидрогеля. Например, Ким и др. реализовали как однонаправленный, так и двунаправленный изгиб путем настройки плотности сшивки [164]. Актюатор состоял из активного слоя гидрогеля ПНИПАМ/оксид графена (ПНИПАМ/ОГ) и пассивного слоя гидрогеля полиакриламида. Используя фототермический эффект ОГ, было создано изменение температуры посредством светового облучения, таким образом достигая светоиндуцированной деформации. Как показано на рисунке 21а, когда начальные коэффициенты набухания гидрогеля полиакриламида и гидрогеля

ПНИПАМ/ОГ были схожи, бислой был прямым, а затем гетерогенная усадка между гидрогелем ПНИПАМ/ОГ и гидрогелем полиакриламида под воздействием светового облучения вызывала изгиб в сторону ПНИПАМ/ОГ. Таким образом, было показано двунаправленное изгибающее движение от кольца к обратному кольцу (рисунок 21а).

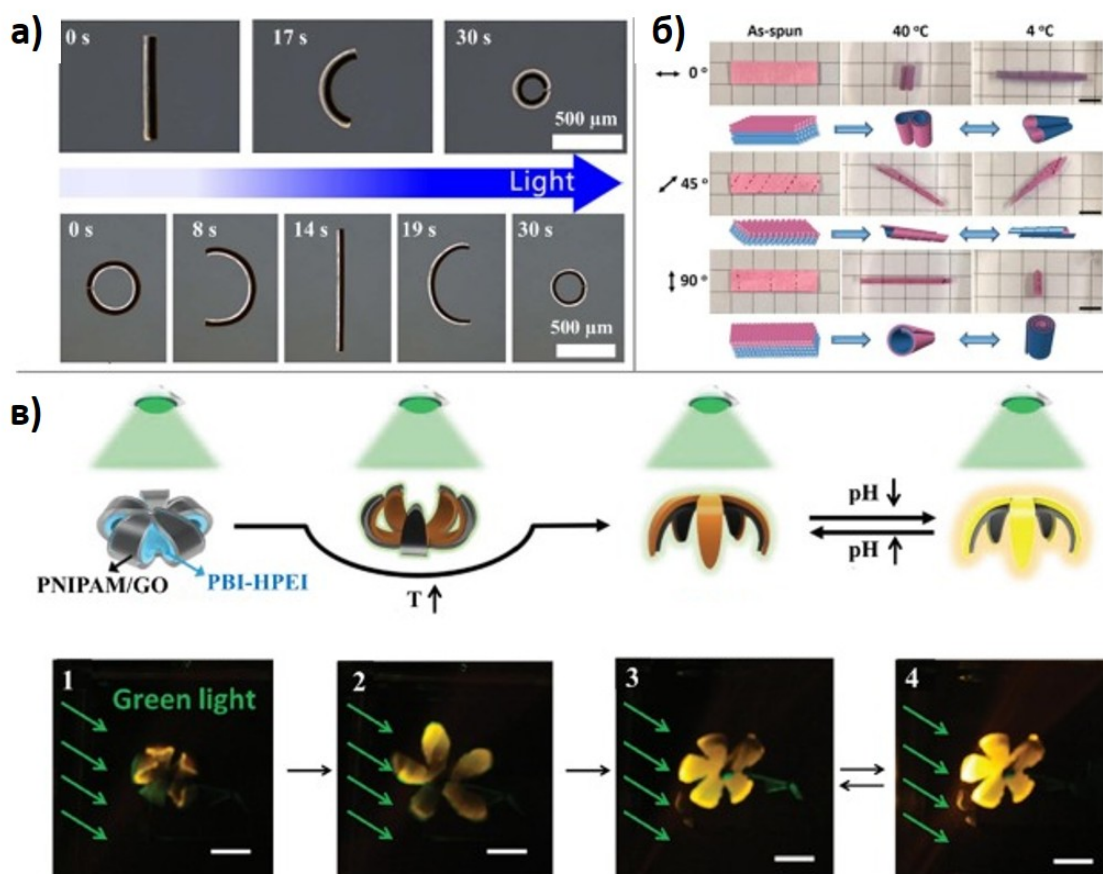


Рисунок 21 - (а) Вверху: изображения однонаправленного изгиба под воздействием светового облучения, внизу: изображения двунаправленного изгиба под воздействием светового облучения [164], (б) активация бислойа на основе ПНИПАМ с различной ориентацией волокон [187], (в) активация деформации формы и отображение флуоресценции [188]

Ли и др. [187] изготовили двухслойные актюаторы со сверхбыстрыми движениями посредством последовательного электропрядения (электроспиннинг) и фотосшивания невосприимчивого термополиуретана и

активного ПНИПАМ. Более высокая внутренняя площадь поверхности и пористость нановолокна могут способствовать диффузии воды в гидрогель ПНИПАМ и из него, улучшая время отклика. Как показано на рисунке 21б, бислой актюатора были разрезаны под разными углами. При помещении в воду при 4 °C и при 40 °C они показали обратимое сгибание, сворачивание, прокатку и скручивание в различных контролируемых направлениях. Продемонстрировано, что более крупному образцу требовалось больше времени для приведения в действие, а также соотношение толщин двух слоев влияет на кривизну и количество витков в спирали.

Путем введения функциональных компонентов в двухслойные структуры, другие возможности, такие как изменение цвета [189,190], память формы [191,192], могут быть интегрированы в двухслойный актюатор. Например, Ма и др. сконструировали двухслойный актюатор, который мог реализовать функцию изгиба и изменения цвета [190]. Они включили чувствительный к pH флуоресцентный гиперразветвленный полиэтиленимин с функционализацией перилебисимидом в гидрогель полиакриламида для приготовления слоя гидрогеля с регулируемой окраской, который затем был объединен с чувствительным к температуре слоем гидрогеля ПНИПАМ/оксид графена (ПНИПАМ/ОГ) для создания двухслойных актюаторов. Как показано на рисунке 21в, при температуре 20 °C, что ниже НКТР гидрогеля ПНИПАМ/ОГ, слой гидрогеля ПНИПАМ/ОГ набухает, а бислой изгибается в противоположную сторону. Таким образом, большая часть света блокируется гидрогелем ПНИПАМ/ОГ, и флуоресценция не появляется (рисунок 21(C1)). Когда температура повышается до 40 °C (выше НКТР), сжатие слоя ПНИПАМ/ОГ приводит к разворачиванию актюатора, что позволяет активировать световую флуоресценцию (рисунок 21 (C2 и C3)). Более того, снижение pH в среде может усилить флуоресценцию (рисунок 21 (C4)).

Чтобы достичь различных состояний набухания/усадки для двух слоев, можно использовать различные подходы: различным значениям НКТР для

двух слоев [193,194], разные плотности сшивки [195], ориентированные структуры и узоры [196,197] или температуры [198], тем самым вызывая изменения формы. Благодаря модификации сети ПНИПАМ с помощью ионов или сополимеризации с более гидрофобными или гидрофильными мономерами можно получить различные значения НКТР [199]. Например, катионы Al^{3+} сделали гидрогель Al-альгинат-ПНИПАМ более гидрофобным, чем гидрогель Na-альгинат-ПНИПАМ. За счет увеличения концентрации $AlCl_3$ значение НКТР гидрогеля Al-альгинат-ПНИПАМ можно модулировать в диапазоне от 32 °C до 22.5 °C, что ниже, чем у слоя гидрогеля Na-альгинат-ПНИПАМ [193] (рисунок 22А).

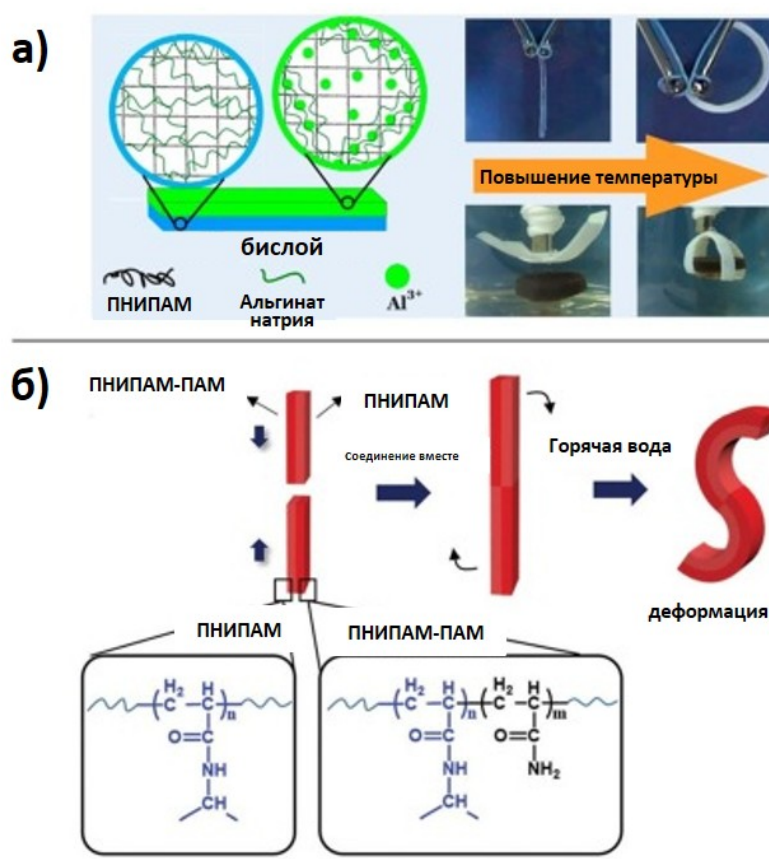


Рисунок 22 - (а) Схемы и фотографии двухслойного гидрогеля [193], (б) схематическая иллюстрация двухслойного гидрогеля на основе ПНИПАМ и процесса его реакции в горячей воде [194]

Используя гидрофильный мономер акриламид для увеличения НКТР ПНИПАМ, Ченг и др. [194] создали двухслойный актюатор из поли(НИПАМ-со-акриламида) (поли(НИПАМ-ААм)) и ПНИПАМ с альгинатом натрия в качестве взаимопроникающей цепи. Как показано на рисунке 22 б, они объединили два слоя гидрогелей вместе в противоположных направлениях так, что слой гидрогеля поли(НИПАМ-ААм) и слой гидрогеля ПНИПАМ были по отдельности приклеены к другой стороне. Когда температура повышалась до 45 °С выше НКТР слоя гидрогеля поли(НИПАМ-ААм), взаимодействия между гидрофобными сегментами в слое гидрогеля поли(НИПАМ-ААм) становились намного слабее, чем в слое гидрогеля ПНИПАМ. Таким образом, гидрогель ПНИПАМ сжимался больше, чем слой гидрогеля поли(НИПАМ-ААм), что привело к образованию «S-образной формы».

Хорошо известно, что многие растения обладают характеристиками активации, которые возникают из-за направленного выравнивания их микрофибрилл целлюлозы [156,200,201]. Контролируя выравнивание фибрилл целлюлозы в каждом слое с помощью 3D-печати, Гладман и др. [196] добились создания двухслойных гидрогелевых актюаторов на основе ПНИПАМ (рисунок 23). Как показано в верхней части рисунка 23, выравнивание фибрилл целлюлозы, вызванное сдвигом во время печати, могло привести к образованию нитей с различной деформацией набухания и жесткостью в поперечном и продольном направлениях. Таким образом, бислой, основанный на двух слоях с различно ориентированными нитями, может демонстрировать изменение формы при набухании.

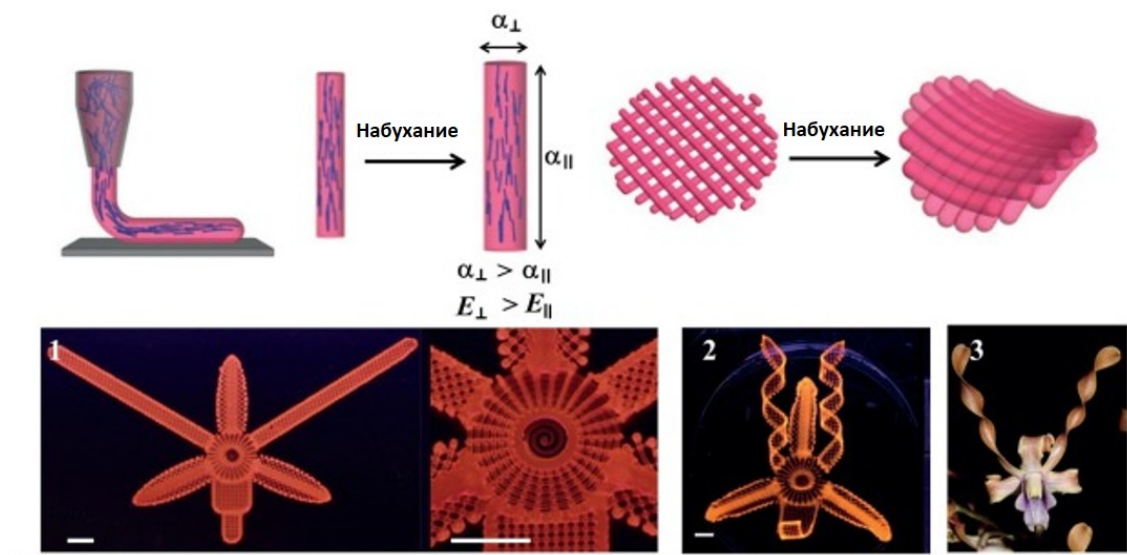


Рисунок 23 - Вверху: схема выравнивания наночастиц целлюлозы во время печати и схема двухслойной структуры на основе выровненных целлюлозных фибрилл; Внизу: 1) напечатанная структура; 2) набухшая структура; 3) прототип натуральной орхидеи [196]

Используя контроль архитектуры с помощью 3D-печати, можно имитировать ряд поведений природных цветов на основе этого типа бислоев. Пример приведен на рисунке 23 внизу, когда напечатанная структура с точными конфигурациями была погружена в воду. Она могла демонстрировать три различных типа форм, включая один центр цветка и два различных типа лепестков, хорошо напоминающих орхидею (рисунок 23 (1-3)).

1.3.4.2 Актюаторы с градиентными структурами

Анизотропные полимерные сети с градиентным распределением полимерных цепей, плотностей сшивок, наполнителей или пор в одном гидрогеле на основе ПНИПАМ могут давать различные соотношения и/или скорости набухания/усадки в разных частях гидрогеля, тем самым вызывая изменения формы.

Градиент интенсивности УФ-света может формироваться в направлении облучения из-за ограниченного проникновения света в полимер [154]. В связи

с этим формирование градиента интенсивности УФ-света в процессе фотополимеризации может помочь подготовить гетерогенную полимерную сеть в направлении облучения светом (вверху на рисунке 24а). Используя этот подход, Ву и др. [202] создали градиентный монослойный гидрогель ПНИПАМ-ПААм-перилентетракарбоновая кислота/желатин, в котором плотность ПААм со стороны УФ-облучения была выше, чем на другой стороне. Из-за различной кинетики усадки между двумя сторонами при температуре выше НКТР гидрогель изгибался в сторону с более низким содержанием ПААм. Изменяя области, облучаемые УФ-светом, можно получить полосы гидрогеля с различным расположением градиента ПААм, тем самым создавая различные формы, такие как разные числа (например, «2», «6», «7» и «8») (внизу на рисунке 24а).

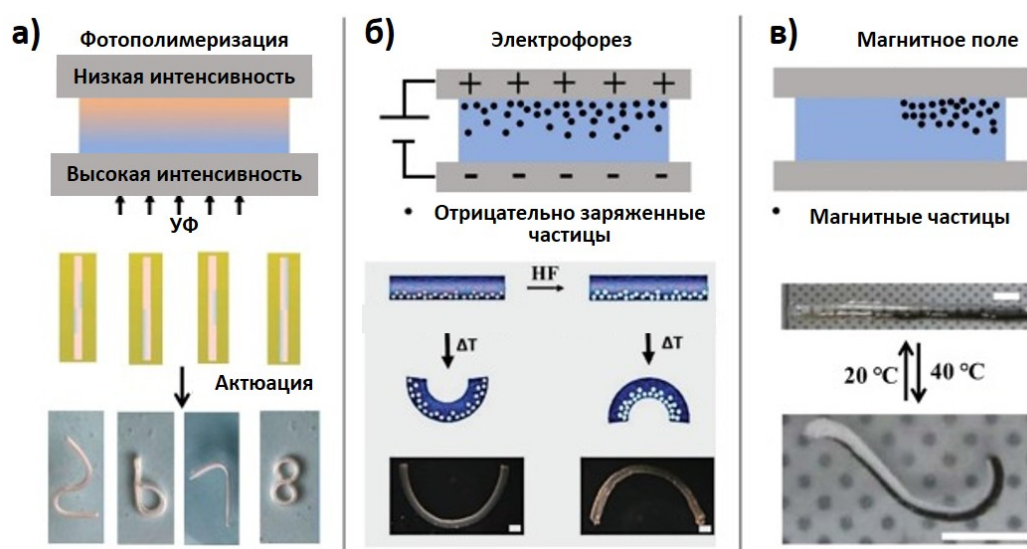


Рисунок 24 – (а) Вверху: схема структуры при облучении градиентным УФ-светом, внизу: иллюстрация и изображения, показывающие актюацию гидрогелей на основе ПНИПАМ с различным распределением ПААм [202], (б) вверху: схема структуры на основе движений компонентов в электрическом поле, внизу: схемы и изображения изменений формы для гидрогелей на основе SiO_2 и ПНИПАМ [166], (в) вверху: схема структуры на основе движений компонентов в магнитном поле, внизу: фотографии полосы гидрогеля при 40 °C и 20 °C [203]

Прикладывая электрическое поле в присутствии заряженных частиц, в гидрогелях может формироваться градиентное распределение заряженных частиц, что можно использовать для создания асимметричных полимерных сетей (вверху на рисунке 24б). С помощью электрофореза и последующей фотополимеризации Асох и др. [166] синтезировали два монослойных гидрогелевых актюатора на основе ПНИПАМ, которые обладали градиентами наночастиц кремния (SiO_2). Отрицательно заряженные частицы SiO_2 в воде перемещались к аноду под действием силы электрического поля, а последующая фотополимеризация мономера НИПАМ фиксировала градиентное распределение SiO_2 , тем самым образуя гидрогель на основе ПНИПАМ с градиентом SiO_2 . При дальнейшей обработке SiO_2 плавиковой кислотой получался гидрогель на основе ПНИПАМ с градиентом пор. Поскольку более высокая концентрация SiO_2 снижала коэффициент усадки, а большее количество пор увеличивало скорость усадки, в горячей воде выше НКТР гидрогель на основе ПНИПАМ с градиентом SiO_2 изгибался в сторону с меньшим количеством SiO_2 (внизу на рисунке 24б). Аналогичным образом, применяя магнитные поля во время процесса полимеризации для облегчения миграции наночастиц, Лю и др. [203] ввели градиентное распределение наночастиц в нанокompозитные гидрогели на основе ПНИПАМ для получения актюаторов (рисунок 24в). В их системе градиенты магнитных наночастиц в нескольких измерениях одновременно влияли на равновесное отношение и скорость усадки гидрогелей на основе ПНИПАМ. Многие программируемые деформации формы могли быть получены при контроле распределения магнитных наночастиц.

1.3.4.3 Актюаторы с паттернированными структурами

В природе волокнистые части растений обычно состоят из тонких волокон, образующих матрицу, в которой её жесткость и набухание могут отличаться по свойствам. При изменении влажности окружающей среды несоответствие в набухании между матрицей и волокнами приводит к изменению формы растений [162]. На основе этих свойств были созданы различные актюаторы на основе гидрогеля ПНИПАМ путем создания структур с паттерном для получения гетерогенного набухания/усадки в плоскости. Широко используются стратегии локального введения другого компонента в один слой и создания структурированных полимерных или сшивающих плотностей в плоскости.

Например, посредством локального распределения компонента в матрице гидрогеля Ву и др. [169] разработали единый узорчатый слой гидрогеля на основе ПНИПАМ. В процессе подготовки фотолитографии сначала был подготовлен слой первичного гидрогеля ПНИПАМ, а затем вторая сеть поли(2-акриламид-2-метилпропансульфоновой кислоты) была локально размещена в ПНИПАМ для формирования бинарного гидрогеля, что привело к периодическому расположению полос в плоскости (рисунок 25).

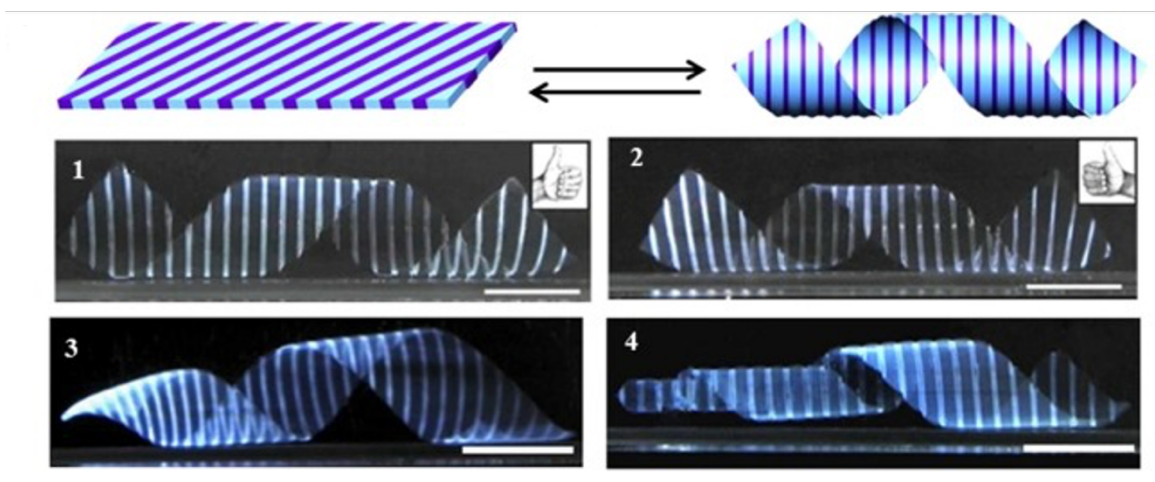


Рисунок 25 - Вверху: схема изменения формы узорчатого листа с периодическими полосами под воздействием стимула, внизу: изображения различных спиралей, включая 1) левую спираль, 2) правую спираль, 3) и 4) конические спирали с различными радиусами [169]

Поскольку ПНИПАМ и композитный гидрогель показали разную степень усадки, самосвертывание создавалось при изменении температуры. Подбирая параметры (например, угол расположения и ширину) полос относительно друг друга для модуляции набухания и механических свойств каждой полоски, получались различные виды спиралей, такие как спирали с левой и правой закруткой (рисунок 25 1 и 2) и конические спирали с разными радиусами (рисунок 25 3 и 4).

1.4 Выводы по главе

Согласно обзору литературы, ПНИПАМ является наиболее изученным и предпочтительным термочувствительным полимером, применение которого варьируется от тканевой инженерии до доставки лекарств и перевязочных материалов. Гидрогели на основе ПНИПАМ демонстрируют характеристики, включая способность к обратимым преобразованиям в объеме, оптическую прозрачность и поверхностную гидрофильность. Значительным преимуществом ПНИПАМ является НКТР в водных растворах около 32 °С, следовательно гидрогель легко активируется температурой тела, инициируя фазовый переход. Хотя гидрогели ПНИПАМ обладают большим потенциалом, их применение ограничено такими проблемами, как низкая механическая прочность, ограниченная емкость для загрузки лекарств, низкая биоразлагаемость и т. д.

Объединение ПНИПАМ с другими материалами значительно расширило функциональный спектр этих гидрогелей, способствуя мультистимульному реагированию и улучшенным возможностям загрузки лекарств. Достижения в области 3D- и 4D-биопечати могут дополнительно способствовать разработке индивидуальных имплантатов на основе гидрогеля и решений для регенеративной медицины.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Химические реактивы

Поли(N-изопропилакриламид) (ПНИПАМ, $M_n = 40,000$, $M_w / M_n \sim 1.15$), N-изопропилакриламид (НИПАМ, 97%), 2-(додецилтиокарбонотиоилтио)-2-метилпропионовая кислота, 3-азидо-1-пропаноловый эфир (ОПЦ-агент, 98%), раствор пропаргил бромида (~80 масс.% в толуоле), 2,2' - азобис(2 – метилпропионитрил) (98%), альгинат натрия, хлорид кальция, 1-гидроксициклогексилфенилкетон, N,N'-метиленбисакриламид, хлорид железа(II) тетрагидрат $\geq 98.5\%$, хлорид железа(III) гексагидрат $\geq 99\%$, водный раствор аммиака $\geq 27.5\%$ были приобретены у компании Sigma-Aldrich. 10 масс. % водная суспензия нанокристаллической целлюлозы, полученная сернокислотным гидролизом (НКЦ), получена от University of Maine Process Development. Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS, 1х, без ионов кальция и магния), модифицированная среда Eagle (MEM), содержащая 1% незаменимых аминокислот, 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина получен от Thermo Fisher Scientific, USA.

Клеточные линии T98G (клетки глиобластомы человека) и A431 (клетки карциномы человека) были получена из коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Паклитаксел (ПТК) ($\geq 99.5\%$) был приобретен в Bld Pharmatech (Китай). Раствор внеклеточного матрикса (получен из набора для анализа ангиогенеза *In Vitro*) (ab204726, Abcam, Великобритания).

2.2. Методы и оборудование

Построение фазовых диаграмм состояния. Соответствующее количество водного раствора ПНИПАМ (19 масс. %) смешивали с водной дисперсией НКЦ (10 масс. %) и водой для получения смесей с соотношением ПНИПАМ/НКЦ = 0,5 – 4,0 (здесь и далее обозначение $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$) и общей

массовой концентрацией, *С_{общ}*, от 4 до 16 масс. % при 25 и 37 °С. Каждую систему перемешивали до получения однородной смеси (1 мин). Последовательность смешивания реагентов не имела значения. Для получения диаграммы состояния при 37 °С образцы готовили при комнатной температуре (в противном случае ПНИПАМ выпадал в осадок) и нагревали до 37 °С на водяной бане. Принадлежность полученной смеси к золю, гелю или осадку определяли визуально с помощью флип-теста.

Динамическое рассеяние света (ДРС). Дзета-потенциалы (ζ) и гидродинамический диаметр (D_h) НКЦ были определены с помощью анализатора наночастиц серии SZ-100 (Horiba Jobin Yvon). Эксперименты проводили при температуре 25 и 37 °С.

УФ-спектроскопия. Для определения температуры фазового перехода в объеме использовали УФ-спектроскопию. Поглощение при $\lambda = 600$ нм гидрогеля объемом 1000 мкл измеряли с помощью спектрофотометра UV-VIS (Thermo Scientific Evolution 220, США) при температуре в диапазоне от 25 до 45 °С с выдерживанием образца в течение 5 мин при каждой температуре перед измерением. Значение ТФПГ было определено как температура, соответствующая 50% от максимальной нормализованной экстинкции, для которой экстинкция при 25 и 42 °С была принята равной 0 и 100% соответственно.

ИК-спектроскопия. Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием полного отражения была выполнена на спектрометре Nicolet iS10 в диапазоне от 4000 до 600 см⁻¹ на кристалле германия.

Липофильная сушка. Соответствующие гели выдерживали при 22 или 37 °С в течение 5 мин, затем к образцам добавляли жидкий пропан в одной порции, и вся система помещалась в сосуд Дьюара с жидким азотом. Замороженную среду помещали в сублимационную сушилку (Alpha 2-4 LDplus, Германия) на 24 часа.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Высушенные лиофильной сушкой образцы измельчали и покрывали золотом с помощью устройства для нанесения покрытий с высоким разрешением SC7640 (Quorum Technologies) в течение 15 с при 2,0 кВ. Визуализацию высушенных гелей проводили с помощью СЭМ (Carl Zeiss CrossBeam 1540XB/Cross-beam SEM-FIB workstation Carl Zeiss CrossBeam 1540XB) при напряжении 5,00 кВ. Средний диаметр фибрилл измеряли путем анализа СЭМ-изображений с использованием программного обеспечения ImageJ.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Изображения для ПЭМ были получены с помощью микроскопа Zeiss Libra 200FE при 80 кВ. Размеры НКЦ были проанализированы с помощью программного обеспечения ImageJ.

Микротомографический анализ. Высушенные сублимацией образцы были отсканированы на рентгеновском микротомографическом сканере Bruker SkyScan 1172 (Бельгия) с использованием программного обеспечения SkyScan. Режим сканирования: напряжение 40 кВ, ток 100 мА, разрешение 1,45 мкм, шаг вращения 0,2 градуса, экспозиция 1800 мс, время сканирования 5 ч 44 мин. В результате сканирования был получен набор теневых проекций образцов. Далее, на основе полученных теневых проекций, была построена модель реконструкции в программе NRecon. В режиме предварительного просмотра использовались параметры: сглаживание 2, коррекция кольцевых дефектов 9%, коррекция упрочнения луча 0%, количество режущих плоскостей 1200, HUmin -712, HUmax 947. Изображения трехмерных моделей образцов были получены с помощью программы Cityvox, входящей в комплект программного обеспечения для томографа. Для создания объемных моделей использовался алгоритм Marching Cube, который работает по принципу построения поверхности на основе явной гексагональной воксельной модели, разработанной Лоренсеном и Клайном (1987).

Элементный анализ. Элементный анализ проводился на приборе LECO TruSpec MICRO (США).

Приготовление пленок. Приготовленный гель ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ и $c_{\text{общ}}=13$ масс. %) при комнатной температуре 25 °С наносили на силиконовую подложку и оставляли при температуре 37 °С на 20 минут.

Расчет радиуса вращения и гидродинамического радиуса. Расчеты были выполнены для водного раствора ПНИПАМ, для которого комнатная температура (25 °С) является оптимальными условиями растворения, а температура выше самой низкой критической температуры растворения ПНИПАМ (37 °С) - неблагоприятными условиями растворения. Радиус вращения был рассчитан для хорошего (R_g^{25}) и плохого (R_g^{37}) растворителя на основе уравнений (3) и (4), соответственно [204,205]:

$$R_g^{25} = b^{1/5} \cdot N^{3/5} \cdot v^{2/5} \quad (3)$$

$$R_g^{37} = b^{2/3} \cdot N^{1/3} \cdot v^{1/3} \quad (4)$$

где b – размер мономера (0.63 нм для 25 и 37 °С) [206], N – степень полимеризации ($N = M_n / M_{\text{мономер}} = 353$ для 25 и 37 °С, где M_n – это молекулярная масса полимера (40,000) и $M_{\text{мономер}}$ – молекулярная масса мономера (113.16)), v – исключенный объем (0.54 и 0.38 nm³ для 25 и 37 °С, соответственно) [207]. Гидродинамический радиус для хорошего (R_{gr}^{25}) и плохого (R_{gr}^{37}) растворителя получен по уравнению (5):

$$R_{gr}^T = R_g^T / n_T \quad (5)$$

где n_T – это соотношение между экспериментально определенной скоростью вращения и гидродинамическим радиусом, значение n_T было взято из литературы и составило 1,45 и 0,77 для хорошего и плохого растворителя, соответственно [208].

Соотношение объемных долей между ПНИПАМ и НКЦ, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$, было посчитано согласно уравнению (6):

$$P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = \frac{4/3 \cdot \pi \cdot R_{gr}^3 \cdot N_{\text{клубок}}}{m_{\text{НКЦ}} \cdot \rho_{\text{НКЦ}}} \quad (6)$$

где R_{sp} - гидродинамический радиус при соответствующих условиях (плохой или хороший растворитель), $N_{\text{клубок}}$ - количество клубков ПНИПАМ в смеси определяется как $N_{\text{клубков}} = N_A \cdot m_{\text{ПНИПАМ}} / M_n$ (где N_A - это число Авагадро, $m_{\text{ПНИПАМ}}$ - это масса ПНИПАМа в смеси), $m_{\text{НКЦ}}$ - масса НКЦ в смеси и $\rho_{\text{НКЦ}}$ - плотность НКЦ, 1,5 г/см³ [209].

Количество клубков ПНИПАМ на одну НКЦ, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N$, посчитано согласно уравнению (7):

$$P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N = \frac{N_{\text{клубков}}}{N_{\text{НКЦ}}} \quad (7)$$

где $N_{\text{НКЦ}}$ - это количество частиц НКЦ в смеси и, определенных как $N_{\text{НКЦ}} = m_{\text{НКЦ}} / m_{1-\text{НКЦ}}$, and $m_{1-\text{НКЦ}}$ это масса 1 частицы НКЦ, то есть $m_{1-\text{НКЦ}} = \rho_{\text{НКЦ}} \cdot \pi \cdot R_{\text{нкц}} \cdot L_{\text{нкц}}$ ($R_{\text{нкц}}$ - это радиус НКЦ, 8.3 ± 1.9 нм, и $L_{\text{НКЦ}}$ - это длина НКЦ, 151 ± 54 нм).

Количество клубков ПНИПАМ на одну НКЦ по площади поверхности, $S_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^T$, был рассчитан при определенной T в соответствии по уравнению (8):

$$S_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^T = \frac{S_{1-\text{НКЦ}}}{S_{1-\text{ПНИПАМ}}} \quad (8)$$

где $S_{1-\text{НКЦ}}$ - представляет собой площадь поверхности одной частицы НКЦ в смеси и определяется как $S_{1-\text{НКЦ}} = 2 \cdot \pi \cdot R_{\text{НКЦ}} \cdot L_{\text{НКЦ}} + 2 \cdot \pi \cdot R_{\text{НКЦ}}^2$, и $S_{1-\text{ПНИПАМ}}$ - это площадь поверхности самого большого поперечного сечения. (диаметр) 1 клубка ПНИПАМ, то есть $S_{1-\text{ПНИПАМ}} = \pi \cdot R_{\text{гр}}^2$.

Реологические исследования. Измерения реологии проводились с использованием реометра Anton Paar MCR 702 (Австрия) с конусообразной геометрией пластины (диаметр 25 мм) и зазором 108 мкм при температуре 25 °С и 37 °С. Для контроля температуры использовалась встроенная пластина Пельтье. Для измерения вязкости при различных скоростях сдвига и модулях хранения системы термостатировали в течение 15 мин при определенной температуре (25 °С или 37 °С). Исследования в осцилляционном режиме проводились с частотой 10 рад/с. Модуль сдвига G' и модуль потерь G''

регистрировались с течением времени (деформация 1 %). Исследования в ротационном режиме проводились в диапазоне скоростей сдвига от 0,1 до 50,0 с⁻¹ для определения динамической (сдвиговой) вязкости η . Восстановление системы после циклов нагрева-охлаждения осуществляли путем определения модуля сдвига G' и модуля потерь G'' при 25 и 37 °C в течение 500 с. Затем цикл повторяли еще раз.

Исследования размягчения при растяжении и повышения жесткости при растяжении были проведены с использованием реометра DHR-1 (TA Instruments) согласно [210]. Для этого был измерен модуль упругости (G') для различных осевых деформаций. Модуль упругости определяли при колебательной деформации сдвига в 1% и частоте 1 Гц, используя параллельную геометрию с диаметром 40 мм. Первоначальный зазор между пластинами составлял 400 мкм. Зазор регулировали таким образом, чтобы изменить осевую деформацию с $\pm 10\%$ (360-440 мкм), и гидрогелям давали возможность выравниваться в течение 1 минуты при каждой осевой деформации.

Приготовление чернил. Чернила для печати с содержанием $c_{\text{общ}} = 13,0$ масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ получали путем смешивания 500 мг 10 масс. % НКЦ и 260 мкл 19 масс. % ПНИПАМ. В полученные чернила добавляли пищевой краситель бромфеноловый синий (0,02 г на 5 мл геля) для лучшей визуализации геля.

Письмо прямой печатью. Чернила с $c_{\text{общ}} = 13.0$ масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ были помещены в шприц с иглой 22G и вручную выдавливались на стеклянную подложку при комнатной температуре (25 °C). Экструдированный рисунок помещали на плитку с 37 °C на 10 минут, и затем охлаждали до комнатной температуры в условиях окружающей среды. Повторяли четыре цикла нагревания-охлаждения.

Биосовместимость гелей. Биосовместимость гелей *in vitro* исследовали с использованием линии клеток эпидермиса человека (A-431). Клетки

культивировали в полистирольных колбах в среде DMEM с добавлением 10% ФБС, 1% пенициллина/стрептомицина при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с содержанием CO₂ в воздухе 5%. Субконфлюэнтные клетки пассировали с использованием трипсин-ЭДТА (0,25% по массе трипсина, 1 мМ ЭДТА). Образцы гелей вводили в лунки 96-луночного планшета в объеме 60 мкл на лунку (n = 3 для каждой гелевой композиции) и инкубировали при комнатной температуре с орбитальным встряхиванием до тех пор, пока гель равномерно не распределялся по поверхности. Перед посевом клеток планшет инкубировали при 37 °С в течение 5 мин. Затем к каждому тестируемому образцу добавляли по 100 мкл среды с 1×10⁴ клетками и инкубировали при 37 °С с 5% CO₂ в течение 72 часов. Лунки планшета (n = 3) использовали в качестве контрольной поверхности. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием стандартного МТТ-анализа, как описано в другом месте [211]. Оптическую микроскопию клеток в ярком свете проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с цветной цифровой камерой (x10). Для этой цели клетки культивировали таким же образом, как описано выше, но в 24-луночном планшете (350 мкл геля на лунку).

Полимеризация НИПАМ. Общая схема синтеза показана на рисунке 47а. В плотно закрытой колбе при комнатной температуре в атмосфере аргона 5 г N-изопропилакриламида (НИПАМ) растворяют в 6 мл растворителя N,N - диметилформамид (ДМФА). После полного растворения в колбу по каплям добавляют 0,208 г ОПЦ-агента (2-(додецилтиокарбонотиоилтио)-2-метилпропионовой кислоты, 3-азидо-1-пропанолевого эфира), растворенного в 2,5 мл ДМФА. Раствор продувают аргоном при комнатной температуре. 0,0088 г инициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) (АИБН), растворенного в 1,5 мл ДМФА, добавляют по каплям с помощью шприца. Сразу после добавления инициатора колбу помещают в ванну с температурой 60 °С на 24 часа в потоке инертного газа. После реакции синтезированный

полимер выделяют в нерастворителе (диэтиловый эфир) и сушат на воздухе. Затем определяют молекулярную массу полученного полимера.

Модификация НКЦ. Перед прививкой ПНИПАМ к НКЦ в НКЦ добавляются пропаргильные группы. Для этого 100 мл НКЦ растворяют в 100 мл диметилсульфоксида (ДМСО) до образования однородного раствора (от 1 до 2 часов). К раствору добавляют 0,31 г NaOH и перемешивают при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого добавляют 870 мкл пропаргилбромида (80 масс. % раствор в толуоле). Полученную смесь оставляют при перемешивании на 2 дня при температуре 30 °С. Для очистки используют 7-дневный диализ.

Методика прививки ПНИПАМ к НКЦ. Соотношение полимеров зависит от степени прививки. Образец ПНИПАМ после полимеризации (макро-ОПЦ-агент) помещался в круглодонную колбу. Добавлялось равное количество воды и рассчитанное количество модифицированной НКЦ. Перемешивалось в закрытой колбе без инертной атмосферы в течение 2 часов до полного растворения. После растворения создавалась проточная инертная атмосфера (N₂) от 10 до 15 минут. Через шприц добавлялись взвешенные порции сульфата меди(II) и аскорбиновой кислоты, предварительно растворенных в воде. Оставлялось при перемешивании от 36 до 72 часов. Для очистки оставлялось на диализ 7 дней.

Гель-проникающая хроматография (ГПХ). ГПХ (хроматограф Viscotek 305 MAX), оснащенный рефрактометрическим детектором, с использованием набора из одной колонки Viscotek T200 (6 мкм), одной колонки для геля MIXED-E PL (3 мкм), одной колонки для геля MIXED-C PL (5 мкм) и одной защитной колонки PL диаметром 10 мм (50 мм × 7,5 мм) использовали для характеристики молекулярно-массового распределения с использованием калибровочных стандартов поли(метилметакрилата). Анализы проводили при температуре 60°C с использованием нагревателя Elder CH-150. В качестве подвижной фазы использовали 0,1 масс. % LiBr в ДМФА с расходом 1 мл/мин.

ПНИПАМ-СООН растворяли в ДМФА (≈ 2 мг/мл) и фильтровали через мембраны из ПТФЭ толщиной 0,2 мкм перед инъекцией.

Биологическая оценка НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК. Для оценки биологической активности гидрогелевой композиции ПТК в клетках T98G использовали 9 масс. % растворы НКЦ-графт-ПНИПАМ, содержащие ПТК в концентрациях от 4 до 1000 мкг/мл. В качестве контроля были протестированы растворы ПТК тех же концентраций в двух вариантах: (1) когда клетки высевали на дно лунок и (2) когда клетки высевали на слой гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ (9 масс. %), предварительно нанесенный на дно лунок.

В случае гидрогелей в лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл растворов НКЦ-графт-ПНИПАМ или НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК и инкубировали при 37 °С в течение 20 минут. После этого в лунки необработанного 96-луночного планшета и 96-луночного планшета, содержащего слой гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ на дне лунки, высевали по 5×10^3 клеток в 100 мкл. После 24-часового культивирования клеток среду удаляли и добавляли 100 мкл/лунку раствора ПТК в культуральной среде в тестируемых концентрациях и инкубировали клетки в течение 72 часов. В случае НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК процедура была такой же, как и для НКЦ-графт-ПНИПАМ, но без промежуточной стадии инкубации в течение 24 часов. Все манипуляции с планшетами, содержащими гели, проводились при температуре 37 °С с использованием предварительно инкубированных сред и растворов. Каждую концентрацию ПТК тестировали три раза в двух независимых сериях ($n = 6$). Концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) (показатель эффективности лекарственного препарата или лиганда при ингибировании биологического процесса) ПТК были определены с использованием функции зависимости дозы от OriginPro 8.6 на основе зависящих от концентрации нормализованных данных о жизнеспособности клеток, подобранных с использованием функций подгонки нелинейной кривой/роста/сигмовидной формы/зависимости от дозы.

Высвобождение ПТК из гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ. В каждую лунку 24-луночного планшета в трех повторах добавляли по 350 мкл 9 масс. % раствора НКЦ-графт-ПНИПАМ, содержащего 14 мкг ПТК, и инкубировали в геле при 37 °С в течение 20 минут. После этого в лунку, содержащую слой геля, добавляли 500 мкл 0,01 М натрий-фосфатного буфера, содержащего 150 моль/л NaCl (ПБС), pH 7,4, и инкубировали при 37 °С. Через определенные промежутки времени буфер заменяли свежей порцией. Собранные растворы лиофилизировали и затем растворяли в 100 мкл ацетонитрила. ПТК определяли количественно методом обратнофазной ВЭЖХ с УФ-детекцией ($\lambda=237$ нм) с использованием колонки ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм) фирмы Agilent (Калифорния, США). Скорость потока подвижной фазы составляла 0,5 мл/мин, объем инъекционного контура – 20 мкл. Анализ проводили методом изократического элюирования с использованием 40 % ацетонитрила в деионизированной воде. Время удержания паклитаксела составило 7,8 мин. Данные были обработаны с помощью программного обеспечения MS Excel (Microsoft, США) для расчета среднего значения в каждый момент времени и стандартного отклонения ($n = 6$).

Кривая высвобождения ПТК была рассчитана с помощью ряда математических моделей (нулевого порядка, первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса, Бейкера–Лонсдейла, Хопфенберга, Вейбулла, Гомперца и Пеппаса–Сахлина) [212] с использованием DDSolver add.-в программе Microsoft Excel [213].

Получение первичной культуры астроцитов. Астроциты выделяли из коры головного мозга крыс линии Wistar возрастом 1-2 день. Кору измельчали скальпелем в холодном растворе ПБС (Gibco Life Technologies, США). Полученные ткани инкубировали в растворе 0,05 % трипсина и 0,02 % ЭДТА (Gibco Life Technologies, США) в течение 15 минут при 37 °С. Затем дважды промывали раствором ПБС и ресуспендировали в ростовой среде, содержащей

минимальную среду Игла на солях Эрла (MEM) с добавлением 10% ФБС (фетальной бычьей сыворотки), 2 ммоль глутамина (Gibco, Великобритания), 10 ммоль буфера HEPES (Sigma, США) и 2 мг/мл NaHCO_3 . Клеточную суспензию высевали на чашку Петри, покрытую поли-L-лизинем (Sigma, США), и культивировали при 37 °C, 5 % CO_2 для получения монослоя (от 5 до 7 дней *in vitro*). После этого их переносили в 96-луночный планшет для дальнейших экспериментов.

Получение первичной культуры эндотелиальных клеток. Клетки церебрального эндотелия микрососудов были выделены из коры головного мозга крыс линии Wistar возрастом от 14 до 21 дней. Вкратце, кору измельчали на кусочки в холодном растворе HBSS (Gibco Life Technologies, Великобритания), ресуспендировали и трижды центрифугировали. После этого к осадку добавляли 20 % БСА (Sigma, США) и повторно центрифугировали. Полученный супернатант подвергали ферментативной диссоциации в коллагеназе/диспазе (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч при температуре 37 °C в роллерной установке. Клетки высевали в чашки Петри, покрытые матригелем, и культивировали при 37 °C, 5 % CO_2 для получения монослоя (от 5 до 7 дней *in vitro*). Ростовая среда для церебрального эндотелия содержала DMEM-F12 (GIBCO, США), 20 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Австрия), 2 ммоль глутамина (glutaMAX, Gibco, Великобритания) и 16,6 ммоль глюкозы. После этого их переносили в 96-луночный планшет для дальнейших экспериментов.

Иммуноокрашивание. Для оценки экспрессии белков клетки церебрального эндотелия и астроцитов промывали ПБС 3 раза по 5 мин. Затем фиксировали в 4 % формалине в течение 10 мин при температуре 4 °C, после чего промывали в ПБС 3 раза по 5 мин. Фиксированные клетки пермеабелизировали в 0,1 % растворе Triton X-100 на ПБС (Calbiochem Biochemicals, США) и инкубировали в 2 % растворе БСА (Sigma, США) в течение 10 мин при температуре 4 °C с последующей промывкой в ПБС (3 раза

по 5 минут). Затем клетки инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте с первичными антителами (Abcam, Великобритания) в разбавителе ИНС (Novocastra, Leica, Великобритания): мышинное моноклональное анти-PCNA (ab29, 5 мкг/мл, Abcam, Великобритания); кроличье поликлональное анти-ZO1 (AF5145, 1:200, Affinity, Китай); кроличье моноклональное анти-GFAP (ab68428, 1 мкг/мл, Abcam, Великобритания). Затем клетки трижды промывали в 0,1 % растворе Triton X-100 в ПБС в течение 5 мин и инкубировали со вторичными Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594, конъюгированными ослиными и козлиными антителами против кроличьего и против мышинного IgG (Abcam, Великобритания, 1:500) в течение 2 часов. Цифровые изображения были получены с использованием системы визуализации EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Оценка апоптоза. Определение апоптоза проводили с использованием набора TUNEL (Elabscience, США). Клетки помещали в раствор охлажденного 4 % формалина и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После двукратной промывки ПБС по 5 минут клетки инкубировали в 100 мкл раствора протеинкиназы К из набора TUNEL в течение 10 мин при 37 °С. Затем промывали ПБС 3 раза по 5 минут. Следующим шагом было добавление 100 мкл днказного буфера из набора к каждому образцу с последующей 30-минутной инкубацией при 37 °С и промывкой ПБС 3 раза по 5 минут. Затем добавляли 100 мкл уравнивающего буфера TdT с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37 °С и 50 мкл рабочего раствора, состоящего из 35 мкл уравнивающего буфера TdT, 10 мкл раствора для мечения, 5 мкл TdT и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После 3-кратной промывки ПБС в течение 5 минут клетки окрашивали раствором DAPI в течение 5 минут и окрашенные срезы анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием фильтра TRITC.

Трансфекция. Трансфекция проводилась в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, 0,3 мкл липофектамина 3000 на 100 мкл смешивали с 5 мкл среды DMEM без сыворотки, затем смешивали 2 мкг pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene, США), 0,2 мкл P3000 и 5 мкл DMEM без фетальной бычьей сыворотки. Затем смешивали по 5 мкл каждого приготовленного рабочего раствора, инкубировали в течение 10 мин и добавляли в лунки 96-луночного планшета для трансфекции клеток. Через 24 часа питательную среду с липофектамино 3000 и pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) заменяли свежей DMEM с 10 % сывороткой, культивировали в течение 2 дней и затем визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ. Результаты иммуноокрашивания и оценки апоптоза были обработаны с использованием U-критерия Манна-Уитни. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Рентгеновская дифракция. Рентгенограммы были получены в геометрии Брэгга-Брентано с помощью дифрактометра Rigaku Smartlab SE с использованием Cu K α 1,2 radiation ($\lambda_1=1.54059$ Å, $\lambda_2=1.54441$ Å, K α 1/ K α 2 соотношение 0.497, 50 кВ, 40 мА) и D/teX Ultra 250 детектор. Образцы были накоплены в 2 θ диапазоне от 3 до 100°, ширина шага составляла 0.01°, 5 °/мин.

Приготовление термочувствительных чернил. Для получения термочувствительных чернил 0,5 г НИПАМ, 10 мг N,N'-метиленабисакриламида (кросс-линкер) и 5 мг 1-гидроксициклогексилфенилкетона (УФ-инициатор) растворяли в 5 мл дистиллированной воды и смешивали с 60 мкл 6 масс. % раствора альгината натрия. Прекурсор набирали в шприц с иглой 22G и вручную выдавливали на силиконовую подложку при комнатной температуре (25 °C) и оставляли под УФ-облучением на расстоянии 10 см от УФ-лампы (1730 Лм) на 15 минут. Происходит УФ-полимеризация НИПАМ, и система превращается в гель.

После помещения этого геля в водный раствор CaCl_2 улучшаются его механические свойства за счет образования ионных сшивок.

Синтез магнетита. Магнетит был синтезирован ранее описанным способом [214]. 2,5 г тетрагидрата хлорида железа(II) и 5 г гексагидрата хлорида железа(III) растворяли в 100 мл воды при постоянном перемешивании (600 об/мин). Затем к этому раствору комнатной температуры добавляли 10 мл водного раствора аммиака (20 масс. %). Полученный черный осадок осаждали с помощью магнита и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Промытый осадок смешивали со 100 мл воды и подвергали ультразвуковой обработке (37 кГц, 110 Вт) при постоянном перемешивании (500 об/мин) в течение 120 мин. Массовая доля полученного магнетита составляла до 2 масс. %.

Приготовление магнитных чернил. Для получения магнитных чернил к 500 мг водной дисперсии нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) добавляли 30 мкл золя магнетита. Их перемешивали на вортексе при высокой скорости до получения однородного материала. К полученной системе добавляли 240 мкл 6 масс. % раствора альгината натрия.

Измерение магнитных характеристик образцов. Измерения магнитного момента проводились на магнитометре SQUID MPMS 3 (Quantum Design Inc.). Получены зависимости магнитного момента от изотермического поля в диапазоне магнитных полей от - 70 кЭ до + 70 кЭ при температурах 296,15 К и 310,15 К. Удельную намагниченность M рассчитывали с использованием экспериментально полученного магнитного момента u по формуле $M = u/m$, где m - масса порошка.

Набухание. Перед исследованием образцы термочувствительных и магнитных чернил высушивали при температуре 40 °С. Высушенные образцы помещали в раствор дистиллированной воды и регистрировали время. Через определенные промежутки времени образцы вынимали и взвешивали.

Изготовление актюатора. Актюатор был собран из чередующихся полосок двух типов чернил методом прямого нанесения чернилами. Магнитные и термочувствительные чернила были набраны в шприц с иглой емкостью 22G и вручную выдавлены на силиконовую подложку при комнатной температуре (25 °C). После нанесения на силиконовую подложку его поместили под ультрафиолетовую лампу (1730 Лм) на 15 минут для УФ-полимеризации. Расстояние от подложки с материалом до лампы составляло 10 см. После окончания реакции сверху наносили избыток насыщенного раствора хлорида кальция, чтобы скрепить полоски вместе.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Физический гель на основе ПНИПАМ

В данной части работы было исследовано физическое гелеобразование коллоидной системы, основанное на физических взаимодействиях между анизотропными стержневыми наночастицами нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) и термочувствительным поли(N-изопропилакриламидом) (ПНИПАМ).

3.1.1 Формирование и характеристика физического геля

Гелеобразование водной дисперсии анизотропных стержневых наночастиц (НКЦ) и водного раствора термочувствительного полимера (ПНИПАМ) изучалось при соотношении компонентов по массе ПНИПАМ / НКЦ = 0,5 – 4,0 (здесь и далее массовое соотношение будет обозначено как $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$) и общей массовой концентрации, $C_{\text{общ}}$, от 4 до 16 масс. %. Размеры НКЦ были рассчитаны по изображению ПЭМ: длина составляет 151 ± 54 нм, диаметр – 16 ± 4 нм (рисунок 26).

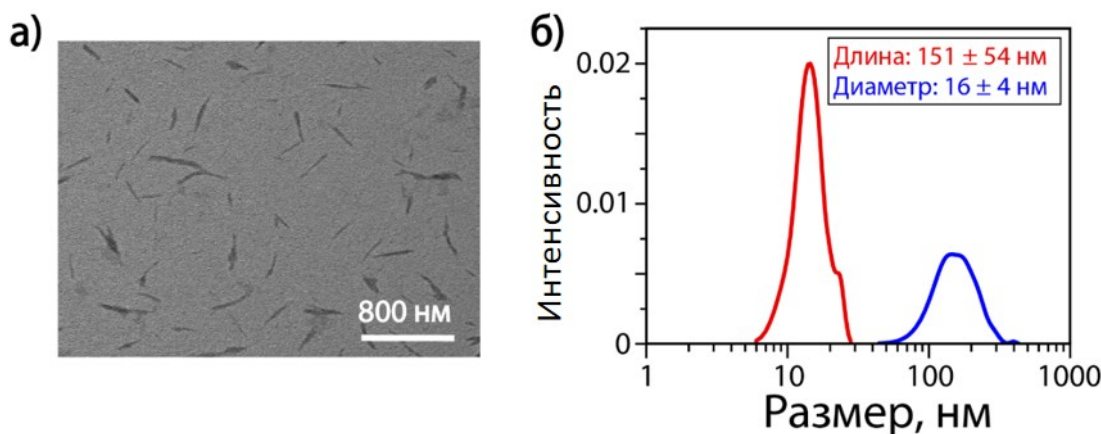


Рисунок 26 – (а) ПЭМ изображения НКЦ, (б) размер (длина и диаметр) НКЦ

Коллоидная стабильность НКЦ обусловлена полуэфирным группам - SO_3H и концентрация этих групп составляет 32 ммоль/г, основываясь на содержании серы как 1.03 масс. %. Полученные коллоидные гели были образованы из-за сил истощения (depletion forces), связанных с экранированием заряда НКЦ цепями ПНИПАМ, действующими как

обеднитель (depletant) [215,216]. Адсорбция ПНИПАМ на поверхности НКЦ достигалась за счет физических взаимодействий, а именно образования водородных связей между группами $-\text{OH}$ и $-\text{SO}_3\text{H}$ у НКЦ и $-\text{NH}$ и $-\text{C}=\text{O}$ группами ПНИПАМ, а также гидрофобных взаимодействий (рисунок 27а).

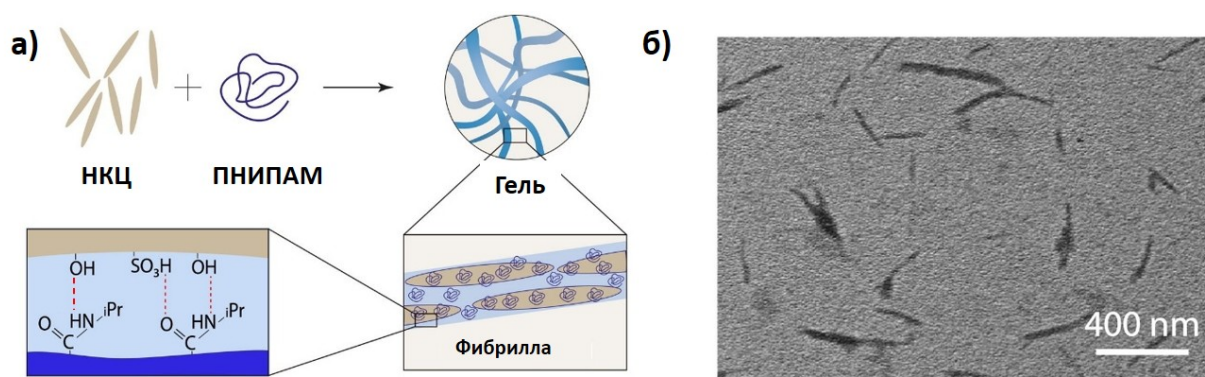


Рисунок 27 – (а) Схема образования коллоидного геля из водной дисперсии НКЦ и водного раствора ПНИПАМ, (б) СЭМ изображение НКЦ

Высушенный гель анализировали методом ИК-Фурье спектроскопии. Рисунок 28 показывает ИК-Фурье спектры для исходных компонентов (НКЦ и ПНИПАМ) и для геля с $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ и $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %.

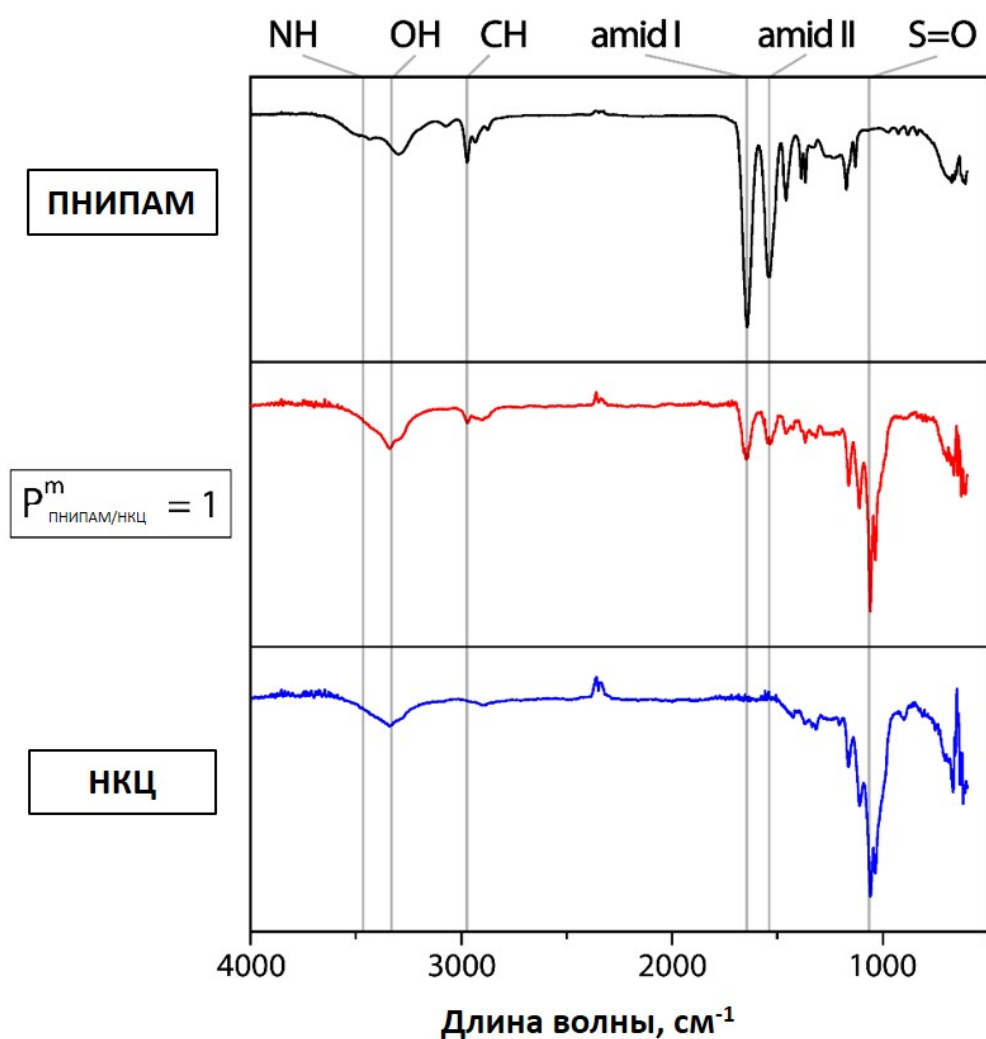


Рисунок 28 – ИК-Фурье спектр для ПНИПАМ (верхний), образец с

$P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ и $c_{\text{общ}} = 13$ масс. % (середина) и НКЦ (внизу)

Согласно ИК-Фурье спектрам (рисунок 28), ПНИПАМ характеризуется полосой 1643 см^{-1} (амид I, пептид $\nu\text{C=O}$), 1537 см^{-1} (амид II, изгиб $\nu\text{N-H}$ в сочетании с растяжением $\nu\text{C-H}$), 3403 см^{-1} ($\nu\text{N-H}$), 2971 см^{-1} ($\nu\text{C-H}$ в изопропиловой группе). Для НКЦ характеристическими являются полосы при 3201 см^{-1} ($\nu\text{O-H}$), 1059 см^{-1} ($\nu\text{S=O}$) и 1162 см^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$). Образец геля характеризуется наличием групп как ПНИПАМ, так и НКЦ: 3339 см^{-1} ($\nu\text{O-H}$ из НКЦ), 2970 см^{-1} ($\nu\text{C-H}$ изопропильной группы ПНИПАМ), 1648 см^{-1} (амид I, пептид $\nu\text{C=O}$), 1562 см^{-1} (амид II, изгиб $\nu\text{N-H}$ в сочетании с растяжением $\nu\text{C-H}$), 1059 см^{-1} ($\nu\text{S=O}$ от НКЦ).

Полученные гели обладают термочувствительными свойствами и были полупрозрачны при комнатной температуре и становились непрозрачными при повышении температуры выше нижней критической температуры растворения (НКТР) ПНИПАМ (рисунок 29).

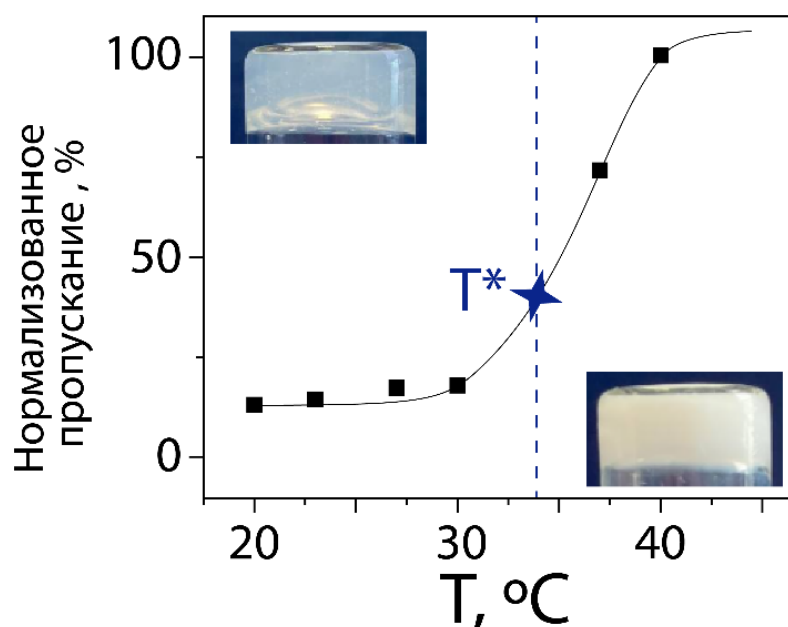


Рисунок 29 – Изменение нормированного пропускания для геля с $c_{\text{общ}} = 9.0$ масс. %, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$. Сплошная линия дана для ориентирования. На вставке слева и справа приведены фотографии геля при 25 и 37 °C соответственно

Путем изменения $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ и $c_{\text{общ}}$ была получена диаграмма состояния коллоидной системы ПНИПАМ / НКЦ при комнатной температуре (25 °C) и 37 °C (рисунок 30а, б). При 25 °C образовывался гель при $c_{\text{тот}} > 8$ масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ от 0,5 до 1,7 (рисунок 30а, область геля), в то время как при остальных соотношениях система выглядела как однородная полупрозрачная жидкость (рисунок 30а, область золя).

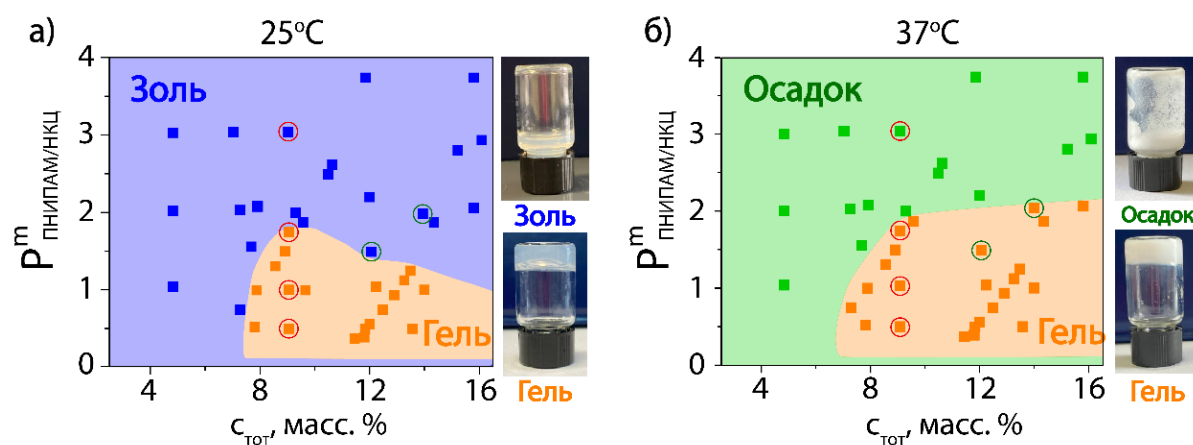


Рисунок 30 – (а) Диаграммы состояния водной дисперсии НКЦ и ПНИПАМ при 25 °С; (б) 37 °С. Точки, для которых реология была исследована дополнительно, отмечены оранжевыми кружками, в то время как точки, которые представляют собой гель при 37 °С и золь при 25 °С, отмечены зелеными кружками

Интересно, что составы, а именно $c_{\text{общ}} = 14$ масс. %, $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 2,0$ и $c_{\text{тот}} = 12$ масс. %, $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1,5$, которые находились в жидком состоянии при 25 °С, образовывали гель при 37 °С (рисунок 30а, б отмечены зелеными кружками). Размер НКЦ, а также его дзета-потенциал не меняются при переходе температуры от 25 до 37 °С (рисунок 30а, б).

Гидродинамический диаметр, D_h , НКЦ и ПНИПАМ измеряли методом динамического рассеяния света при 25-37 °С (рисунок 31а). Для НКЦ D_h не изменялся при переходе температуры от 25 до 37 °С и составлял 197 и 141 нм соответственно. Для ПНИПАМ D_h значительно снизился при переходе от 25 к 37 °С и составил 42 и 17 нм соответственно (21 и 8 нм для R_h), что согласуется с ранее представленными данными [217]. Дзета-потенциал НКЦ, ζ , оставался постоянным при изменении температуры и составлял -44 и -43,5 мВ при 25 и 37 °С соответственно (рисунок 31б).

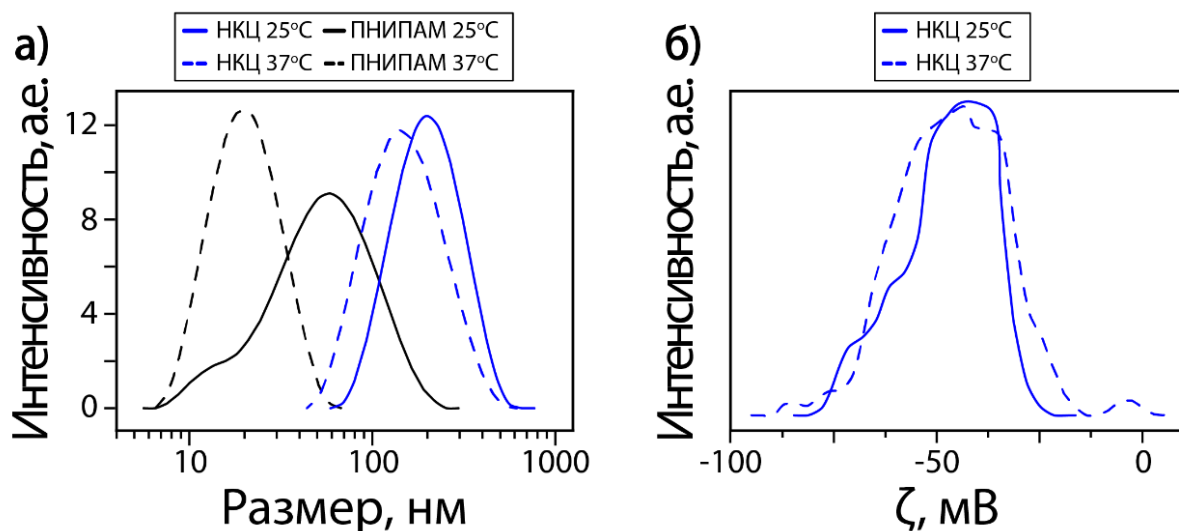


Рисунок 31 – (а) Гидродинамический диаметр ПНИПАМ и НКЦ при 25 и 37 °С, (б) дзета-потенциал для НКЦ при 25 и 37 °С

Мы связываем это с изменением объемного соотношения ПНИПАМ / НКЦ, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$, из-за перехода ПНИПАМ из «спирали в глобулу» выше НКТР. Этот переход привел к резкому изменению гидродинамического радиуса ПНИПАМ, R_g , с 24,2 нм для хорошего растворителя (вода при 25 °С) до 4,1 нм для плохого растворителя (вода при 37 °С) и изменению R_h с 16,7 нм для хорошего растворителя (вода при 25 °С) до 5,4 нм для плохого растворителя (вода при 37 °С). Экспериментальные значения, полученные с помощью ДЛС для R_h , были немного выше расчетных и составили 21 и 8 нм при 25 и 37 °С соответственно (рисунок 31). В таблице 1 показана разница в соотношениях объема, массы, площади поверхности и количества частиц для $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}$ при 25 и 37 °С.

Таблица 1 – Объемные, массовые соотношения и площади поверхности и количества частиц между ПНИПАМ и НКЦ при хороших условиях растворителя (25 °С) и плохих условиях растворителя (37 °С)

Образец	$C_{\text{общ}}$ масс. %	$R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$	$R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N$	$R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$		ψ		$S_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}$		Состояние системы	
				25 °С	37 °С	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С
S-1	9	3,0	2201	1325	44	0,32	0,05	20	194	золь	осадок
S-2	9	1,7	1247	751	25					гель	гель
S-3	9	1,0	734	442	15					гель	гель
S-4	9	0,5	367	221	7					гель	гель
S-5	14	2,0	1467	884	30					золь	гель

$C_{\text{общ}}$ - общая весовая концентрация;

$R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ - массовое соотношение;

$R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N$ - соотношение между клубками ПНИПАМ и частицами НКЦ;

$R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$ - объемное соотношение;

ψ - соотношение размеров;

$S_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}$ - максимальная площадь заполнения поверхности частиц.

Осаждение происходит за счет взаимодействия клубков ПНИПАМ друг с другом и имеет обратимый характер (рисунок 32).

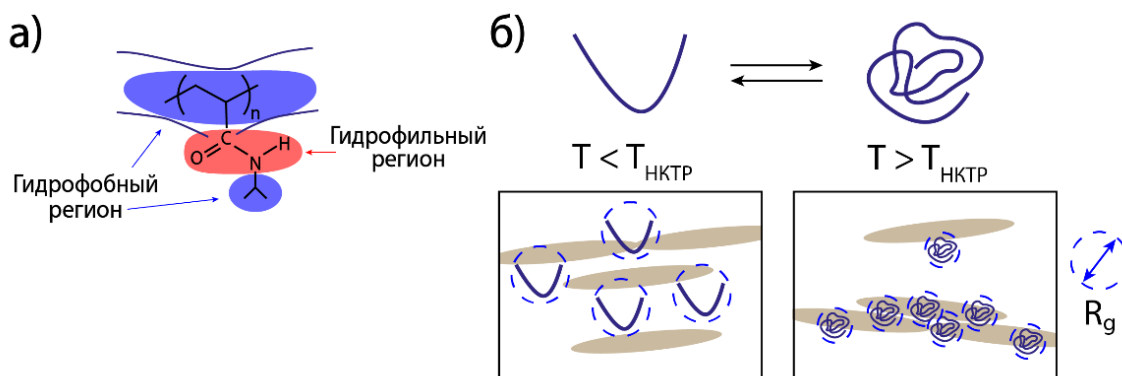


Рисунок 32 – (а) Структура ПНИПАМ с выделенными гидрофильными и гидрофобными областями, (б) схема перехода спирали ПНИПАМ в глобулу (вверху) и схема осаждения смеси НКЦ с избытком ПНИПАМ (внизу)

Ниже НКТР взаимодействие между ПНИПАМ, ОН-группами НКЦ и растворителем предпочтительнее, в то время как выше НКТР ПНИПАМ имеет тенденцию к гидрофобному взаимодействию с НКЦ или с другой цепью ПНИПАМ, что приводит к осаждению избытка ПНИПАМ [218].

Благодаря анизотропной форме НКЦ сформированные на его основе гели имеют фибриллярную структуру [219,220], в то время как чистый полимер не имеет определенной структуры (рисунок 33д).

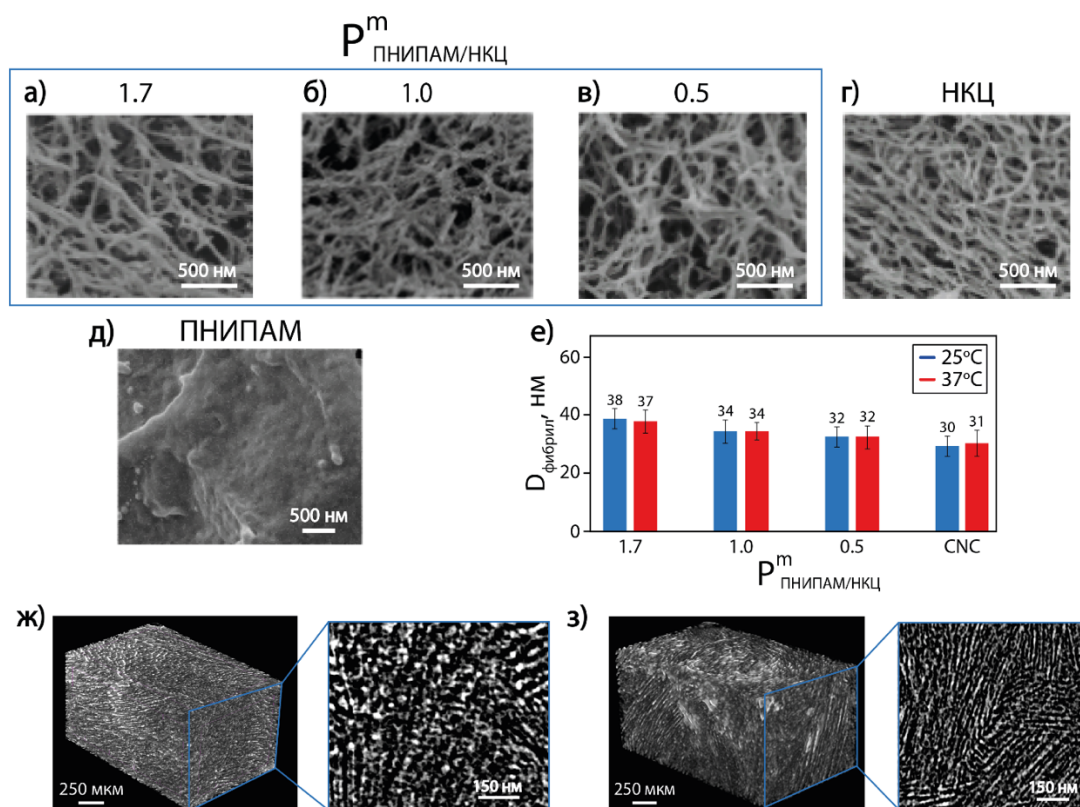


Рисунок 33 – (а-в) СЭМ-изображение гелей, полученные при 25 °С с

$c_{\text{ТОТ}} = 9$ масс. % и различными соотношениями ПНИПАМ и НКЦ:

$P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,7$ (а), $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$ (б) и $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 0,5$ (в), (г) СЭМ-

изображение геля, полученное путем добавления соли к НКЦ, (д) СЭМ-

изображение высушенного ПНИПАМ, (е) средний диаметр фибрилл при

различных соотношениях $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$, рассчитанных на основе изображений

СЭМ, (ж-з) изображения структуры гелей $c_{\text{ТОТ}} = 13$ масс. % и массового

соотношения $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$, полученных с помощью рентгеновской

микротомографии при 25 °С (ж) и 37 °С (з)

Ранее было продемонстрировано, что фибриллярные гели могут образовываться путем физического сшивания НКЦ, вызванного добавлением соли [221]. Здесь мы используем ПНИПАМ для образования геля. Основываясь на литературе, фибриллярная структура для гелей на основе ковалентно сшитых НКЦ и полимера может быть достигнута при соотношениях $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m < 10$ [222]. Таким образом, гели физически сшиваются под действием сил истощения и в соотношении между НКЦ и полимером находятся в диапазоне фибриллярной структуры $0,5 < R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m < 1,7$. Мы показываем, что путем изменения $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ можно получать фибриллы с различными диаметрами (рисунок 33 а-в), что согласуется с ранее сообщенными данными для гелей, сформированных из НКЦ, ковалентно привитых полимером [222]. С понижением $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ от 1,7 до 0,5 диаметр фибрилл понижается с 38 до 30 нм (рисунок 33а-в). Диаметр фибрилл геля НКЦ, полученного взаимодействием с солью (рисунок 33г), составлял 30 нм, что равно двум диаметрам НКЦ ($\text{НКЦ} = 8,3 \pm 1,9$ нм на основе анализа ПЭМ, рисунок 33а, б). Монотонное увеличение диаметра фибрилл с увеличением концентрации ПНИПАМ связано с адсорбцией полимера на поверхности фибрилл.

Фибриллярная структура на наноуровне приводит к слоистой структуре полученного геля на микроскопическом уровне. Согласно данным томографии, гели имеют пористую структуру с общим объемом порового пространства, V_p , при 25 и 37 °C равным 0.37·и 0.17 мм³. Общая пористость гелей составляла 74 и 73 % при 25 и 37 °C соответственно. Таким образом, структура гелей при 25 и 37 °C была сходной как на нано-, так и на микромасштабном уровнях.

Значения диаметра фибрилл при 37 °C совпадают со значениями при 25 °C в пределах погрешности (рисунок 34). Структура геля выше нижней критической температуры растворения раствора ПНИПАМ (при 37 °C) была

изучена методом СЭМ для различных соотношений $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ (0.5; 1.0; 1.7) и для НКЦ (рисунок 34).

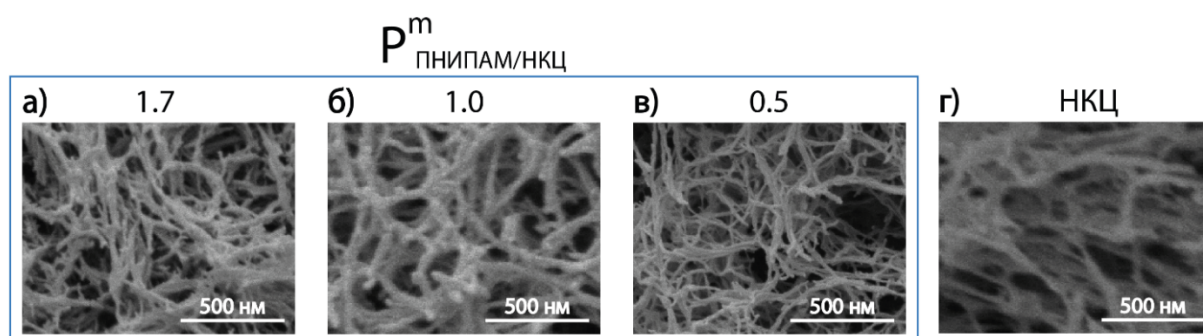


Рисунок 34 – (а-с) СЭМ изображения гелей с различными соотношениями ПНИПАМ и НКЦ: $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,7$ (а), $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$ (б) и $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 0,5$ (в), (г) СЭМ изображения геля, полученного взаимодействием НКЦ и соли. Все изображения были получены при 37 °С

3.1.2 Термочувствительное поведение и эффект pH

Хорошо известно, что гели на основе ПНИПАМ термочувствительны из-за перехода ПНИПАМ из спирали в глобулу при температурах выше низшей критической температуры растворения (НКТР) в воде [223]. Гели, полученные в этой работе, обладали термической чувствительностью, которая выражалась в изменении прозрачности от полупрозрачной при $T < T_{\text{НКТР}}$ (рисунок 35а вверху) до непрозрачной при $T > T_{\text{НКТР}}$ (рисунок 35а внизу).

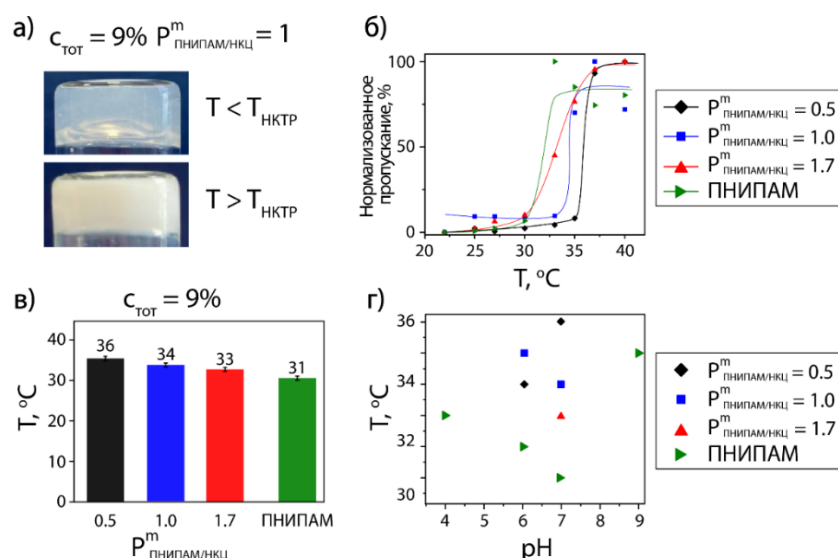


Рисунок 35 – (а) Внешний вид геля с $c_{\text{общ}} = 9$ масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ ниже (25 °C) и выше (37 °C) НКТР, б) температурное изменение пропускания гелей состава с $c_{\text{общ}} = 9$ масс. % и различными соотношениями ПНИПАМ и НКЦ, а именно, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равное 1,7, 1 и 0,5. Сплошные линии даны для ориентирования, (в) значения НКТР раствора ПНИПАМ и гелей с общей концентрацией 9 масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равное 1,7, 1 и 0,5, (г) влияние pH на НКТР гелей и ПНИПАМ. Данные приведены только для систем, которые были стабильны при определенном pH

Ниже НКТР (25 °C) все гели были полупрозрачными, и не было никакой разницы на глаз для композиций с различными общими концентрациями (рисунок 36).

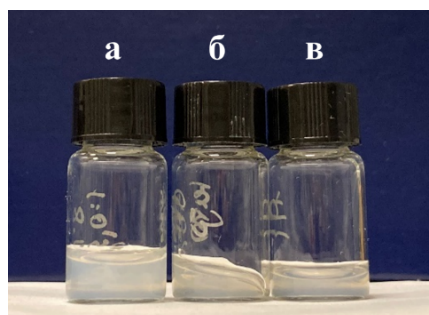


Рисунок 36 – Фотографии гелей (а) $c_{\text{общ}} = 8$ масс. % $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$, (б) $c_{\text{общ}} = 9$ масс. % $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$, (в) $c_{\text{общ}} = 13$ масс. % $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$ при 25 °C

Важно отметить, что термический переход не повлиял на общий объем геля, в отличие от гелей на основе ковалентно сшитого ПНИПАМ, которые разрушаются при резком уменьшении объема [224,225]. Сохранение объема является перспективным для экструзионной печати и некоторых биомедицинских применений, таких как материалы для перевязки ран или импланты.

На рисунке 35б показана зависимость термочувствительных свойств гелей с одинаковой общей концентрацией 9 масс. %, но различающихся по своему составу, а именно, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равные 1,7, 1 и 0,5. Мы обнаружили, что с уменьшением $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ с 1,7 до 0,5 приводят к повышению температуры НКТР геля по сравнению с чистым ПНИПАМ с 31 до 36 °C (рисунок 35в). Это согласуется с литературными данными и объясняется изменением гидрофильного / гидрофобного баланса геля: с уменьшением $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ увеличивается концентрация НКЦ (и, следовательно, гидрофильных групп -ОН и -SO₃H), что сделало среду ПНИПАМ более гидрофильной и, таким образом, увеличило его НКТР [199,208,226]. Таким образом, температуру перехода (НКТР) можно варьировать путем изменения состава геля в биологически значимой области.

Далее мы исследуем влияние pH на стабильность геля для гелей с общей концентрацией 9 масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равный 1,7, 1 и 0,5 (рисунок 35г). Все гели изначально имеют pH 7, поскольку исходные компоненты, дисперсия НКЦ и раствор ПНИПАМ, имеют pH 7. Мы обнаружили, что все гели становятся нестабильными при основном pH ≥ 8 и при кислом pH 4. При слабокислом pH 6 гели с $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равный 1 и 0,5 стабильны, в то время как гель с $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,7$ выпадает в осадок (таблица 2). Влияние pH было приписано изменению дзета-потенциала НКЦ: когда pH отличался от 7, дзета-потенциал увеличивался с -44 мВ до -23 мВ (рисунок 36а), что согласуется с ранее сообщенными данными [227,228]. Таким образом, нестабильность гелей может быть объяснена сниженной коллоидной стабильностью НКЦ.

Изменение pH с 7 до 6 оказывает незначительное влияние на НКТР геля (рисунок 36б, таблица 2).

Таблица 2 продемонстрировала стабильность гелей с общей концентрацией 9 масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$, равным 1,7, 1 и 0,5 при различных значениях pH, и данные НКТР для раствора ПНИПАМ и гелей при различных значениях pH.

Таблица 2 - НКТР температура и стабильность гелей при разном pH

Образец	НКТР, °С и состояние системы (золь, гель, осадок)				
	pH=4	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
ПНИПАМ	33 золь	32 золь	31 золь	N/A золь	35 золь
Гель с $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 0,5$	N/A золь	34 гель	36 гель	N/A золь	N/A золь
Гель с $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$	N/A золь	35 гель	34 гель	N/A золь	N/A золь
Гель с $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,7$	N/A осадок	N/A осадок	31 гель	N/A осадок	N/A осадок

Начальный pH гелей составлял 7, что соответствует pH исходных компонентов – дисперсии НКЦ и раствора ПНИПАМ. Мы обнаружили, что все гели превращаются в твердые вещества или выпадают в осадок при основном pH 8 и 9 и кислом pH 4. При слабокислом pH 6 гели только с для $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равный 1 и 0,5 стабильны. Мы объясняем это более низкой стабильностью НКЦ при pH, отличающемся от нейтрального (рисунок 37а).

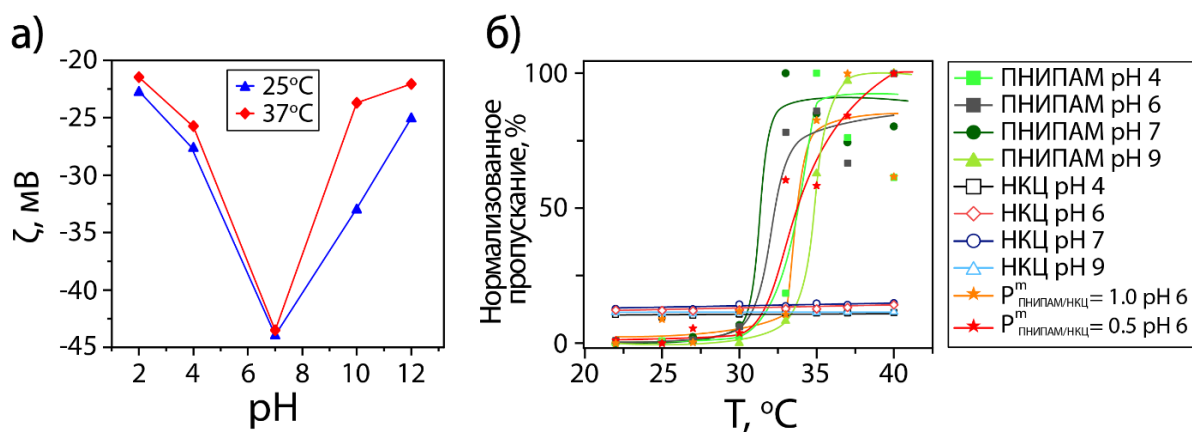


Рисунок 37 – (а) Дзета-потенциал НКЦ в зависимости от рН, (б) временное изменение нормализованного пропускания растворов ПНИПАМ, НКЦ и гелей с общей концентрацией 9 масс. % и различными соотношениями ПНИПАМ и НКЦ, а именно, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ равные 1.7, 1 и 0,5. Сплошные линии даны для ориентирования

На рисунке 37б показана изменение нормализованного пропускания гелей и контроля (раствор ПНИПАМ и дисперсия НКЦ). Однако НКТР соответствующих гелей существенно не изменялся при изменении рН с 7 на 6, в то время как для ПНИПАМ наблюдалось увеличение НКТР, когда рН отличался от нейтрального.

3.1.3 Реологические свойства геля

Были исследованы реологические свойства гидрогелей в зависимости от общей концентрации и соотношений ПНИПАМ и НКЦ. Для соотношения $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ при увеличении $c_{\text{общ}}$ компонентов с 7 до 13 масс. %, модуль сдвига G' изменялся при 25 °С с 180 до 293 Па (рисунок 38а).

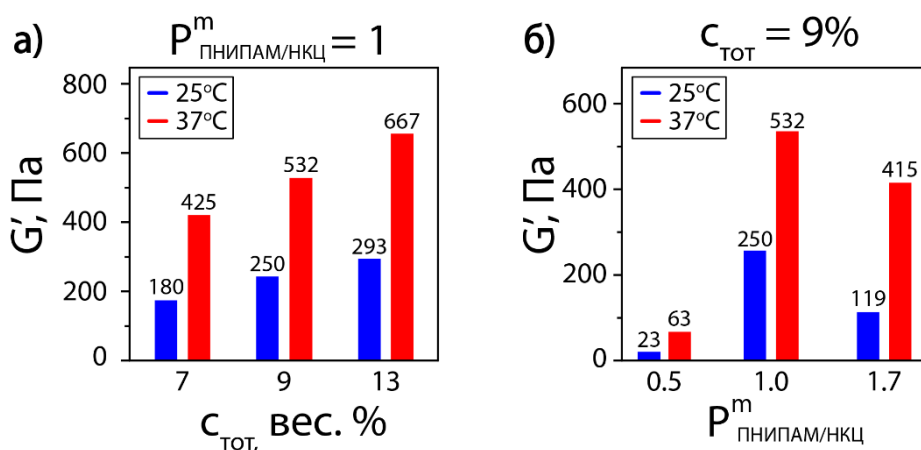


Рисунок 38 – (а) Зависимость значений модуля сдвига G' для гелей с одинаковым $R^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1$ и различными $c_{\text{общ}}$, (б) зависимость значений модуля сдвига G' для гелей с одинаковым $c_{\text{tot}} = 9$ масс. % и различными $R^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}$

Эти данные согласуются с ранее представленными данными для систем на основе смеси полимер-НКЦ, т.е. НКЦ оказывает усиливающее действие на полимерные гели [229]. Значительное увеличение модуля сдвига в 2,1–2,4 раза при 37 °С было связано с более выраженным вкладом сил истощения, обусловленным изменением соотношения размеров ψ и объемной доли полимера, что приводит к уменьшению покрытия поверхности частиц [230]. Значения G' при 37 °С в диапазоне от 425 до 667 Па для соотношений $R^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1$ с увеличением $c_{\text{общ}}$ от 7 до 13 масс. %, соответственно (рисунок 37а). Механические свойства изменяются немонотонно, когда изменяется соотношение компонентов $R^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 0,5 - 1,7$ (рисунок 38б).

Мы исследовали реологические свойства гелей с общей концентрацией 9 масс. % и различными соотношениями ПНИПАМ и НКЦ, а именно для $R^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}$ равные 1,7, 1 и 0.5, где концентрация ПНИПАМ равна 5,7, 4,5 и 3,0 масс. %, соответственно, а концентрация НКЦ равна 3,3, 4,5 и 6,0 масс. %, соответственно. Мы обнаружили, что ПНИПАМ и НКЦ по отдельности в этих концентрациях проявляют поведение, подобное поведению жидкости ($G' < G''$, Таблица 3).

Таблица 3 - Реологические свойства растворов ПНИПАМ и дисперсии НКЦ при различных концентрациях

Образец	25 °С				37 °С			
	G' , Па	G'' , Па	Вязкость, Па·с		G' , Па	G'' , Па	Вязкость, Па·с	
			0.01 с ⁻¹	30 с ⁻¹			0.01 с ⁻¹	30 с ⁻¹
Гель (ПНИПАМ 3,0 масс% и НКЦ 6,0 масс%)	23	18	120	1	63	32	550	3
ПНИПАМ (3,0%)	0.000 016	0,31	1	0,03	Система не является однородной. Осадок.			
НКЦ (6,0%)	2,0	2,5	2	0,2	6,0	6,1	30	0,2
Гель (ПНИПАМ 4,5 масс. % и НКЦ 4,5 масс. %)	250	68	300	2	532	87	900	5
ПНИПАМ (4,5%)	0,000 12	1,5	1	0,03	Система не является однородной. Осадок.			
НКЦ (4,5%)	1,2	3,5	2	0,2	3,1	4,2	7	0,2
Гель (ПНИПАМ 5,7 масс. % и НКЦ 3,3 масс. %)	119	45	220	2	415	75	850	2
ПНИПАМ (5,7%)	0,22	2,1	2	0,02	Система не является однородной. Осадок.			
НКЦ (3,3%)	0,6	1,7	1	0,02	0,6	1,9	3	0,02

Были показаны иллюстрации внешнего вида только раствора ПНИПАМ и только дисперсии НКЦ при 25 и 37 °С.

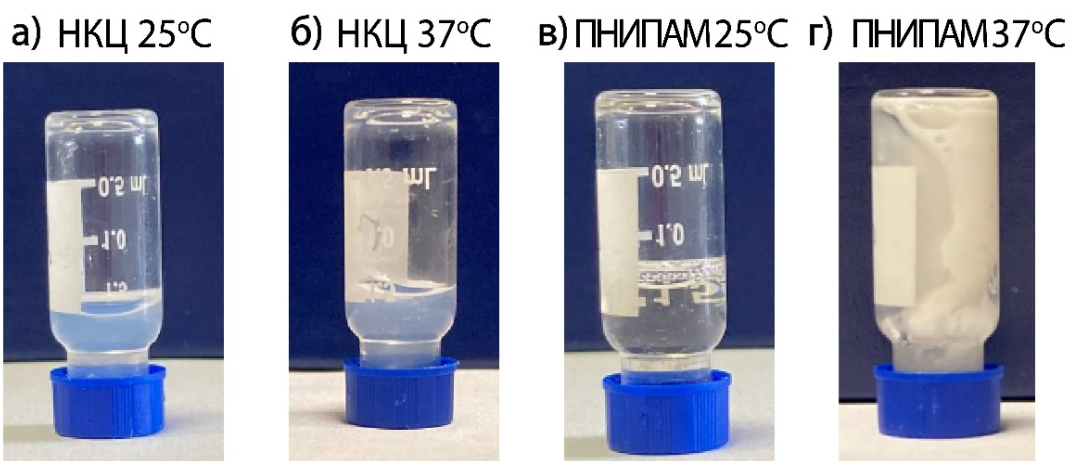


Рисунок 39 – Фотографии водной дисперсии НКЦ при 25 °С (а) и 37 °С (б), фотографии водного раствора ПНИПАМ при 25°С (в) и 37°С (г)

Дисперсия НКЦ выглядит как непрозрачная жидкость как при 25 °С, так и при 37 °С (рисунок 39а, б), в то время как растворы ПНИПАМ проявляются в виде прозрачной жидкости при 25 °С и в виде белого осадка при 37 °С (рисунок 39в,г).

Исследованы реологические свойства гидрогелей в зависимости от общей концентрации, $c_{\text{общ}}$, объемных соотношений ПНИПАМ и НКЦ, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$, и соотношения чиста частиц, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N$. Для всех выбранных образцов $G' > G''$, где G' – модуль сдвига, G'' – модуль потерь. Механические свойства, в частности G' и G'' , изменяются немонотонно, при соотношениях $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 221-751$ при 25 °С и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 7-25$ при 37 °С (рисунок 40а). При 37 °С, наибольшее значение $G' = 532$ Па при $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 14$ ($G'' = 88$ Па). С увеличением $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$ до 25, модуль понижается до 415 Па ($G'' = 50$ Па). При $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 7$, модуль G' составляет 63 Па ($G'' = 33$ Па). При 25 °С, наибольшее значение $G' = 250$ Па при $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 734$ ($G'' = 62$ Па). Такое же поведение при 37 °С, G' уменьшаться с увеличением $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$ ($G' = 23$ Па при $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 221$ ($G'' = 11$ Па); $G' = 119$ Па при $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 751$ ($G'' = 30$ Па)). При изменении $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N$ (рисунок 40б)

также наблюдается нелинейная зависимость. Максимальное значение $G' = 250$ Па достигается при $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N = 734$ ($G'' = 62$ Па). При $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N = 367$ $G' = 23$ Па ($G'' = 11$ Па). При $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N = 1247$, $G' = 119$ Па ($G'' = 30$ Па).

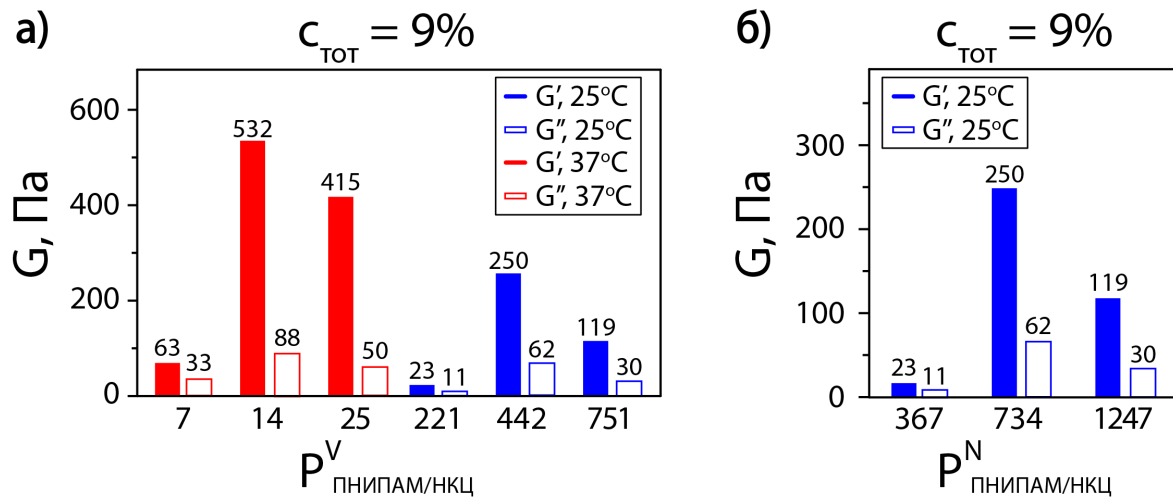


Рисунок 40 – (а) зависимость значений модуля сдвига G' для гелей с одинаковым $c_{\text{tot}} = 9$ масс. % и различными $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V$, (б) зависимость значений модуля сдвига G' для гелей с одинаковым $c_{\text{tot}} = 9$ масс. % и различными $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^N$

Для $c_{\text{tot}} = 9$ масс. %, наибольшее значение модуля сдвига G' было достигнуто при соотношении $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ и составляет 250 Па при 25 °С ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 442$), и 540 Па при 37 °С ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 14$). При соотношении $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 0,5$ G' составляет 23 Па при 25 °С ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 221$), и 63 Па при 37 °С ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 7$). И при соотношении $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,7$ G' составляет 119 Па при 25 °С ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 751$), и 415 Па при 37 °С ($P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^V = 25$). При изменении с $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ до $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,7$ наблюдается снижение G' в 2.1 раза при 25 °С и в 1.3 раза при 37 °С. Чем выше содержание ПНИПАМ в системе, тем выше разница для G' при 25 °С и 37 °С в 3,5 раза (119 и 415) и 2,7 раз (23 и 63) соответственно. В качестве

контрольного эксперимента мы исследовали реологические свойства отдельно только раствора ПНИПАМ и отдельно только водной дисперсии НКЦ. Были выбраны концентрации, эквивалентные концентрациям соответствующих компонентов в геле. Показано, что при 25 °С как ПНИПАМ, так и НКЦ демонстрируют поведение жидкости, т.е. $G' < G''$ (таблица 3, рисунок 39а,б), в то время как их смесь представляет собой гель. При 37 °С НКЦ демонстрирует текучее поведение, т.е. $G' < G''$ (таблица 3, рисунок 39б), и ПНИПАМ выпадает в осадок (рисунок 39г), а их смесь представляет собой гель. Эта немонотонная зависимость определяется существованием оптимальных соотношений ПНИПАМ и НКЦ в области гелеобразования, что приведет к наличию области максимального вклада истощенных сил. Благодаря тому, что гели образуются в результате физических взаимодействий (сил притяжений и водородных связей), они демонстрируют тиксотропные свойства, т.е. снижение вязкости при увеличении скорости сдвига, что очень выгодно для применения гелей в качестве чернил для прямого письма чернилами или 3D-печати на основе экструзии [219]. Гель с $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ был выбран в качестве чернил, поскольку он имеет самые высокие значения G' среди других композиций с другой массовой долей и другими соотношениями. G' увеличивается с 293 Па до 667 Па при повышении температуры с 25 до 37 °С (рисунок 41а).

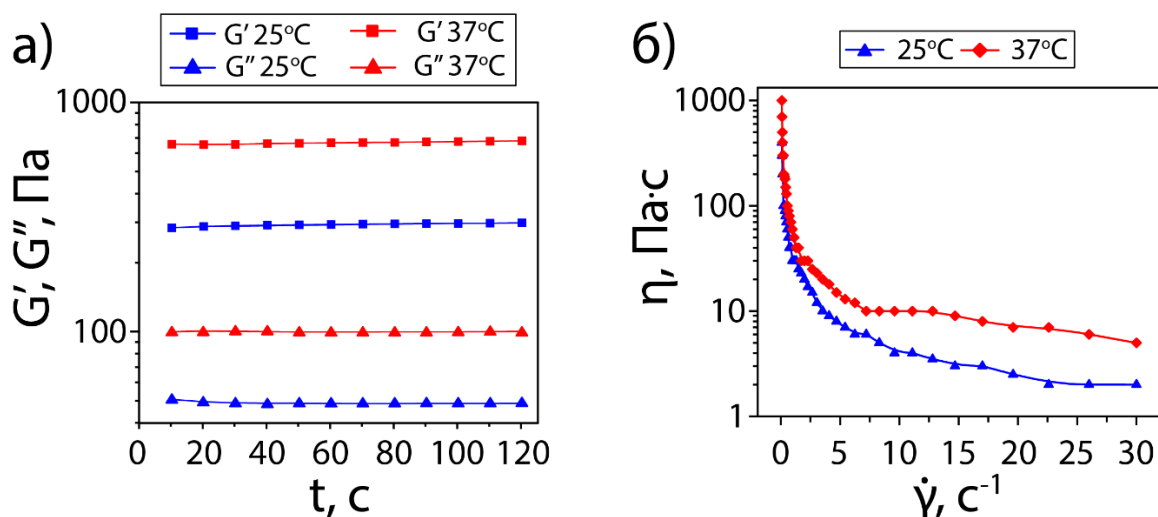


Рисунок 41 – (а) Зависимость модуля сдвига G' и модуля потерь G'' от времени при деформации 1% и 10 рад/с, (б) изменение вязкости геля при сдвиге η , построенное в зависимости от скорости сдвига $\dot{\gamma}$

Поведение геля при сдвиге было подтверждено реологическими исследованиями вязкости при сдвиге, η , при различных скоростях сдвига, $\dot{\gamma}$, (рисунок 41б). При $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ с}^{-1}$, вязкость составляла 400 и 1000 Па·с для 25 и 37 °С, соответственно, и при $\dot{\gamma} = 30 \text{ с}^{-1}$, вязкость уменьшалась до 2 и 5 Па·с для 25 и 37 °С, соответственно.

Когда деформация достигает более 21% (рисунок 42а), гель разрушается ($G' / G'' < 1$) при 25 °С, а при 37 °С максимальная деформация, необходимая для разрушения геля, увеличивается до 42%. Это указывает на увеличение прочности геля при более высокой температуре, связанное с увеличением вклада сил.

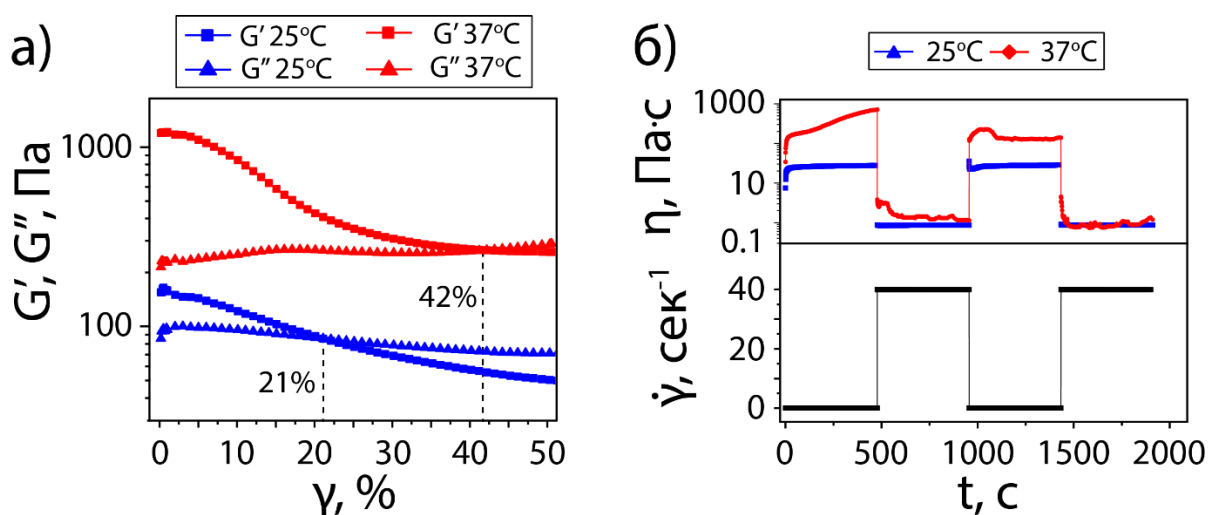


Рисунок 42 – (а) Изменение модуля сдвига G' и модуля потерь G'' геля, построенное как функция деформации сдвига γ , (б) изменение вязкости при сдвиге η геля в зависимости от времени (верхнее) при соответствующем изменении $\dot{\gamma}$ (нижнее)

Далее, мы изучили изменение η при циклическом изменении $\dot{\gamma}$ от 0.1 до 40 с⁻¹, то есть «самовосстанавливающиеся» свойства коллоидного геля, которые определяют его способность сохранять свою форму после напряжения сдвига или экструзии (рисунок 42б). При 25 и 37 °C, периодическое поэтапное изменение $\dot{\gamma}$ в диапазоне от 0.1 до 40 с⁻¹ привело к изменению вязкости геля при сдвиге. При 25 °C и начальном значении $\dot{\gamma} = 0.1$ с⁻¹, значение η составляло 25 ± 3 Па·с, повышение $\dot{\gamma}$ до 40 с⁻¹, ведет η к понижению в 29 раз. Последующее уменьшение $\dot{\gamma}$ до 0.1 с⁻¹ привело к увеличению η до 26 ± 2 Па·с, то есть к восстановлению почти 100% первоначальному значению η . При 37 °C и начальному значению $\dot{\gamma} = 0.1$ с⁻¹, значение η составляло 290 ± 180 Па·с, увеличение $\dot{\gamma}$ до 40 с⁻¹ ведет к понижению η в 152 раза. Последующее снижение $\dot{\gamma}$ до 0.1 с⁻¹ привело к увеличению η до 160 ± 40 Па·с, то есть к восстановлению 55% от первоначальной стоимости η . Таким образом, чернила обладают реологическими свойствами, которые можно использовать для экструзионной печати: разжижением при сдвиге и быстрым восстановлением вязкости чернил

после снижения напряжения сдвига. Печать при 25 °С более выгодна, чем печать при 37 °С, из-за более высокого восстановления чернил.

3.1.4 Биологические свойства физического геля

Оценку биосовместимости образцов геля *in vitro* проводили с использованием клеток А-431. Для этой цели клетки высевали на поверхность гелевых покрытий, ранее созданных на дне лунок планшета. В качестве контрольной поверхности использовалось незакрытое дно планшета. Высеванные клетки инкубировали в течение 72 ч при 37 °С, и после этого пролиферацию клеток исследовали методом МТТ-анализа. Результаты, представленные на рисунке 43а, демонстрируют высокую биосовместимость клеток с гелевыми матрицами. Более высокая оптическая плотность формазана в случае тестируемых гелей означает большее количество живых клеток по сравнению с контролем (метаболическая активность составляла около 200% и более по отношению к контролю). Этот результат объясняется разницей в пространстве, доступном для роста клеток: контрольная поверхность является двумерной (2D), в то время как гелевые покрытия имеют трехмерное (3D) пространство. В свою очередь, это приводит к более быстрому слиянию клеток на 2D поверхности в отличие от гелей. Таким образом, активная клеточная пролиферация и высокая жизнеспособность клеток через 3 дня указывают на благоприятную для клеток среду, обеспечиваемую гелями ПНИПАМ / НКЦ. В то же время не было никаких резких различий в жизнеспособности клеток в зависимости от состава геля.

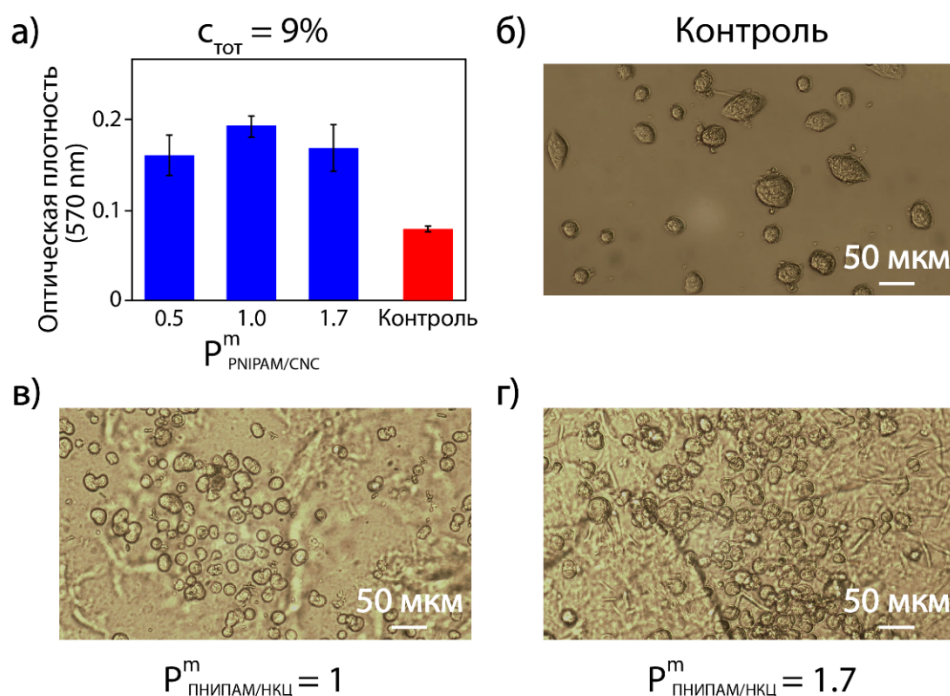


Рисунок 43 – (а) Пролиферация клеток А431 на контрольной поверхности (дно лунок 96-луночного планшета для культивирования клеток) и поверхности гелей с одинаковым $c_{\text{ТОТ}} = 9$ масс.% и различными $P_{\text{PNIПAM/НКЦ}}^m$ (МТТ-анализа, 72 ч), (б-г) оптическая микроскопия в ярком поле ($\times 10$) клеток А-431 на контрольной поверхности (дно 24-луночного планшета для культивирования адгезивных клеток) (б) и поверхность гелей с $c_{\text{общ}} = 9$ масс. % и различными $P_{\text{PNIПAM/НКЦ}}^m$: 1,0 (в) и 1,7 (г)

Кроме того, чтобы подтвердить наше предположение о положительном влиянии геля на поддержку клеток и рост в гелевом пространстве, мы исследовали контрольную и гелевую поверхности с помощью оптической микроскопии в ярком поле (рисунок 43б-г). Клетки А-431 в контроле (дно чашки для культивирования клеток) после 72 ч культивирования имеют типичную форму для эпителиальных клеток, прикрепленных к поверхности чашки для культивирования. Однако в некоторых клетках можно наблюдать выросты или филлаподии, не характерные для клеток эпидермиса. Такие явления в морфологии клеток можно отнести к особенностям культивирования на культуральной пластинке. В свою очередь, при

культивировании клеток на гелях таких филоподий не наблюдалось. Все ячейки имели типичную форму. Мягкость геля способствует частичному погружению клеток в гель. Следует также отметить, что после 72 ч культивирования количество клеток на поверхностях геля превысило количество клеток в контрольном образце. Полученный результат полностью согласуется с данными МТТ-анализа, рассмотренными выше.

3.1.5 3D-печать

Выбранный состав геля с $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$, был протестирован для прямого письма чернилами с использованием шприца с 22G иглой при 25 °C. Выбор соотношения $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ это объясняется его высочайшей биосовместимостью и самым высоким модулем сдвига среди других соотношений. На рисунке 44а показано, что проявленные чернила были выдавлены в виде непрерывной однородной нити при 25 °C (краситель использовался для увеличения контраста между гелем и водной средой).

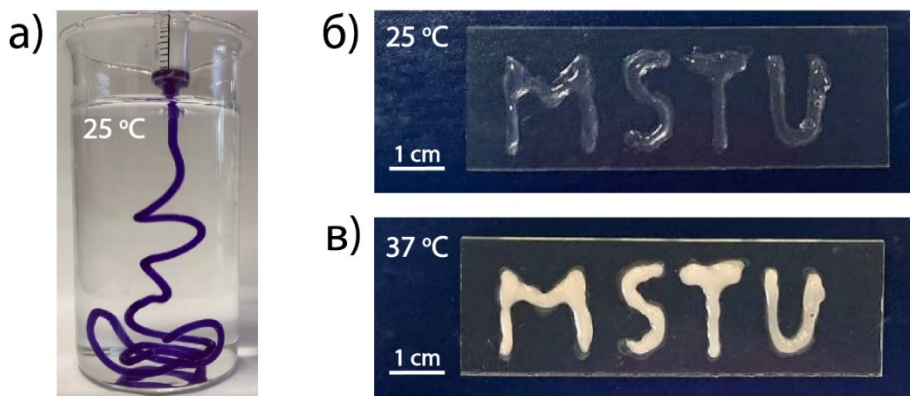


Рисунок 44 – (а) Экструзия образца геля при 25 °C (для достижения более высокой контрастности в водной среде был добавлен краситель бромфеноловый синий), (б) логотип университета, полученный прямым нанесением чернил $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ (температура чернил 25 °C), на стеклянной подложке при 25 °C, (в) логотип университета, полученный прямым нанесением геля $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ (температура чернил 25 °C) на стеклянной подложке при 37 °C

Чтобы использовать свойства полученных чернил при истончении при сдвиге, мы исследовали эффективность гидрогеля в качестве материала для инъекций путем ручной экструзии из шприца на горизонтальную поверхность предметного стекла для получения логотипа университета (рисунок 44б). После экструзии гидрогель сохранил свою нитевидную форму и сформировал предварительно разработанный рисунок, что подтверждает свойства разработанных чернил к истончению при сдвиге (рисунок 44б). Экструдированный рисунок был полупрозрачным при 25 °С (рисунок 44б) и становится непрозрачным (матовым) при нагревании до 37 °С (рисунок 44в). Было показано, что переход гелевого рисунка из прозрачного в непрозрачное состояние полностью обратим в течение 4 циклов (рисунок 45).

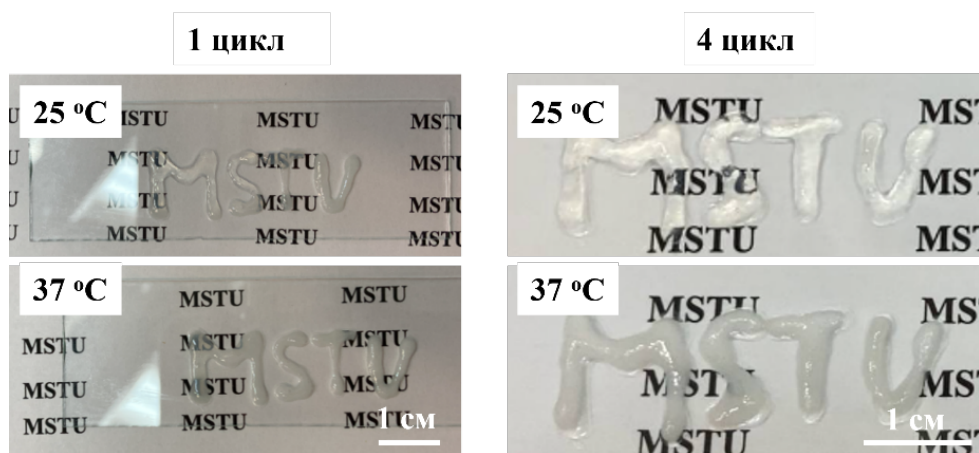


Рисунок 45 – верхнее – экструдированный гель с $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ при 25 °С и внизу – выдавленный при 25 °С гель, нагретый до 37 °С с использованием термоплитки

Дальнейшее циклирование сопровождалось значительным высыханием геля. Экструдированный рисунок сохраняет свою форму во время циклов нагрева-охлаждения, поскольку состав чернил был выбран в соответствии с диаграммами состояния, чтобы был гелем как при 25 °С (рисунок 45в), так и при 37 °С (рисунок 45в). Однако можно выбирать композиции, когда система находится в гелеобразном состоянии при 37 °С и разжижается при 25 °С.

Полученные гели при высыхании могут образовывать полупрозрачные хрупкие пленки. На рисунке 46 показан внешний вид пленки, изготовленной из геля с $c_{\text{tot}} = 13$ масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$, толщина пленки составляет 220 микрометров. Полученная пленка была полупрозрачной и хрупкой.



Рисунок 46 – Фото пленки, полученной из геля с $c_{\text{tot}} = 13$ масс. % и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1,0$, толщина пленки составляет 220 микрометров

Вывод по главе

Таким образом, в ходе выполнения работы были разработаны термочувствительные фибриллярные гидрогели на основе физических взаимодействий НКЦ и ПНИПАМ для имплантов и инъектируемых систем доставки лекарств. Предлагаемая гидрогелевая система представляет собой платформу для разработки биомедицинских мягких роботов, поскольку состоит из биосовместимых компонентов и работает в температурном диапазоне, близком к человеческому телу. На основании этих данных опубликована статья [231].

3.2 Гель на основе ПНИПАМ, привитого к нанокристаллической целлюлозе

Глиобластома - наиболее распространенная и агрессивная форма рака головного мозга. Медикаментозное лечение затруднено из-за сложности проникновения химиотерапевтических препаратов через гематоэнцефалический барьер и хирургического удаления опухолей, в 90% случаев они вновь появляются вблизи первоначального очага. Для решения этой задачи была разработана биосовместимая коллоидная система с термочувствительным гелеобразованием в качестве перспективного материала для заполнения послеоперационных полостей в головном мозге. Гидрогель сформирован из нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) и поли(N-изопропилакриламида) (ПНИПАМ) и является жидким в условиях инъекции (при комнатной температуре) и превращается в гель при температуре тела человека.

3.2.1 Получение модифицированных наночастиц НКЦ

Поверхность НКЦ была функционализирована методом «прививки к» с использованием поли(N-изопропилакриламида) (ПНИПАМ), синтезированного полимеризацией с обратимым переносом цепи (ОПЦ). Метод «прививки к» был выбран для модификации НКЦ из-за более точного контроля плотности прививки и молекулярно-массового распределения полимера по сравнению с подходом «прививки от». Сначала ПНИПАМ был получен ОПЦ-полимеризацией с использованием ОПЦ-агента, содержащего азидогруппу, а именно 2-(додецилтиокарбонотиоилтио)-2-метилпропионовой кислоты, 3-азидо-1-пропанолевого эфира (рисунок 47а, вверху слева), как сообщалось ранее [232,233]. Синтезированный полимер имеет $M_n = 40\,000$ и узкое молекулярно-массовое распределение $M_w/M_n = 1,15$ согласно данным гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Затем поверхность НКЦ была модифицирована алкиновыми группами путем реакции с пропаргилбромидом (рисунок 47а, слева внизу), как сообщалось ранее [234]. Прививка полимера к

наночастицам осуществлялась путем реакции Хьюсена 1,3-азидалкина циклоприсоединения между азидо-концевыми группами в ПНИПАМ и алкиновыми группами на поверхности НКЦ (рисунок 46а, справа).

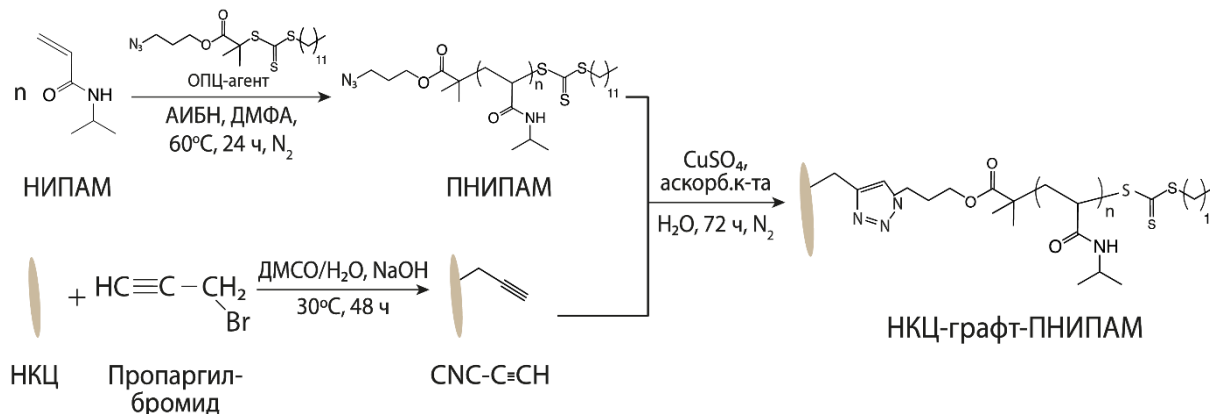


Рисунок 47 – Схема синтеза НКЦ, привитого к ПНИПАМ (НКЦ-графт-ПНИПАМ)

Плотность прививки полимера на поверхность НКЦ составляла 160 ± 20 мкмоль/г и определялась титрованием групп -NH_2 , образующихся при аминоллизе НКЦ-графт-ПНИПАМ. Плотность прививки, основанная на элементном анализе серы, составила 146 ± 25 мкмоль/г, что согласуется с данными титрования.

На рисунке 48а показаны рентгеновские спектры нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) и НКЦ, привитой поли(N-изопропилакриламидом) (НКЦ-графт-ПНИПАМ). Как НКЦ, так и НКЦ-графт-ПНИПАМ показывают типичные пики кристаллической структуры целлюлозы I β , т.е. при $2\theta = 16,4^\circ$ и $22,6^\circ$ [235]. Пики для НКЦ-графт-ПНИПАМ менее резкие, что связано с аморфной природой привитого полимера.

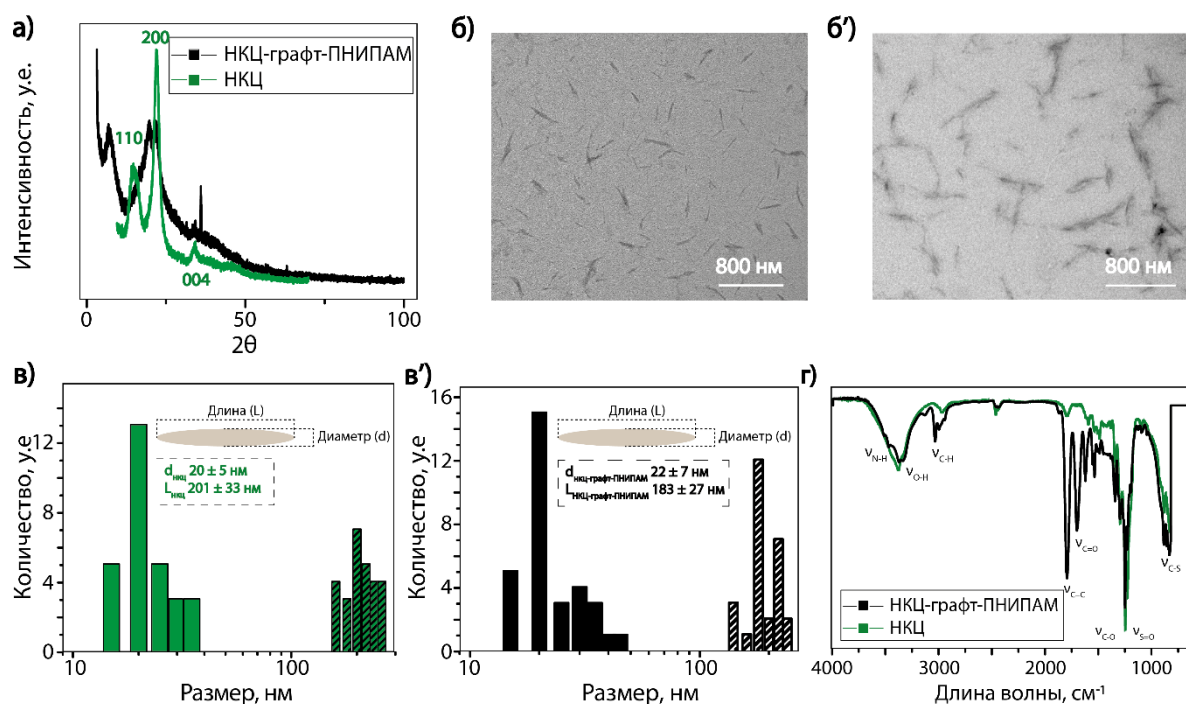


Рисунок 48 – (а) Рентгеноструктурный анализ для НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ, (б)-(б') ПЭМ-изображения для НКЦ (б) и НКЦ-графт-ПНИПАМ (б'), (в)-(в') размер (длина и диаметр) для (в) НКЦ и (в') НКЦ-графт-ПНИПАМ полученный по ПЭМ-изображениям, (г) ИК-спектры для НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ

На рисунках 48б,б' показаны ПЭМ-изображения НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ. Стержневидная форма частиц была сохранена после полимерной прививки. Распределение по размерам (длина и диаметр) НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ было получено путем анализа изображений ПЭМ с использованием ImageJ (рисунок 48в, в'). Средний диаметр НКЦ составил 20 ± 5 нм, а их средняя длина – 201 ± 33 нм, что согласуется с ранее опубликованными данными [236]. Средний диаметр частиц НКЦ-графт-ПНИПАМ составил 22 ± 7 нм, а их средняя длина – 183 ± 27 нм. Таким образом, прививка полимера приводит к увеличению диаметра частиц, а не длины.

Рисунок 48г показывает ИК-спектры НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ. Характеристическими пиками для НКЦ являются 1059 cm^{-1} ($\nu_{\text{S=O}}$), 1162 cm^{-1} (C-O-C). НКЦ-графт-ПНИПАМ характеризуется пиками и от НКЦ, и от

ПНИПАМ: 3339 см^{-1} (О–Н от НКЦ), 2970 см^{-1} (С–Н изопротильная группа от ПНИПАМ), 1648 см^{-1} (амид I, пептидное $\nu\text{C=O}$), 1562 см^{-1} (амид II, $\nu\text{N–H}$ bending coupled to $\nu\text{C–H}$ stretching), 1059 см^{-1} ($\nu\text{S=O}$ от НКЦ).

Гидродинамический диаметр d исходной и модифицированной НКЦ исследовали методом динамического рассеяния света (рисунок 49а). Для наночастиц НКЦ гидродинамический диаметр составил 137 ± 2 нм и не изменяется в диапазоне температур от $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для модифицированных наночастиц НКЦ-графт-ПНИПАМ наблюдалось две области изменений d . В первой области d уменьшается от 172 до 163 нм при изменении температуры с $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ из-за распада цепей ПНИПАМ выше нижней критической температуры растворения (НКТР). Во второй области наблюдалось уменьшение диаметра от 188 до 181 нм при изменении температуры от $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ из-за агрегации наночастиц, индуцированной взаимодействиями цепей ПНИПАМ.

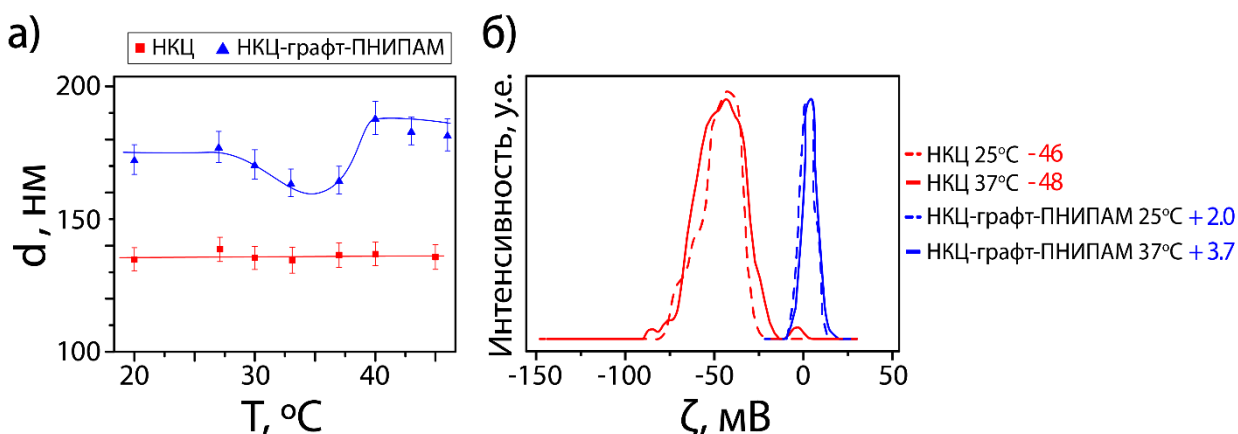


Рисунок 49 – (а) Зависимость диаметра НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ от температуры (согласно данным ДРС); (б) дзета-потенциал для НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

На рисунке 49б показан электрокинетический потенциал ζ исходных и модифицированных наночастиц от $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Исходная НКЦ продемонстрировала отрицательные значения при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\zeta = -46\text{ мВ}$, что объясняется наличием сульфогрупп полуэфира на поверхности НКЦ. После

модификации наночастиц НКЦ с помощью ПНИПАМ значение электрокинетического потенциала изменяется до слегка положительных значений: при 25 °С $\zeta = + 2,0$ мВ из-за нейтральной природы полимерных цепей, которые экранируют заряд исходных НКЦ. Электрокинетический потенциал НКЦ и НКЦ-графт-ПНИПАМ оставался постоянным при изменении температуры и для НКЦ составлял - 46 и - 48 мВ при 25 °С и 37 °С соответственно (рисунок 49б), в то время как для НКЦ-графт-ПНИПАМ составлял + 2,0 и + 3,7 мВ при 25 °С и 37 °С соответственно.

Таким образом, стабильность дисперсии НКЦ основана на классической теории Дерягина-Ландау-Фервей-Овербека (ДЛФО), в то время как для модифицированных наночастиц НКЦ-графт-ПНИПАМ стабильность дисперсий связана с силами, отличными от ДЛФО, такими как стерические и гидрофобные взаимодействия полимерных щеток [237].

3.2.2 Термообратимое гелирование НКЦ-графт-ПНИПАМ

Термочувствительные свойства «привитого к» полимера привели к появлению обратимого термически индуцированного гелеобразования дисперсий наночастиц при температурах выше нижней критической температуры раствора (НКТР) ПНИПАМ [238,239]. При комнатной температуре 25 °С ($T < T_{\text{НКТР}}$) вода для привитого ПНИПАМ является хорошим растворителем, а полимер имеет форму расслабленной гауссовой клубка (рисунок 50а, слева). Когда температура повышается до 37 °С ($T < T_{\text{НКТР}}$), клубки сжимаются до состояния глобул, что приводит к самосборке наночастиц в фибриллярный гель (рисунок 50а, справа). Мы выбрали температуру 37 °С, потому что это температура человеческого тела, и она точно выше, чем НКТР ПНИПАМ.

На рисунке 50б показаны изменения оптических свойств 7 масс. % дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ в процессе термочувствительного обратимого гелеобразования. При комнатной температуре 25 °С ($T < T_{\text{НКТР}}$)

дисперсия НКЦ-графт-ПНИПАМ выглядит как полупрозрачная жидкость (рисунок 50б, слева), в то время как при 37 °C ($T < T_{НКТР}$) она образует плотный непрозрачный гель (рисунок 50б, справа).

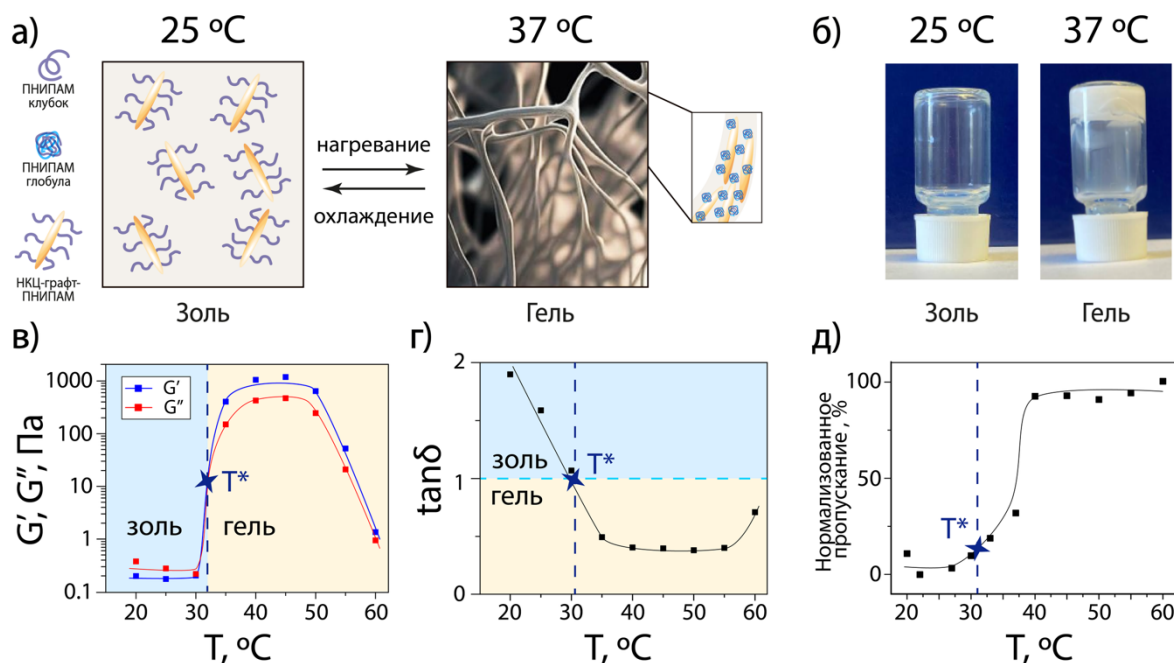


Рисунок 50 – (а) Схема индуцированного температурой гелеобразования водной дисперсии НКЦ- графт-ПНИПАМ, (б) внешний вид водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ в виде золя при 25 °C (слева) и в виде геля при 37 °C (справа), (в-д) Температурная зависимость G' и G'' (в) и $\tan\delta$ (г) от температуры для водной дисперсии НКЦ- графт- ПНИПАМ, (д) изменение во времени нормализованного пропускания

Температура перехода из состояния золь в гель была оценена в эксперименте с повышением реологической температуры в точке, когда модуль накопления, G' , становится выше, тогда модуль потерь, G'' , или $\tan\delta = G''/G'$ ниже 1 (рисунок 50в, г). При температуре ниже 33 °C коллоидная система демонстрирует поведение, подобное жидкости, при $G' < G''$, что обусловлено растворимостью ПНИПАМ в воде при этих условиях в свернутом виде. С повышением температуры ПНИПАМ переходит в глобулярное состояние, и гидрофобные взаимодействия индуцируют агрегацию НКЦ,

которые приводят к образованию геля в диапазоне от 35 °С до 50 °С ($G' > G''$). Однако дальнейшее превращение ПНИПАМ в глобулу при температуре выше 55 °С приводит к разделению фаз и потере свойств геля ($G' < G''$). Температура перехода 33 °С была подтверждена измерением коэффициента пропускания геля при различных температурах (рисунок 50д).

Переход от золя к гелю был быстрым, происходил в течение минуты, благодаря узкому молекулярно-массовому распределению полимера ($M_w/M_n = 1,15$).

Минимальная концентрация коллоидной системы для образования перколяционной сетки составляла 2 масс. %, в то время как ниже этой концентрации НКЦ-графт-ПНИПАМ становится непрозрачным золем при температуре 33 °С (рисунок 51а). Индуцированный температурой золь-гель переход НКЦ-графт-ПНИПАМ был исследован при различных значениях pH (рисунок 51б). Было показано, что гель может образовываться в диапазоне pH от 6,5 (дистиллированная вода) до 7,5 (буфер), в то время как при pH 6 и 9 коллоидная система находится в состоянии золя.

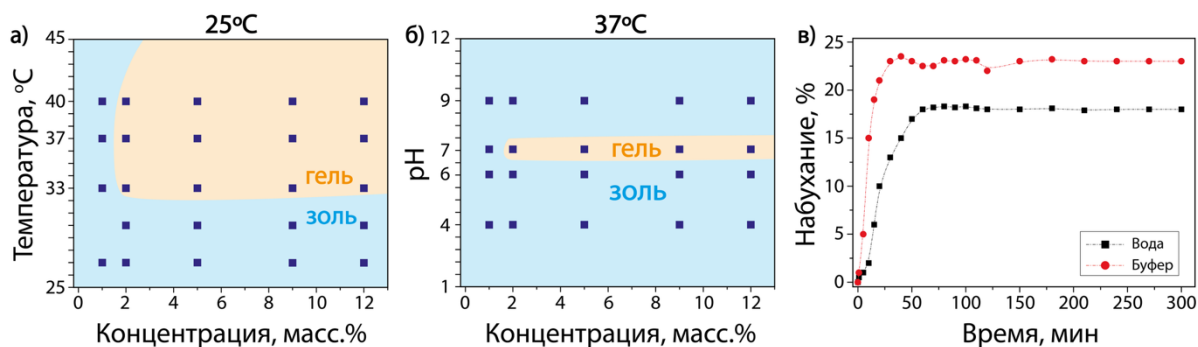


Рисунок 51 – (а) Диаграмма состояния водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ от температуры, (б) диаграмма состояния водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ от pH при 37°C, (в) набухание НКЦ-графт-ПНИПАМ при 37°C в воде и растворе фосфатно-солевого буфера

Набухание высушенного геля было исследовано в дистиллированной воде (pH 6,5) и буфере (pH 7,4) при 37°C (рисунок 51в). Коэффициент

набухания геля на основе НКЦ-графт-ПНИПАМ 7 масс. % составил 17 % и 23 % от исходного состояния в воде и среде буфера соответственно.

3.2.3 Реологические свойства

Свойства системы зависят от состава (соотношение компонентов, концентрация), который может быть использован для выбора соотношений таким образом, чтобы он соответствовал заданным свойствам. Мы варьировали концентрацию, чтобы выбрать оптимальную механику материала, сопоставимую с литературными данными о механике различных отделов мозга (рисунок 52а). Для концентрации 3 масс. % значения G' равного 60 Па были слишком малы по сравнению со средним значением для того же модуля для головного мозга (G' равного от 300 до 1050 Па). 9 и 12 масс. % были слишком высокими. Поэтому для дальнейших исследований мы выбрали 7 масс. % раствор с G' равным 460 Па.

Чтобы определить линейный диапазон значений модулей, была измерена частотная развертка (рисунок 52б). Линейная область составляет от 1 до 3 Гц, что совпадает с литературными данными для мозга и коррелирует со значениями модулей на рисунке 51а, взятыми при частоте 1 Гц.

Полученный материал можно использовать для 3D-печати, поскольку гель, образующийся при 37 °С, является тиксотропным, т.е. происходит снижение вязкости при увеличении скорости сдвига, которые необходимы для использования гелей в качестве чернил для 3D-печати. Тиксотропное поведение геля было подтверждено реологическими исследованиями вязкости η при 37 °С и различных скоростях сдвига $\dot{\gamma}$ (рисунок 52в). При $\dot{\gamma} = 0,01 \text{ с}^{-1}$ вязкость составляла 9931 Па·с, а при $\dot{\gamma} = 100 \text{ с}^{-1}$ вязкость снизилась до 0,06 Па·с. Таким образом, печать может осуществляться за счет разницы температур (25 °С - золь, 37 °С - гель).

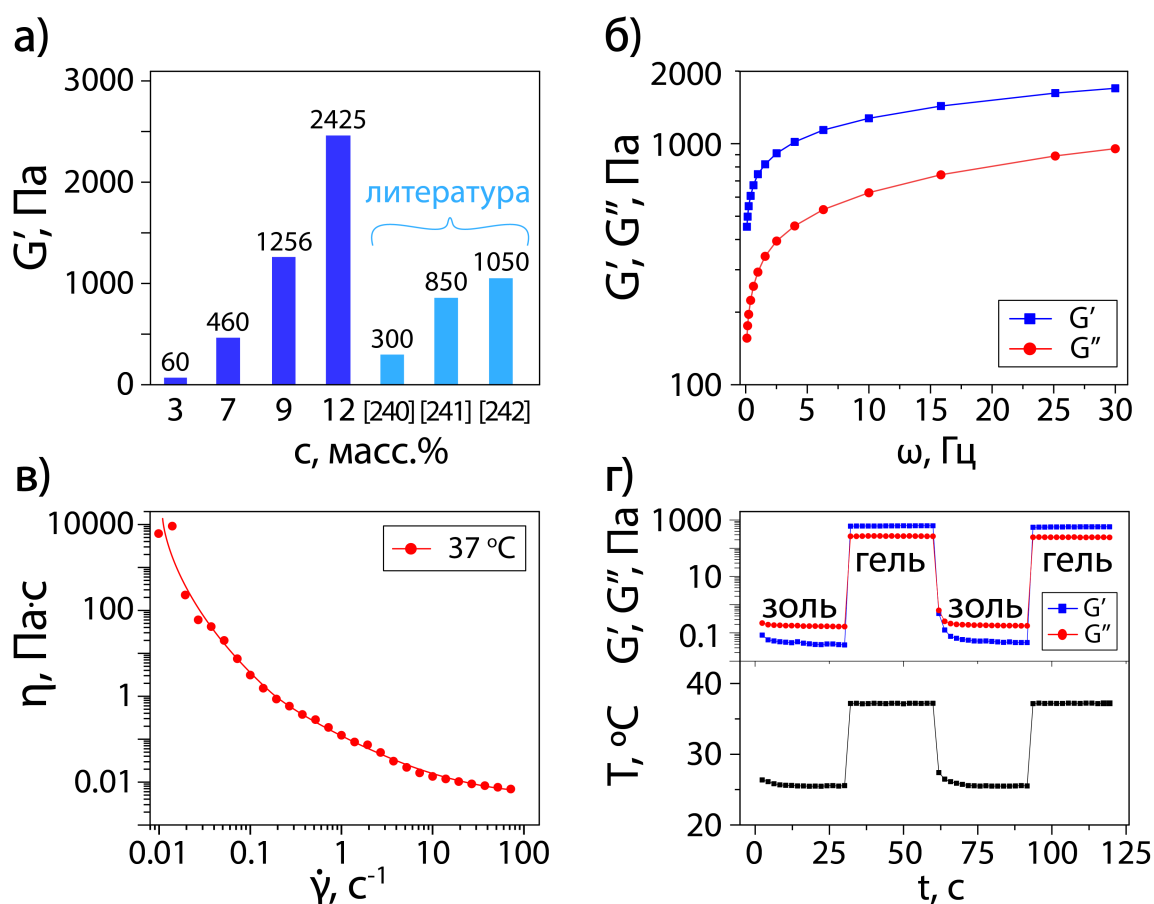


Рисунок 52 – а) Изменение G' при частоте 1 Гц для водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ в различных концентрациях и литературные данные для ткани головного мозга (1 – [240], 2 – [241], 3 – [242]), б) изменение G' при 1 %-ной деформации для водной НКЦ-графт-ПНИПАМ 7 масс. % при различной частоте, в) зависимость сдвиговой вязкости η водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ от скорости сдвига $\dot{\gamma}$ при 37 °C, г) изменение значений G' и G'' для водная дисперсия НКЦ-графт-ПНИПАМ 7 масс. % (вверху) при циклировании температуры от 25 до 37 °C (внизу)

Обратимость гелеобразования с повышением температуры была доказана циклическим изменением температуры (рисунок 52г). Мы изучали изменение G' и G'' при циклическом изменении T от 25 °C до 37 °C, то есть быстрое образование геля ($G' > G''$) с повышением температуры и образование золя ($G' < G''$) с понижением температуры. На первом этапе при 25 °C система представляет собой золь - $G' = 0,05 \pm 0,01$ Па, $G'' = 0,19 \pm 0,01$ Па. Повышение

температуры до 37 °С приводит к образованию геля, модули увеличились G' в 16 140 раз, G'' в 1 789 раз ($G' = 807 \pm 12$ Па, $G'' = 340 \pm 3$ Па). Снижение температуры до 25 °С обратно пропорционально уменьшает модули в 8 070 и 1 700 раз соответственно ($G' = 0,1 \pm 0,1$ Па, $G'' = 0,2 \pm 0,1$ Па). Значения, возвращенные для G' , увеличились на 50 %, G'' - на 100 %. Последующее повторное повышение температуры приводит к образованию геля ($G' = 737 \pm 10$ Па, $G'' = 309 \pm 3$ Па), то есть значения восстанавливаются (возвращаются для G' почти на 91 %, G'' на 91 %).

Таким образом, чернила обладают необходимыми механическими свойствами для экструзионной печати: тиксотропией и быстрым восстановлением значений модулей (G' и G'') при нагревании и охлаждении. Использование чернил ограничено только высыханием при нагревании.

Чтобы изучить механическую асимметрию материала, его подвергли размягчению при сжатии и растяжению, измерив модуль хранения, G' (рисунок 53а). Осевые деформации (вдоль оси XY) создавались путем создания различных зазоров между геометрией и поверхностью реометра, поэтому материал имел разную толщину, но одинаковое количество. При $\lambda = 0$ образец считается недеформированным, при $\lambda < 0$ – сжатие, при $\lambda > 0$ – растяжение.

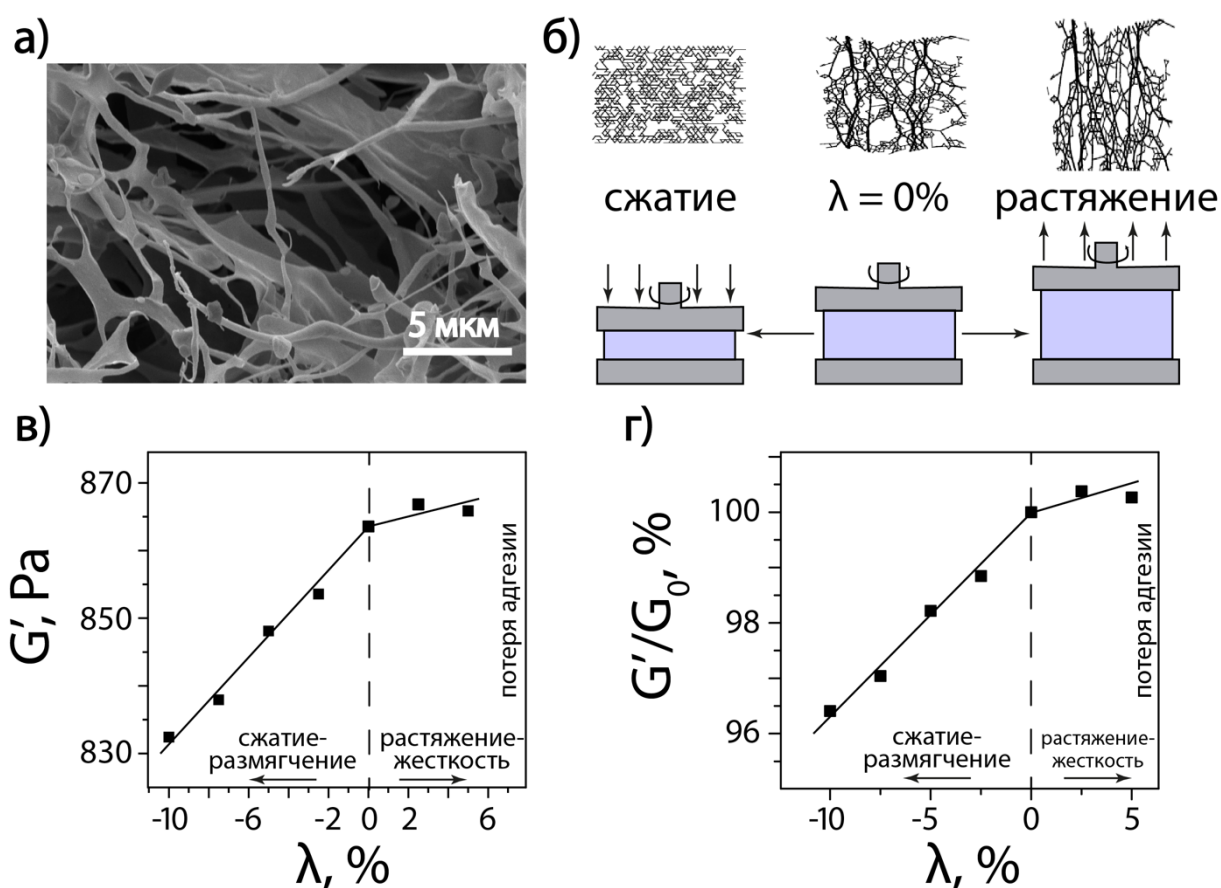


Рисунок 53 – (а) Схема размягчения при сжатии и упрочнении при растяжении биологических тканей в условиях двухосного удержания; осевая деформация регулировалась путем изменения зазора между реометром в конфигурации пластина-пластина, (б) структура геля НКЦ- графт-ПНИПАМ, полученная методом сканирующей электронной микроскопии, (в-г) деформация-размягчение и придание жесткости при растяжении геля НКЦ- графт- ПНИПАМ при температуре 37 °С при различном сжатии для измеренных значений G' (в) и нормализованных значений (г)

На рисунке 53б показано репрезентативное изображение высушенного геля НКЦ- графт-ПНИПАМ под сканирующим электронным микроскопом. Гель имеет четко очерченные поры, размер которых может варьироваться в зависимости от соотношения компонентов. Это свойство полезно для моделирования биологической ткани и выращивания клеток на поверхности образца, внутри него или под ним.

Рисунки 53в и 53г демонстрирует нелинейно-механические свойства полученного гидрогеля в исходном и нормализованном виде. При сжатии геля ($\lambda = -10\%$) гидрогель размягчается с уменьшением модуля накопления с 863 до 831 Па, что составляет около 3,8 % относительного изменения (для тканей мозга нормализованное изменение составляет около 6 %). При растяжении гидрогеля он демонстрирует упрочнение при $\lambda = 2,5\%$, соответствующее увеличению модуля с 863 до 868 Па что составляет около 0,6 % относительного изменения. Однако, дальнейшее упрочнение геля при $\lambda > 2,5\%$ было невозможно вследствие потери адгезии геля к поверхности.

3.2.4 Биосовместимость гелей НКЦ-графт-ПНИПАМ

Для исследования биологических свойств гидрогелей были использованы первичные культуры астроцитов головного мозга крыс (астроциты) и эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга (эндотелиальные клетки) в концентрациях $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. В контрольных экспериментах мы оценивали экспрессию PCNA (маркер пролиферации), ZO1 (маркер ЭКМГМ), GFAP (маркер Ас) и апоптоза (TUNEL) в клетках, выращенных на стандартном растворе внеклеточного матрикса, с помощью набора для анализа ангиогенеза (*in vitro*) (ab204726, Abcam, Великобритания). Оба типа клеток прилипают к гелю, пролиферируют, начинают экспрессировать ZO1 или GFAP и не демонстрируют значительных уровней апоптоза.

Для тестирования биосовместимости геля НКЦ-графт-ПНИПАМ с эндотелиальными клетками и астроцитами в 1-й серии экспериментов клетки приклеивали на дно лунок в планшете на 96 лунок, а раствор НКЦ-графт-ПНИПАМ в концентрации, позволяющей получить гель с вязкостью, близкой к паренхиме головного мозга (7 масс. %) добавляли в лунки тонким слоем поверх клеток. Затем планшет инкубировали при 37 °C для перевода раствора НКЦ-графт-ПНИПАМ в гелеобразное состояние. Клетки, выращенные в этих условиях, обычно визуализировали с помощью фазово-контрастной

микроскопии через 3 и 10 дней после посева. Мы обнаружили, что как астроциты, так и эндотелиальные клетки хорошо прилипли ко дну лунки пластины, и присутствие верхнего слоя геля НКЦ-графт-ПНИПАМ не повлияло на их рост, как показано на рисунке 54 (а, б).

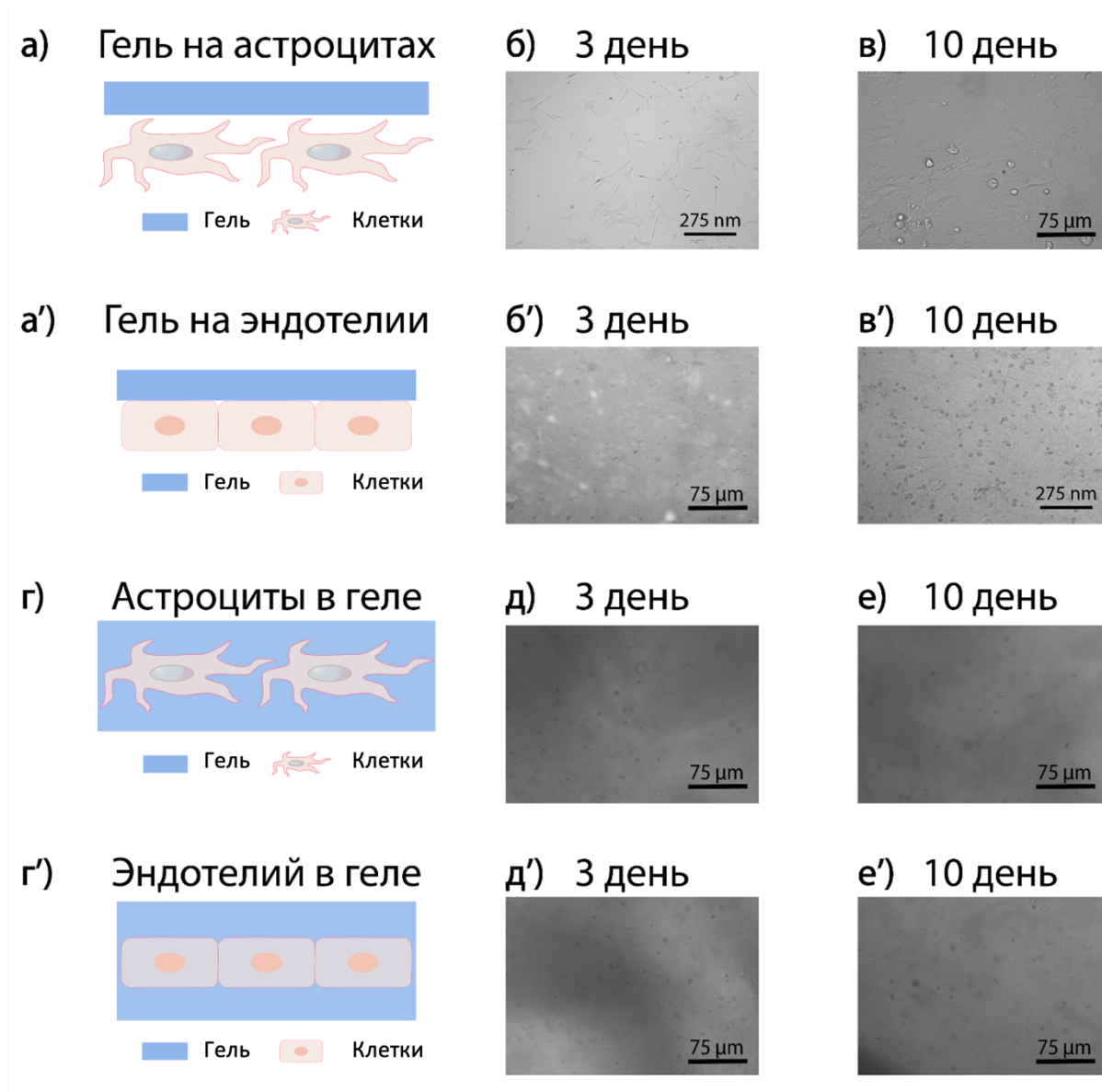


Рисунок 54 – Астроциты (а) и эндотелиальные клетки (б), выращенные на дне лунок 96-луночной пластины под слоем 7 масс. % геля НКЦ-графт-ПНИПАМ, и астроциты (а') и эндотелиальные клетки (б'), выращенные в глубине 7 масс. % геля НКЦ-графт-ПНИПАМ, на 3-й и 10-й дни

Во 2-й серии экспериментов мы погружали астроциты или эндотелиальные клетки в 7 масс. % раствор НКЦ-графт-ПНИПАМ, хорошо

перемешивали их, а затем помещали раствор в лунки 96-луночного планшета. В этом случае клетки не росли внутри геля и демонстрировали измененную пролиферативную активность (рисунок 54в, г), вероятно, из-за низкого доступа питательных веществ и кислорода. А также из-за того, что в среднем клетки имеют размер 3-10 мкм, а поры геля являются нанометровыми.

В 3-й серии экспериментов мы высевали астроциты или эндотелиальные клетки на слой предварительно разогретого геля НКЦ-графт-ПНИПАМ, нанесенного на дно лунок в планшете на 96 лунок. Мы обнаружили, что оба типа клеток прилипали к поверхности геля со сравнимой эффективностью, и на поверхности геля были визуализированы живые клетки, трансфицированные pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (рисунок 55).

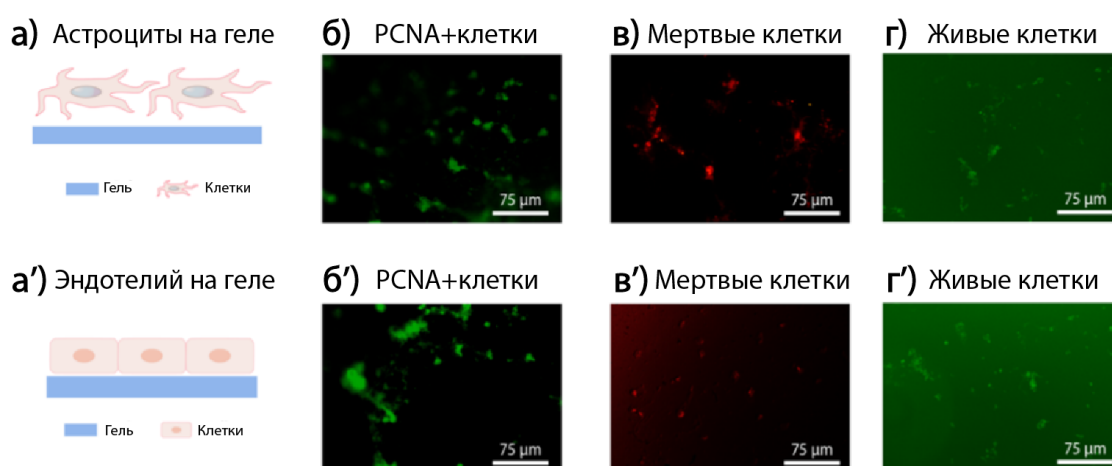


Рисунок 55 - Иммуно- и апоптозное окрашивание астроцитов (а) и эндотелиальных клеток (б), выращенных на стандартном растворе внеклеточного матрикса с помощью набора для анализа ангиогенеза (*in vitro*)

Однако иммуноокрашивание выявило нарушенную экспрессию PCNA в клетках ZO1⁺ или в клетках GFAP⁺ или измененный апоптоз, оцененный по протоколу TUNEL (рисунок 56). В частности, выращенные на 7 масс. % геле НКЦ-графт-ПНИПАМ, астроциты продемонстрировали повышенные уровни апоптоза и снижение пролиферации на 3-й и 10-й дни после посева

(рисунок 56), тогда как эндотелиальные клетки улучшились на 3-й день после посева на НКЦ-графт-ПНИПАМ, но показали значительное снижение их жизнеспособности и митотической активности на 3-й день после посева. на 10-й день после посева по сравнению с контрольными клетками, выращенными на стандартном растворе внеклеточного матрикса.

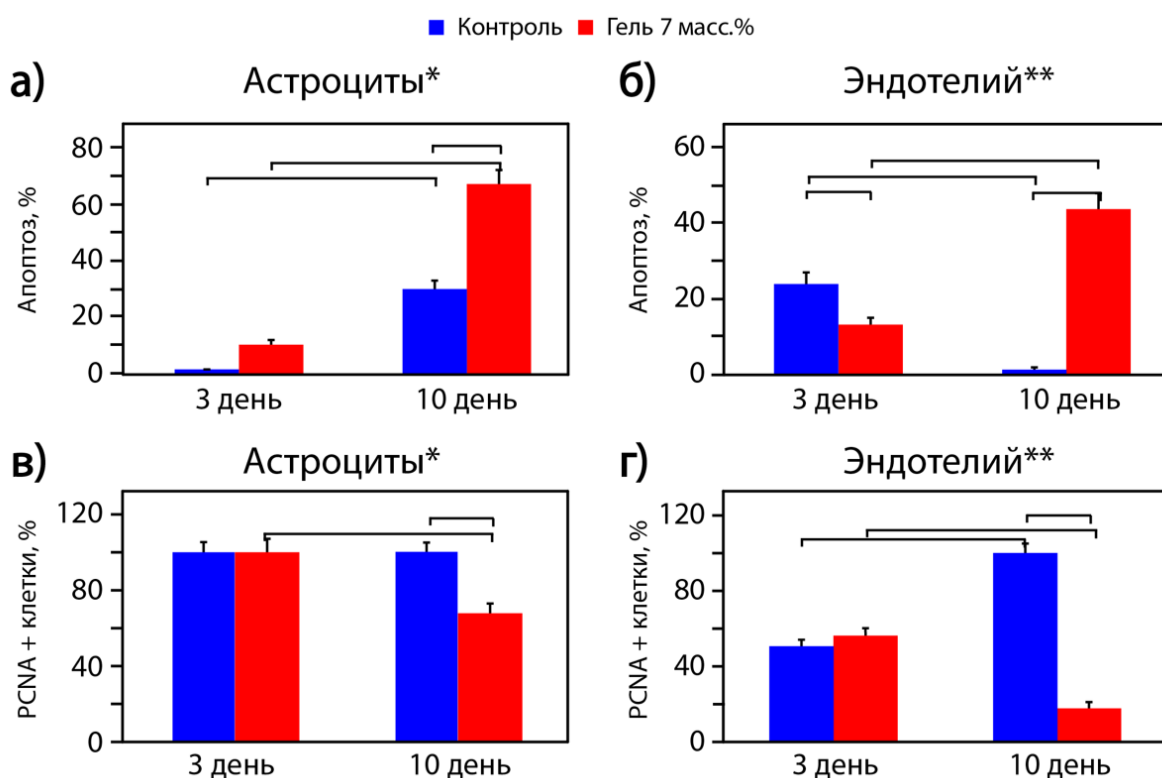


Рисунок 56 - (а) Динамика изменений содержания маркеров апоптоза (TUNEL) в астроцитах на 3-е и 10-е сутки 7 масс. % растворе НКЦ-графт-ПНИПАМ, (б) динамика изменений содержания маркеров апоптоза (TUNEL) в эндотелиальных клетках на 3-й и 10-й сутки 7 масс. % растворе НКЦ-графт-ПНИПАМ, (в) динамика изменений содержания пролиферирующих астроцитов (PCNA) на 3-й и 10-й дни 7 масс. % растворе НКЦ-графт-ПНИПАМ, (г) динамика изменений содержания пролиферирующих эндотелиальных клеток (PCNA) на 3-й и 10-й дни 7 масс. % растворе НКЦ-графт-ПНИПАМ

3.2.5 Цитотоксичность

Известно, что как НКЦ, так и ПНИПАМ являются биосовместимыми полимерами с относительно низкой цитотоксичностью [243,244]. Тем не менее, цитотоксичность синтезированного НКЦ-графт-ПНИПАМ была исследована с использованием клеток глиобластомы человека (клеточная линия T98G).

Было исследовано высвобождение физиологически активного вещества из гидрогеля за счет его диффузии. В качестве физиологически активного вещества использовали противоопухолевое лекарства паклитаксел (ПТК). Ингибирующий эффект гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК на жизнеспособность клеток T98G оценивали методом МТТ-анализа в диапазоне концентраций от 4 до 1000 нг/мл (рисунок 57). НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК готовили простым смешиванием заданного количества ПТК (рисунок 58б) с 9 масс. % раствором НКЦ-графт-ПНИПАМ и гелировали на дне лунок планшета для культивирования клеток при 37 °С перед тестированием.

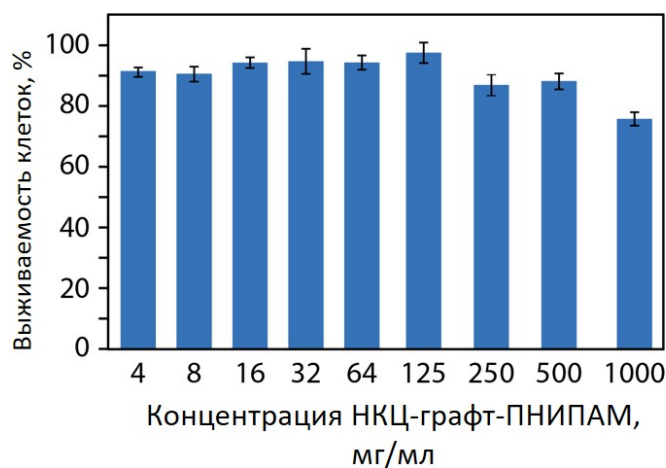


Рисунок 57 - Цитотоксичность гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ на клетках глиобластомы человека (клеточная линия T98G, 72 часа)

Согласно критериям протокола ISO EN 10993-5, цитотоксическим эффектом считается снижение жизнеспособности клеток более чем на 30% [245]. Жизнеспособность клеток тестируемого материала превышала 75% во

всем тестируемом диапазоне концентраций, что указывает на то, что материал не был цитотоксичен для клеток T98G.

3.2.6 Ингибирующая активность НКЦ-графт-ПНИПАМ / ПТК

Эффект ингибирования гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ / ПТК на жизнеспособность клеток T98G оценивали с помощью МТТ-анализа в диапазоне концентраций 4-1000 нг/мл (рисунок 58а). Гидрогель НКЦ-графт-ПНИПАМ / ПТК был получен путем простого смешивания заданного количества ПТК (рисунок 58б) с 9 масс. % раствором НКЦ-графт-ПНИПАМ и осаждения его на дно лунок планшета для культивирования клеток при температуре 37 °С перед тестированием.

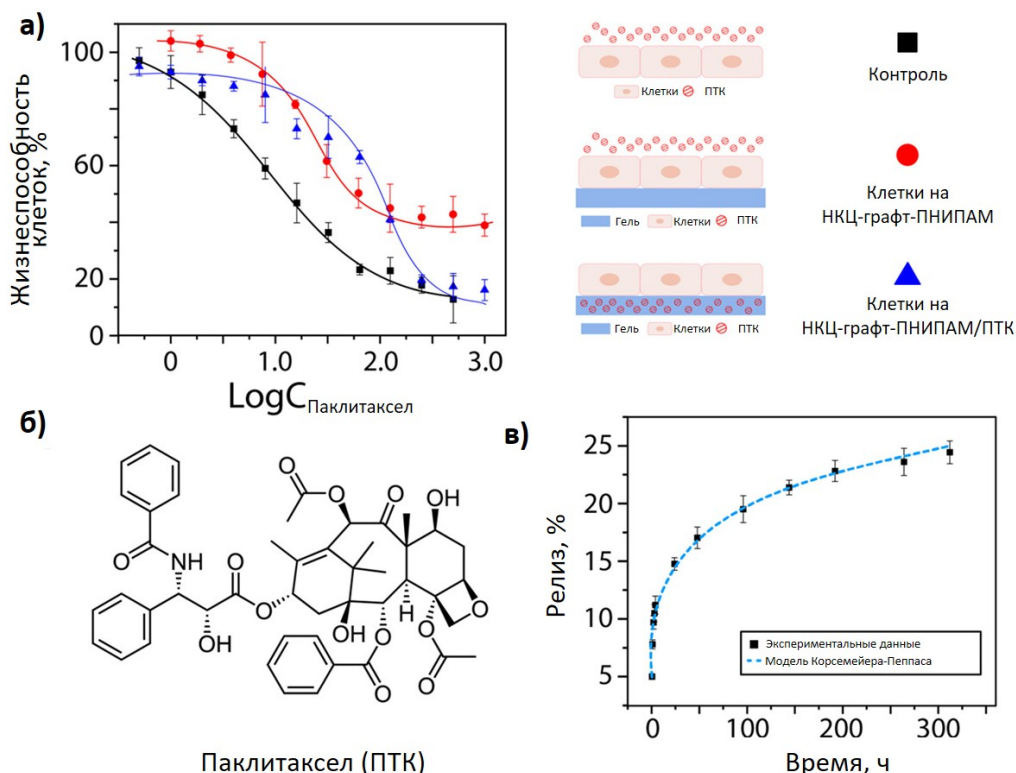


Рисунок 58 – (а) кривые зависимости доза-эффект для ПТК в растворе при посеве клеток на поверхность ПСКК (черный) и на предварительно сформированный слой гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ (9 масс. %) (красный) и гель НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК (синий); (б) химическая структура паклитаксела (ПТК), (в) профиль высвобождения ПТК из гидрогеля НКЦ-графт-ПНИПАМ (9 масс. %; 0,01 М ПБС, pH 7,4).

Для экспериментов с ПТК была выбрана концентрация 9 масс. %, поскольку в присутствии лекарственного средства, которое вводится в смеси с ДМСО, эта концентрация соответствует механике тканей головного мозга (рисунок 59). Зависимость $\tan\delta$ от времени = G''/G' для гелей с различным массовым содержанием (7 и 9 масс. %), содержащих 40 мкг ПТК и 13 или 20 мкл ДМСО на 1 мл гидрогеля (приготовленного путем добавления аликвоты исходного раствора ПТК в ДМСО с концентрацией 3 или 2 мг/мл, соответственно) показала, что добавление аликвоты ПТК в ДМСО может изменить состояние системы. 7 масс. % и 9 масс. % системы при 37°C представляли собой гели. Гидрогель 7 масс. % с добавлением ПТК становится не стабильным (при 40 мкг ПТК и 20 мкл ДМСО на 1 мл гидрогеля – не гель ($\tan\delta > 1$), при 40 мкг ПТК и 13 мкл ДМСО на 1 мл гидрогеля значения $\tan\delta$ нестабильны). Система 9 масс. % с добавлением 40 мкг ПТК и 13-20 мкл ДМСО на 1 мл гидрогеля имеет стабильные значения $\tan\delta < 1$.

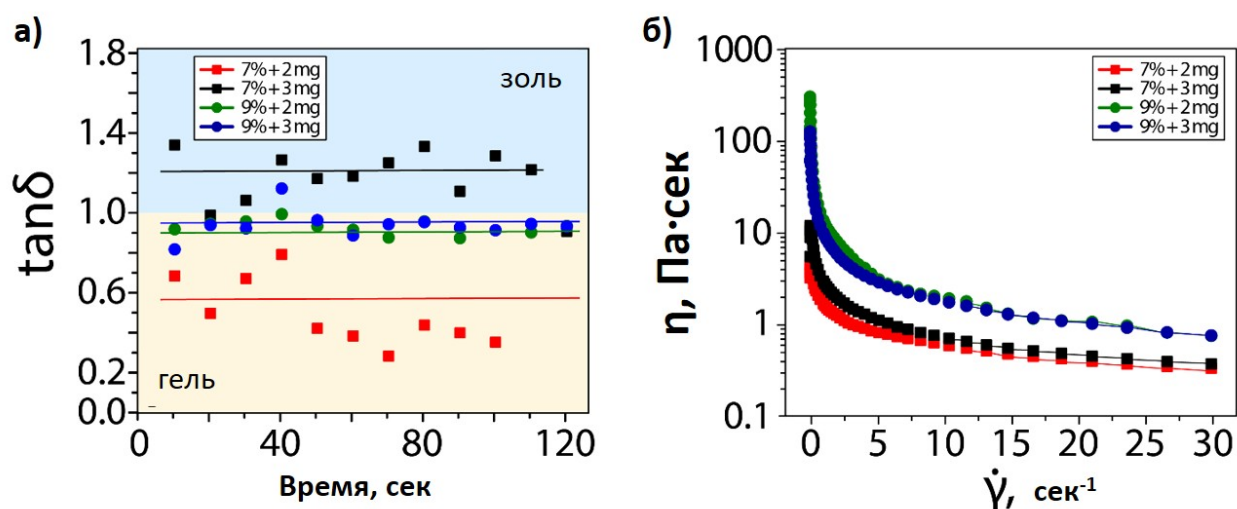


Рисунок 59 – (а) Зависимость $\tan\delta$ от времени при 37 °С НКЦ-графт-ПНИПАМ (7 масс. % и 9 масс. %), содержащем 40 мкг ПТК в 13 или 20 мкл ДМСО на 1 мл гидрогеля (приготовленного путем добавления аликвоты исходного раствора ПТК в ДМСО с концентрацией 3 или 2 мг/мл соответственно), (б) зависимость сдвиговой вязкости η водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ (7 масс. % и 9 масс. %) с ПТК (2 и 3 мг) от скорости сдвига $\dot{\gamma}$ при 37 °С

Свободные растворы ПТК тестировали в качестве контроля на клетках Т98G, прикрепленных как ко дну лунок (полистирол для культивирования клеток), так и к слоям гидрогеля, предварительно сформированным на дне лунок планшетов для культивирования клеток.

Как и ожидалось, ингибирующая активность свободного ПТК, протестированная в клетках Т98G, прикрепленных ко дну полистирольной лунки (стандартный протокол), была высокой: $IC_{50} = 8,5 \pm 1,1$ нг/мл. Согласно литературным данным, IC_{50} для свободного ПТК колеблется от 1,1 до 11,8 нг/мл, в зависимости от типа клеток [246–249]. В частности, IC_{50} свободного ПТК для клеток рака легких (A549) составляет 5,1 нг/мл [212], для клеток рака яичников (SKOV3, A2780 и COV318) составляет от 1,1 до 3,9 нг/мл [250], а для клеток рака молочной железы (MCF-7) составляет 11,8 нг/мл (14 нмоль/л) [249].

В свою очередь, значение IC_{50} свободного ПТК, определенное для клеток Т98G, прикрепленных к гидрогелю НКЦ-графт-ПНИПАМ, было заметно выше и достигло $22,8 \pm 0,9$ нг/мл. Учитывая, что количество высеванных клеток, время инкубации и другие параметры были одинаковыми в обоих экспериментах, увеличение значения IC_{50} может быть объяснено более высокой жизнеспособностью клеток, предварительно высеванных на 3D-слой гидрогеля, по сравнению с 2D-поверхностью полистирольной лунки. Недавно было обнаружено, что клетки A421, культивируемые в течение 72 ч на слое гидрогеля (3D-поверхность), состоящего из физически смешанных НКЦ и ПНИПАМ, росли внутри геля и демонстрировали усиленную пролиферацию по сравнению с клетками, непосредственно посеянными на поверхность полистирольной лунки (2D-поверхность) [236].

Было обнаружено, что IC_{50} гидрогелевой композиции НКЦ-графт-ПНИПАМ / ПТК в виде слоя, образованного на дне лунки в планшетах для культивирования клеток, составляет $93,9 \pm 12,1$ нг/мл. Этот результат по сравнению с обоими случаями тестирования ПТК в растворе может быть

обусловлен относительно медленной диффузией лекарственного средства из гидрогеля в раствор, а также положительным эффектом слоя гидрогеля, поддерживающего клетки. В целом, это может позволить вводить композицию с более высокой дозировкой лекарственного средства, чем при использовании раствора. В то же время можно ожидать, что такое поведение гидрогелевой композиции НКЦ-графт-ПНИПАМ/ПТК не обеспечит острой цитотоксичности головного мозга, но в то же время обеспечит длительный терапевтический эффект.

Особенности высвобождения лекарственного средства из геля были проанализированы с применением стандартных математических моделей (таблица 4, рисунок 60) [251–253]. Можно заметить, что экспериментальные данные о высвобождении лекарственных средств лучше аппроксимируются моделями Хигучи, Бейкера-Лонсдейла и Макоида-Банакара, основанными на диффузии, чем моделями, основанными на растворении или эрозии (модели Хиксона-Кроуэлла и Хопфенберга, соответственно). Отличная аппроксимация профиля высвобождения с помощью модели Корсемейера-Пеппаса позволила оценить параметр n , который указывает на механизм высвобождения.

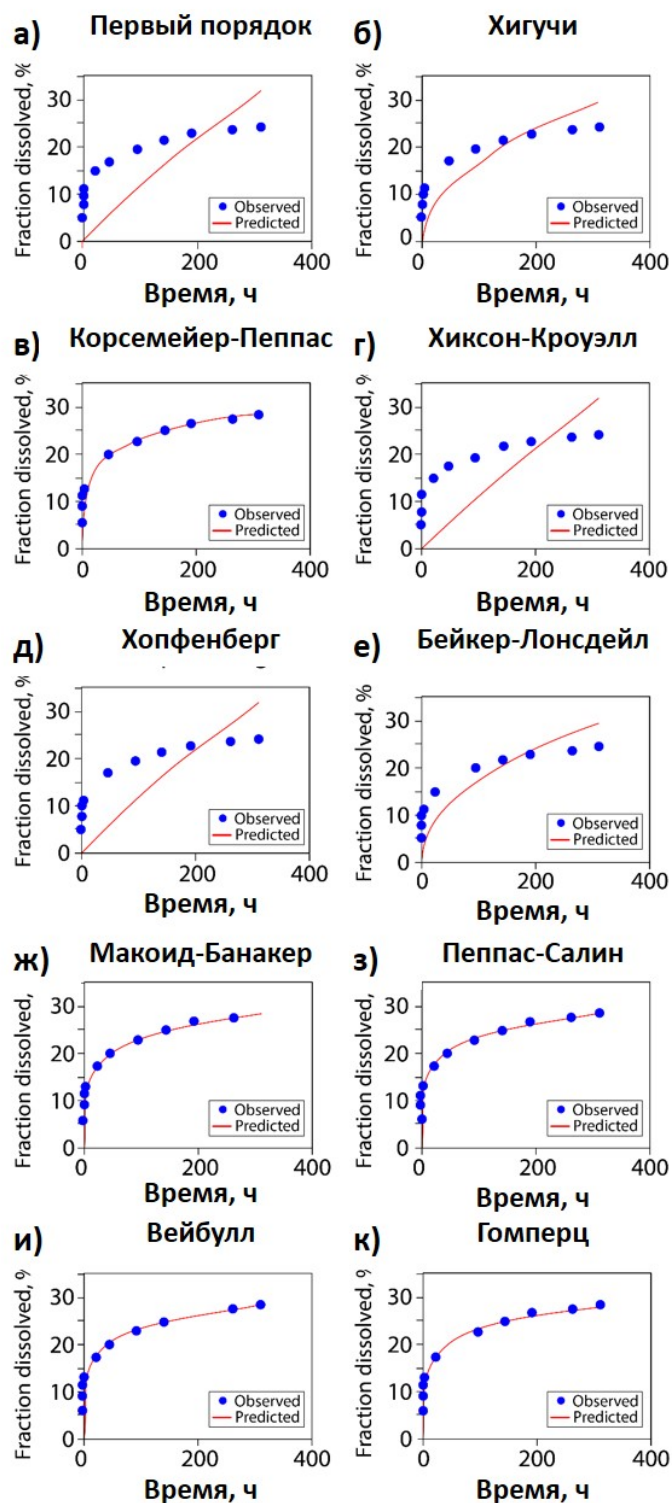


Рисунок 60 - Математические модели высвобождения лекарственных средств: (а) первого порядка, (б) Хигучи, (в) Корсемейер-Пеппас, (г) Хиксон-Кроуэлл, (д) Хопфенберг, (е) Бейкер-Лонсдейл, (ж) Макоид-Банакер, (з) Пеппас-Салин, (и) Вейбулл, (к) Гомперц

Отличная аппроксимация профиля высвобождения с помощью модели Корсмейера-Пеппаса позволила оценить параметр n , который указывает на механизм высвобождения. Значение этого параметра показывает, что диффузия по Фикку является лимитирующей стадией процесса высвобождения лекарственного средства. Это также согласуется с данными, полученными из модели Пеппаса-Сахлина, в которой k_1 и k_2 показывают влияние диффузии Фикиана и релаксации полимера, соответственно, на процесс высвобождения лекарственного средства. Можно заметить (таблица 1), что значение k_2 больше, чем значение k_1 .

Таблица 4 - Коэффициенты корреляции и расчетные параметры, полученные на основе математических моделей высвобождения лекарственных средств

Модель	Параметр	Значение
Нулевой порядок $F=k_{zo} \cdot t$	R^2	0,8935
	k_{zo}	0,103
Первый порядок $F=100 \cdot [1 - \text{Exp}(-k_{fo} \cdot t)]$	R^2	0,9096
	k_{fo}	$1,2 \cdot 10^{-3}$
Хигучи $F=k_H \cdot t^{0,5}$	R^2	0,9680
	k_H	1,68
Корсмейер-Пеппас $F=k_{KP} \cdot t^n$	R^2	0,9946
	k_{KP}	7,93
	n	0,2
Хиксон-Кроуэлл $F=100 \cdot [1 - (1 - k_{HC} \cdot t)^3]$	R^2	0,9044
	k_{HC}	$3,9 \cdot 10^{-4}$
Хопфенберг $F=100 \cdot [1 - (1 - k_{Hpb} \cdot t)^n]$	R^2	0,9095
	k_{Hpb}	$3,5 \cdot 10^{-6}$
Бейкер-Лонсдейл $3/2 \cdot [1 - (1 - F/100)^{(2/3)}] - F/100 = k_{BL} \cdot t$	R^2	0,9715
	k_{BL}	$5,4 \cdot 10^{-5}$

Продолжение таблицы 4

Модель	Параметр	Значение
Вейбулл $F=100 \cdot \{1 - \text{Exp}[-((t-T_i)^\beta)/\alpha]\}$	R^2	0,9987
	α	11,1
	β	0,2
Гомперц $F=100 \cdot \text{Exp}\{-\alpha \cdot \text{Exp}[-\beta \cdot \log(t)]\}$	R^2	0,9956
	α	2,6
	β	0,2
Пеппас-Сахлин $F=k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{(2 \cdot m)}$	R^2	0,9953
	k_1	8,2
	k_2	0,5
	m	0,2
Макоид-Банакар $F=k_{MB} \cdot t^n \cdot \text{Exp}(-k \cdot t)$	R^2	0,9949
	k_{MB}	7,8
	n	0,2
	k	$1,7 \cdot 10^{-4}$

Кинетический профиль высвобождения лекарственного средства также был хорошо аппроксимирован моделями Гомпертца и Вейбулла. Первая модель была разработана для рецептур растворимых лекарственных средств с немедленным высвобождением. Параметры модели α и β показывают количество не высвобожденного лекарственного средства и скорость высвобождения соответственно. Вторая модель (модель Вейбулла) представляет собой функцию распределения, которая не относится к какому-либо физическому или химическому процессу, но описывает высвобождение лекарственного средства как процесс, связанный с конечным временем. Параметр α определяет временные рамки процесса, в то время как β характеризует тип кривой высвобождения. Полученное значение последнего

(0,2) указывает на параболический тип кривой, которая обладает высоким начальным наклоном и постоянным экспоненциальным характером.

В целом, можно сделать вывод, что высвобождение лекарственного средства из термочувствительного геля является классическим процессом, контролируемым диффузией.

Вывод по главе

Разработан материал с термочувствительным гелеобразованием на основе НКЦ, привитого ПНИПАМ. Благодаря биосовместимости с эндотелиальными клетками и астроцитами (клетками мозга) гель перспективен для применения в качестве импланта участков мозга, удаленных хирургическим путем, а также микрофлюидных моделей мозга на чипе, пригодных для эффективного скрининга кандидатов на лекарственные препараты и анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера при патогенезе физиологических состояний. Результаты работы опубликованы в статье [254].

3.3 Мультистимул-чувствительный однослойный актюатор

Мультистимул-чувствительные гидрогели - важный класс мягких актюаторов, поскольку они позволяют расширить диапазон возможных движений и реакций, более точно имитируя живую материю. Термочувствительные чернила создают локальные внутренние напряжения, которые приводят к изменению формы гидрогеля. Магниточувствительные чернила позволяют перемещать гидрогель в пространстве, притягивая его к магниту.

3.3.1 Формирование чернил и их характеристика

На рисунке 61а показана схема изготовления двух разработанных типов чернил: термочувствительных (чернила 1) и магнитных (чернила 2). Термочувствительные чернила 1 состоят из водного раствора N-изопропилакриламида (НИПАМ), N,N'-метиленбисакриламида в качестве сшивающего вещества и УФ-инициатора, а также альгината натрия. Смесь этих веществ может быть подвергнута УФ-полимеризации с образованием ковалентно сшитого гидрогеля благодаря фотополимеризации чернил НИПАМ (рисунок 61б', 61б"). Последующее замачивание этого геля в водном растворе CaCl_2 улучшает его механические свойства за счет образования ионных сшивок в альгинате кальция. Магнитные чернила 2 были изготовлены на основе магнетита Fe_3O_4 , нанокристаллической целлюлозы и альгината натрия и представляет собой тиксотропный черный гидрогель (рисунок 61б", 61б"). Последующее замачивание этих гелей в водном растворе CaCl_2 приводит к исчезновению тиксотропных свойств и фиксации формы за счет образования ионных сшивок в альгинате кальция.

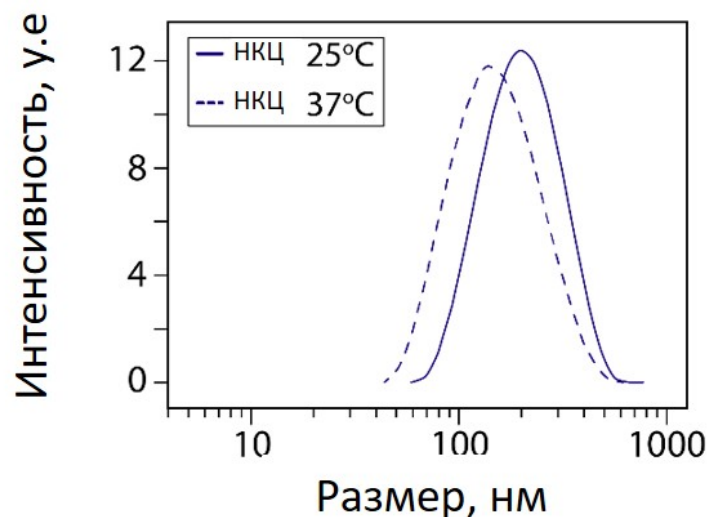


Рисунок 62 – Размер (длина и диаметр) наночастиц НКЦ для 25 и 37°C

На рисунке 61г представлен внешний вид частиц Fe_3O_4 , использованных для получения чернил 2. Для чернил 1 была проведена оптимизация времени облучения на основе исчезновения двойной связи в ИК-спектрах (рисунок 63). В обе композиции был добавлен альгинат натрия для склеивания полосок разных чернил. Высушенный гель был проанализирован методом ИК-спектроскопии. Согласно ИК спектрам (рисунок 63), у ПНИПАМ есть характеристические связи 1643 см^{-1} (амид I, пептидная $\nu\text{C}=\text{O}$ растягивание), 1537 см^{-1} (амид II, $\nu\text{N}-\text{H}$ изгиб, связанный с $\nu\text{C}-\text{H}$ растягиванием), 3403 см^{-1} ($\nu\text{N}-\text{H}$), 2971 см^{-1} ($\nu\text{C}-\text{H}$ в изопропильной группе). Для НКЦ характеристическими связями являются 3201 см^{-1} ($\nu\text{O}-\text{H}$), 1059 см^{-1} ($\nu\text{S}=\text{O}$) и 1162 см^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

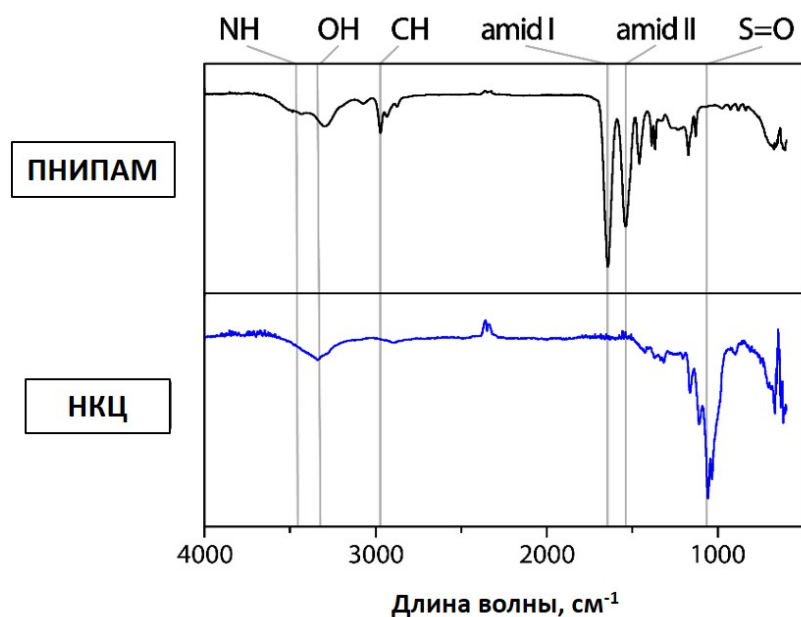


Рисунок 63 – ИК-спектры для ПНИПАМ (вверху) и НКЦ (снизу)

Дифракционные картины (рисунок 61д) соответствуют литературным данным для магнетита (Объединенный комитет по стандартам порошковой дифракции (ОКСПД № 19-0629) и для стандарта (МКЦ) (ОКСПД №00-060-1502) (Таблица 5).

Таблица 5 - Сравнение рентгеновских спектров образцов с литературными данными

Образец	2θ Образца	2θ ОКСПД	Н	К	Л
Fe ₃ O ₄	30.09	30.05	2	2	0
	35.46	35.42	3	1	1
	42.97	43.05	4	0	0
	53.46	53.40	4	2	2
	57.12	56.94	5	1	1
	62.48	62.52	4	4	0
МКЦ	15.26	14.81	1	1	0
	22.46	22.16	0	0	2
	34.37	34.62	0	0	3

Мы провели энергодисперсионный анализ, чтобы получить элементный спектр термочувствительных и магнитных чернил до и после добавления раствора хлорида кальция (рисунок 64). Мы обнаружили значительное снижение концентрации ионов натрия в чернилах, что связано с заменой их ионами кальция.

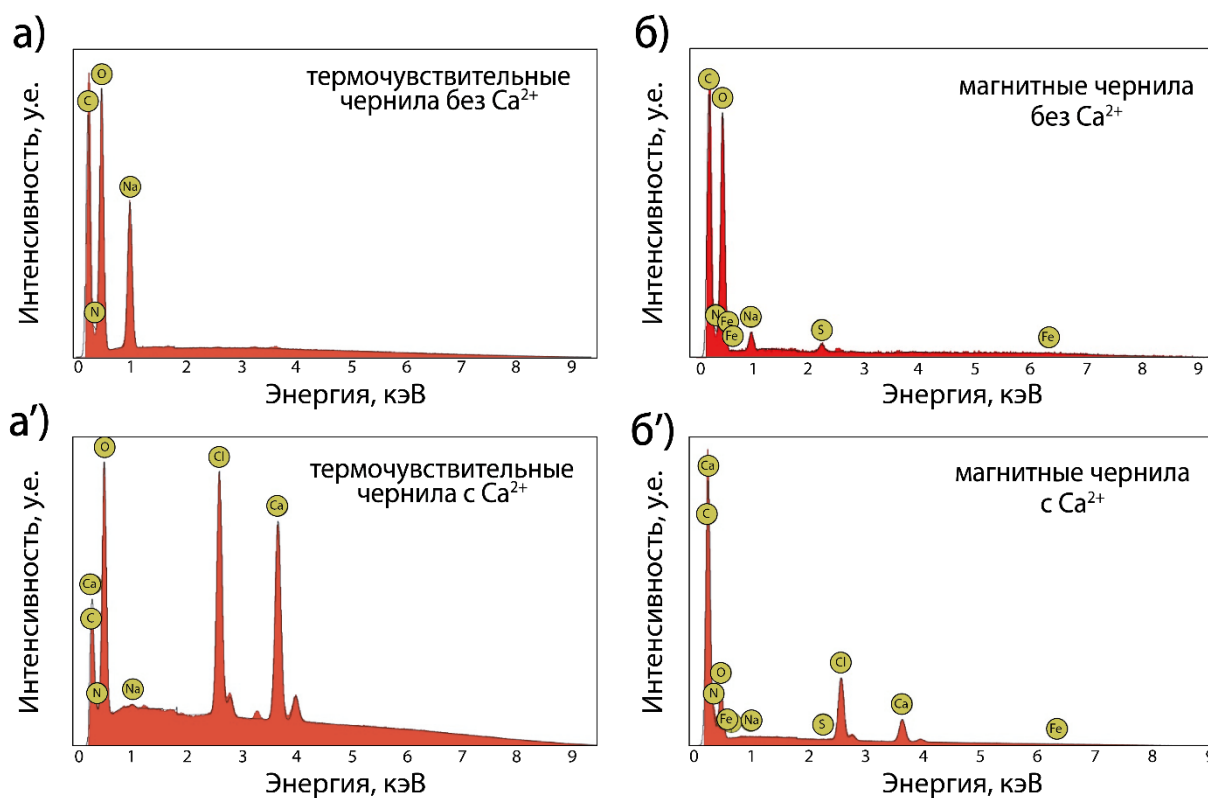


Рисунок 64 – Энергетический дисперсионный спектр, показывающий элементный состав двух типов чернил, использованных в экспериментах

На рисунке 65 показаны изображения с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) термочувствительных и магнитных чернил до и после замачивания в водном растворе CaCl_2 . Термочувствительные и магнитные чернила перед погружением в водный раствор CaCl_2 имеют гладкую поверхность с мелкими порами (для термочувствительных чернил) (рисунок 65а, б). После замачивания поверхность становится шероховатой из-за наличия поперечных связей (рисунок 65а', б').

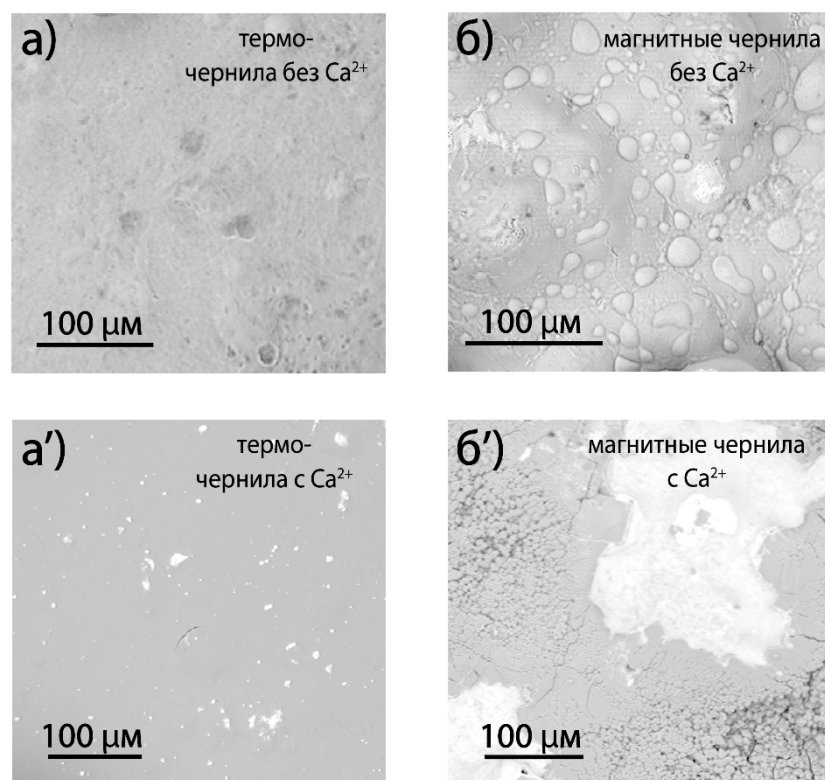


Рисунок 65 – СЭМ-изображение для: термочувствительных чернил до (а) и после (а') замачивания в водном растворе CaCl_2 , магнитных чернил до (б) и после (б') замачивания в водном растворе CaCl_2

Измерение магнитных свойств образца из синтезированных частиц магнетита (рисунок 66а) показывает, что намагниченность насыщения M_n (максимальное достигнутое значение намагниченности образца) не изменяется при повышении температуры с 23 до 37 °С (81 и 80 Э/Г соответственно). Магнитные свойства готовых чернил были подтверждены их притяжением к магниту (рисунок 66б). Кроме того, в исследуемом образце практически полностью отсутствовали коэрцитивная сила H_c и остаточная намагниченность M_R , что подтверждает суперпарамагнитное поведение материалов (рисунок 66в).

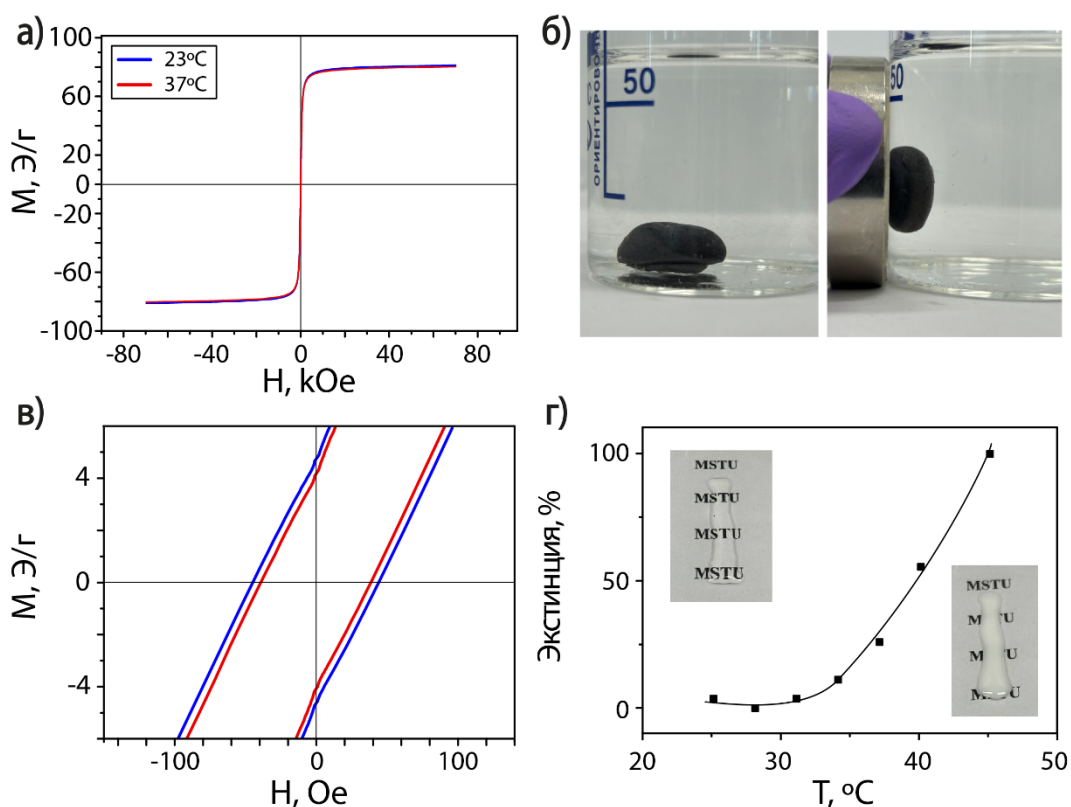


Рисунок 66 – (а) Магнитные кривые для образца синтезированного магнетита, (б) визуальное подтверждение магнитных свойств чернил: слева без магнита, справа – движение под действием магнита, (в) увеличение области слабого поля, показывающее симметрию петель гистерезиса, (г)

Изменение нормированного коэффициента затухания для термочувствительных чернил. На вставке слева и справа представлены фотографии геля при температуре 25 °С и 37 °С соответственно

Термочувствительные свойства чернил были проанализированы по изменению их прозрачности в эксперименте с изменением температуры (рисунок 66г). До 35 °С гидрогель был прозрачным, поскольку ПНИПАМ находился в виде раствора (рисунок 66г, фото в верхнем левом углу). При повышении температуры до 37 °С произошел переход ПНИПАМ в глобулу, сопровождающийся помутнением (рисунок 66г, фото в правом нижнем углу). Повышение температуры перехода ПНИПАМ в чернила по сравнению с переходом ПНИПАМ в водный раствор связано с присутствием

гидрофильных групп альгината натрия, которые приводят к повышению температуры перехода [255].

3.3.2 Реологические свойства чернил

Чернила обладают тиксотропными свойствами, то есть они способны разжижаться при приложенном напряжении. Для количественного подтверждения этого свойства были изучены показатели реологической вязкости η при различных скоростях сдвига $\dot{\gamma}$ (рисунок 67а). При $\dot{\gamma} = 0,1 \text{ с}^{-1}$ вязкость составляла 18834 и 640 Па·с для термочувствительных чернил и магнитных чернил, соответственно, а при $\dot{\gamma} = 30 \text{ с}^{-1}$ вязкость снижалась до 6 и 1,4 Па·с для термочувствительных чернил и магнитных чернил, соответственно. Мы также изучили восстановление η при циклическом изменении $\dot{\gamma}$ от 0,1 до 40 с^{-1} , то есть «самовосстанавливающиеся» свойства коллоидного геля, которые определяют его способность сохранять свою форму после напряжения сдвига или экструзии (рисунок 67б). Для термочувствительных чернил при начальном значении $\dot{\gamma} = 0,1 \text{ с}^{-1}$ значение η составляло $530 \pm 41 \text{ Па}\cdot\text{с}$, увеличение $\dot{\gamma}$ до 40 с^{-1} приводило к уменьшению η в 266 раз. Последующее снижение $\dot{\gamma}$ до 0,1 с^{-1} привело к увеличению η до $200 \pm 25 \text{ Па}\cdot\text{с}$, то есть к восстановлению почти на 40% от первоначального значения η . Для магнитных чернил начальное значение $\dot{\gamma} = 0,1 \text{ с}^{-1}$, значение $\eta = 42 \pm 5 \text{ Па}\cdot\text{с}$, увеличение $\dot{\gamma}$ до 40 с^{-1} привело к уменьшению η в 40 раз. Последующее снижение $\dot{\gamma}$ до 0,1 с^{-1} привело к увеличению η до $51 \pm 6 \text{ Па}\cdot\text{с}$, то есть к восстановлению на 121% первоначального значения η . Таким образом, оба вида чернил обладают реологическими свойствами, которые можно использовать для экструзионной печати или прямого письма чернилами: разжижаются при сдвиге (плавно протекают через сопло шприца) и быстро восстанавливают вязкость чернил после снижения напряжения сдвига (сохраняют форму после печати). Хотя планировалось, что

изготовление актюатора будет производиться при комнатной температуре, в этих условиях были изучены тиксотропные свойства.

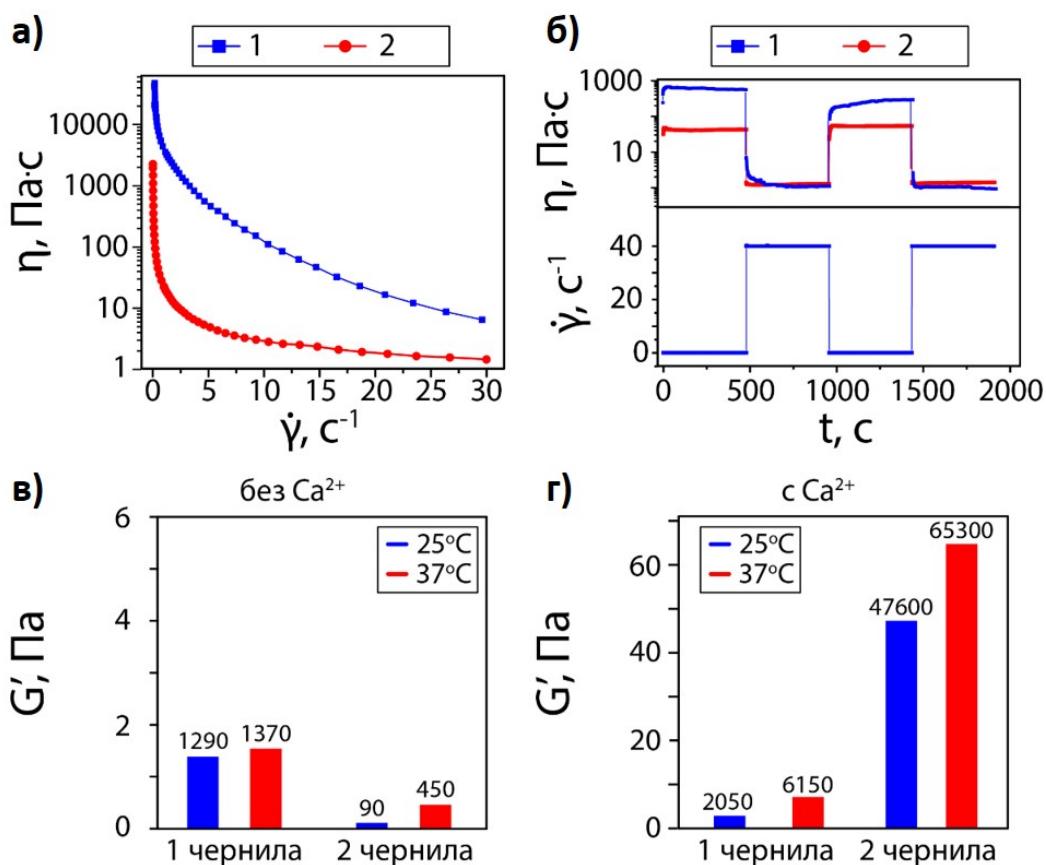


Рисунок 67 – (а) Изменение вязкости геля при сдвиге η , построенное в зависимости от скорости сдвига $\dot{\gamma}$ (чернила 1 - термочувствительные чернила, чернила 2 – магнитные чернила), (б) зависимость от времени вязкости геля при сдвиге η (вверху) при соответствующем изменении $\dot{\gamma}$ (внизу), (в) значения модуля хранения для чернил без добавления раствора хлорида кальция при 25 °C и 37 °C, (г) значения модуля хранения для чернил с добавлением раствора хлорида кальция при температуре 25 °C и 37 °C

Чтобы скрепить чернила между собой, к ним добавляли раствор хлорида кальция, образуя альгинат кальция из альгината натрия. Для изучения влияния ионов кальция на чернила были исследованы модули хранения G' для чернил без ионов кальция (рисунок 67в) и с добавлением ионов кальция (рисунок 67г) при 25 °C и 37 °C. Значения G' для термочувствительных чернил увеличились

в 1,6 раза при 25 °С (с 1290 Па до 2050 Па) и в 4,5 раза при 37 °С (с 1370 Па до 6150 Па) соответственно. Для магнитных чернил значения G' увеличились в 512 раз при 25 °С (с 90 Па до 47600 Па) и в 143 раза при 37 °С (с 450 Па до 65300 Па) соответственно. Разница между термо- и магнитными чернилами может быть обусловлена различным содержанием альгината натрия в составах чернил (67 мг/г и 240 мг/г для термо- и магнитных чернил соответственно).

Тем не менее, тиксотропия сохраняется даже при нагревании до 37 °С (рисунок 68), что позволяет создавать актюатор даже при нагревании. Тиксотропные свойства чернил были исследованы при температуре 25 и 37°С. Было показано, что температура не оказывает существенного влияния на наличие тиксотропии.

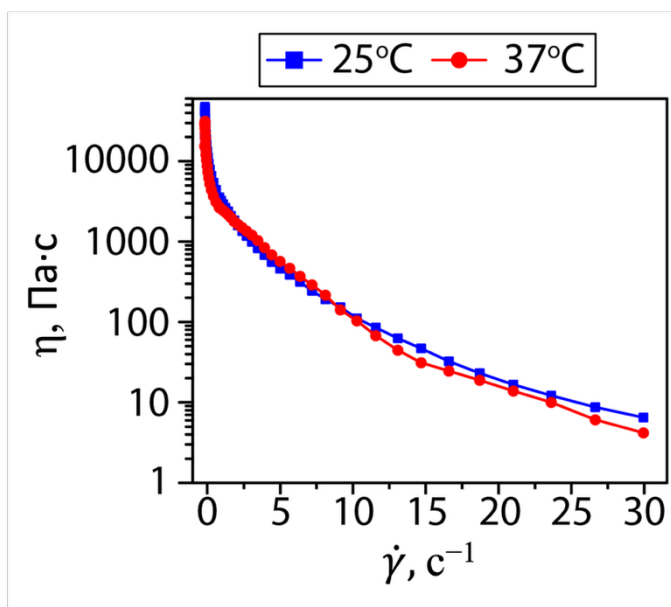


Рисунок 68 – Изменение сдвиговой вязкости η чернил 2, построенное в зависимости от скорости сдвига $\dot{\gamma}$ при 25 °С (синяя линия) и 37 °С (красная линия)

3.3.3 Формирование однослойного актюатора

Идея работы заключалась в том, чтобы объединить в одном материале два типа движения и возможность выполнять их по отдельности. Изменение формы было вызвано нанесением рисунка термочувствительными чернилами, а линейное перемещение всей системы в пространстве было результатом

притяжения к постоянному магниту из-за присутствия магнитных чернил. Чернила наносили на силиконовую подложку путем прямого нанесения чернилами с образованием рисунка желаемой формы, затем подвергали УФ-облучению в течение 15 мин при температуре от 0 до 5°C для полимеризации чернил 1 и превращения их в плотный гель, и на заключительном этапе лист гидрогеля помещали в чашку Петри, наполненную насыщенным раствором хлорида кальция для соединения частей рисунка друг с другом (рисунок 69). Компоненты различных чернил удерживаются вместе благодаря электростатическим силам и поперечным связям, образованным альгинатом кальция. Более подробно, термочувствительные чернила заряжены отрицательно (дзета-потенциал ПНИПАМ ζ , $\zeta < 0$), а магнитные чернила обладают положительным зарядом из-за избытка наночастиц магнетита ($\zeta = +33$ мВ), в то время как для НКЦ ζ составляет - 44 мВ. Добавление ионов кальция позволяет связывать полоски альгинатом кальция, который представляет собой плотный гель и не позволяет полоскам распадаться. При использовании температур выше 60 °C термопечать начинает слишком быстро набухать, а также разрушаться, что приводит к необратимому отделению полосок друг от друга.

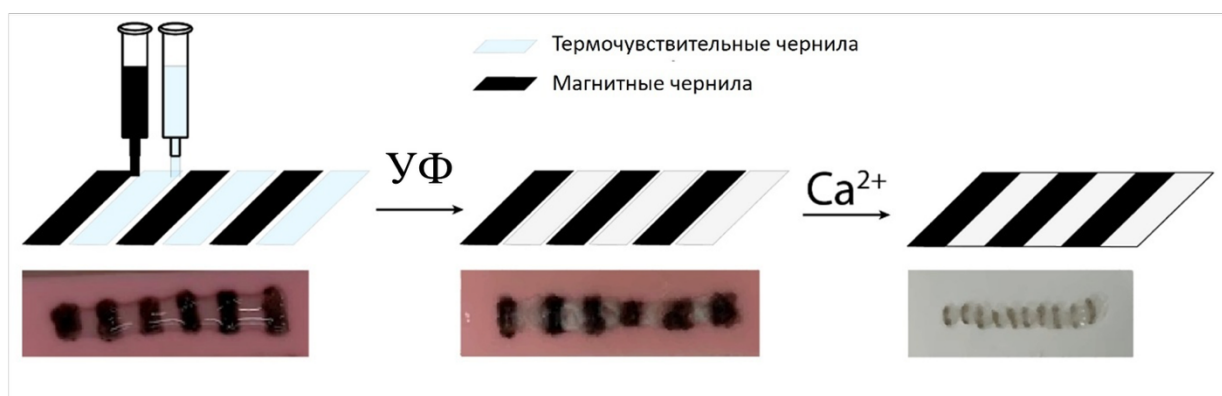


Рисунок 69 – Схема получения готового актюатора: прямое нанесение чернилами (слева), УФ-полимеризация (посередине), добавление раствора хлорида кальция (справа)

При изготовлении актюатора варьировался состав / соотношение компонентов, а также материал подложки, расстояние между подложкой и УФ-лампой и время УФ-полимеризации. Если в термочувствительные чернила добавить чрезмерное количество альгината натрия, активация может быть незаметна визуально, так как количества ПНИПАМ будет недостаточно для изменения формы. Первоначально изготовление актюатора было опробовано на стеклянной подложке, но после полимеризации отделить весь актюатор стало невозможно, поэтому в дальнейшем мы стали использовать силиконовую подложку.

Расстояние от подложки/актюатора до УФ-лампы влияло на степень полимеризации: если лампа находилась слишком далеко (более 15 см), полимеризация занимала очень много времени (более 40 минут) и не завершалась, если слишком близко (менее 10 см), то материал высыхал из-за теплового воздействия. Поэтому оптимальное расстояние - 10 см, а время - 15 минут. Кроме того, чтобы избежать чрезмерного высыхания материала во время полимеризации, рядом был поставлен стакан с холодной водой для поглощения избыточного тепла, а полимеризация происходила при температуре 14 °С.

Рисунок, основанный на чередующихся полосах двух чернил, мог скатываться из-за анизотропного набухания, имитируя поведение *Pteridium aquilinum* (рисунок 70а). Подготовленный однослойный лист гидрогеля помещали в воду, нагретую до 40 °С. В течение 30 секунд наблюдалось складывание актюатора из-за перехода ПНИПАМ в глобулу (рисунок 70а). Приведение в действие было обратимым, и гидрогели сохраняли способность притягиваться к магниту.

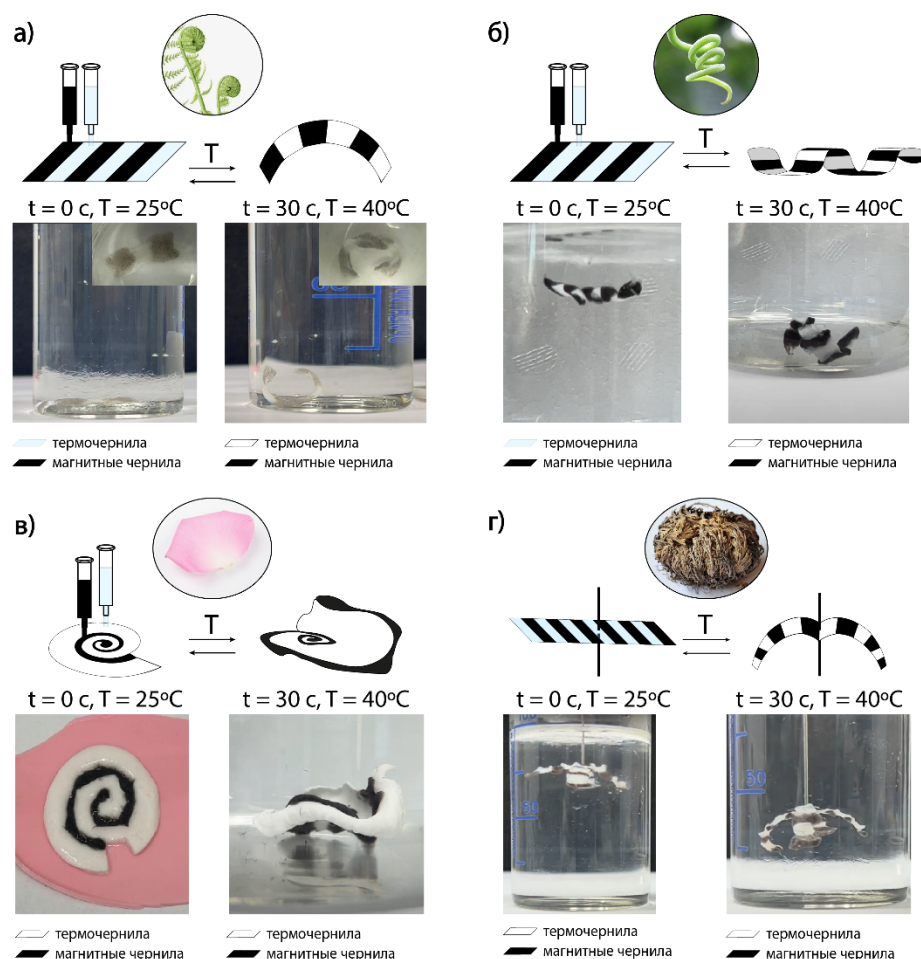


Рисунок 70 – (а) Схема обработки материала и внешний вид экструдированных однослойных листов гидрогеля при температуре 25 °С (слева) и изгиб актюатора при температуре 37 °С (справа). Изменение формы при приведении в действие, вдохновленная *Pteridium aquilinum*, (б) схема приведения в действие спирали и внешний вид актюатора при температуре 25 °С (слева) и изгибе материала при температуре 37 °С (справа). Трансформация формы при воздействии, вдохновленная *Pisum sativum*, (в) схема придания формы лепестка розы и внешний вид однослойного гидрогеля при 25 °С (слева) и трансформация формы материала при 37 °С (справа). Трансформация формы в результате приведения в действие, вдохновленная *Rosa odorata*, (г) Схема приведения в действие захвата и внешний вид однослойного гидрогелевого захватчика при температуре 25 °С (слева) и изгибе материала при температуре 37 °С (справа). Трансформация формы захвата, вдохновленная растениями *S. lepidophylla*

Когда полосы с разными красками располагались под углом к главной оси материала, вместо рулона получалась спираль (рисунок 70б), имитирующая изменение формы *Pisum sativum*. Более сложные узоры, например, плоская спираль, образуют формы, близкие к лепесткам цветов (рисунок 70в). Таким образом, вариации 2D-узора позволяют запрограммировать 3D-форму конечного материала за счет различий в набухании используемых чернил.

Более того, объединив несколько полосок, как на рисунке 70а, можно было сформировать мягкий захватчик, вдохновленный растениями *S. lepidophylla* (рисунок 70г). При повышении температуры захват на основе гидрогеля начал изгибаться из-за температурного перехода ПНИПАМ, имитирующего захват рукой. После охлаждения системы до 25 °С актюатор постепенно принимает свою плоскую форму. Сочетая способность изготовленного актюатора к изгибу и возможность магнитного отклика, эти характеристики делают его пригодным для манипулирования мягкими предметами.

Увеличение количества блоков позволяет контролировать кривизну результирующей формы. Рисунок 71 демонстрирует приведение в действие однослойного актюатора, состоящего всего из 3 полосок (блоков): чернила 1- чернила 2 – чернила 1. При температуре ниже НКТР актюатор на основе ПНИПАМ сохраняет свою первоначальную экструдированную плоскую форму (рисунок 71, слева), в то время как при температуре выше НКТР при температуре 40 °С он образует рулон из-за изгиба частей, содержащих ПНИПАМ, а магнитная часть существенно не изменяется. Рисунок 71б показывает способность актюатора перемещаться в пространстве при наличии магнитного поля, создаваемого постоянным магнитом. Эти два типа движений могут выполняться независимо друг от друга из-за их чувствительности к различным раздражителям.

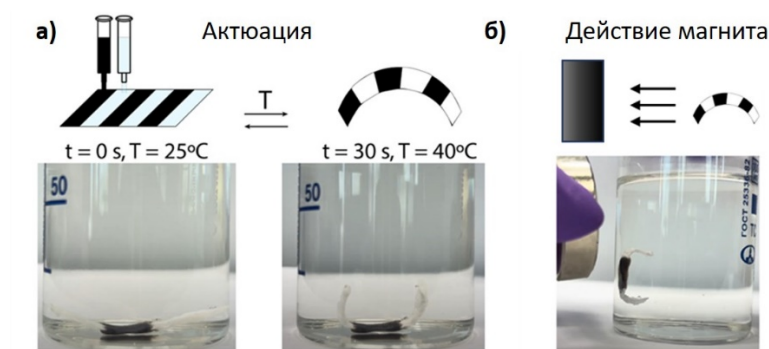


Рисунок 71 – а) Действие, вызванное различным набуханием чернил при температурах, превышающих температуру ПНИПАМ, б) перемещение актюатора в пространстве в результате притяжения к постоянному магниту

Для достижения большей кривизны привода мы использовали больше блоков (до 9, рисунок 71 и 72). Увеличение количества блоков приводит к более четкому изгибу.

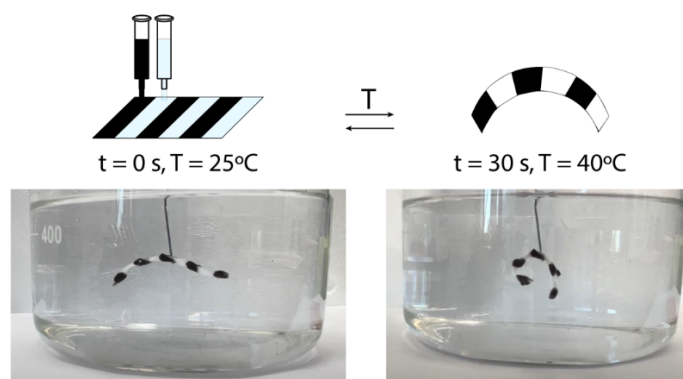


Рисунок 72 – Изгиб однослойного мультичувствительного актюатора с большим количеством блоков

Несмотря на то, что оба вида чернил демонстрируют высокую степень набухания (для термочувствительных чернил – до 1000%, для магнитных чернил – до 250%), достигаемую примерно через 1 час, это не влияет на наличие активации и не изменяет форму гидрогелей (рисунок 73а). Преобразование формы полученных структур повторялось, по крайней мере, в течение 3 циклов. Для определения степени набухания чернил их высушивали отдельно до постоянной массы и измеряли их массу. Затем образцы помещали в дистиллированную воду и через определенное время

измеряли массу образцов. В соответствии с этими данными был построен график увеличения массы.

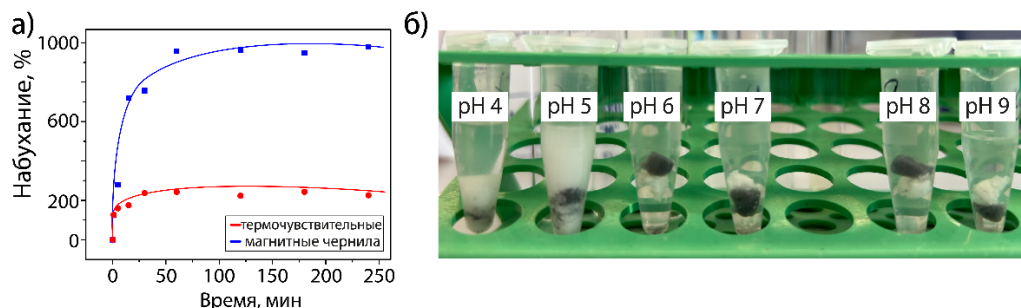


Рисунок 73 – а) Набухание чернил в водном растворе для обоих типов чернил. б) внешний вид чернил в различных буферах pH через 3 дня

Также исследовали термическую и химическую стойкость полученных чернил. Оба типа чернил не растворяются в холодной (до 25 °С) воде более недели. При нагревании выше 60 °С происходит необратимое разрушение термочувствительных чернил из-за разрушения ПНИПАМ. Исследование химической стабильности чернил проводили путем помещения их на три дня в буферы с pH от 4 до 9. Буферы готовили по ранее описанной методике [256]. Термочувствительные чернила были стабильны при физиологически значимом диапазоне pH от 6 до 9, в то время как при pH меньше 6 чернила резко набухали и теряли свою форму (рисунок 72б). Магнитные чернила оставались стабильными при pH от 4 до 9 (рисунок 72б).

Вывод по разделу

Создан мультистимульный актюатор, который при помещении в воду, нагретую до 40 °С, принимает запрограммированную за счет распределения компонентов форму и способен к перемещению за счет притяжения к постоянному магниту. Сочетание независимой реакции на стимулы и возможность программирования 3D-структуры актюатора делают его подходящим для производства медицинских устройств и инвазивных биомедицинских применений. Результаты работы опубликованы в статье [257].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты и выводы

1. Получены диаграммы состояния системы на основе ПНИПАМ и НКЦ при комнатной температуре (25 °С) и температуре живого организма (37 °С), выделены зоны золя, геля и осадка. Были выбраны составы, образующие гель и при 25 °С, и при 37 °С, и изучены их реологические свойства в зависимости от состава и температуры, а также была продемонстрирована их тиксотропность.

2. Показано, что коллоидные гели ПНИПАМ / НКЦ обладают фибриллярной структурой, термочувствительной прозрачностью и биосовместимостью с клетками, что делает эти гидрогели подходящими для имплантов и инъектируемых систем доставки лекарств. Предлагаемая гидрогелевая система представляет собой платформу для разработки биомедицинских мягких актюаторов, поскольку состоит из биосовместимых компонентов и работает в температурном диапазоне, близком к человеческому телу.

3. Разработан материал с термочувствительным гелеобразованием на основе НКЦ, к которым привит ПНИПАМ. Определен диапазон массовых концентраций коллоидной системы НКЦ-графт-ПНИПАМ для образования термочувствительного тиксотропного геля при 37 °С, изучены реологические свойства, подобраны такие массовые концентрации для соответствия параметрам разных отделов серого вещества мозга.

4. Обнаружена биосовместимость с эндотелиоцитами и астроцитами (первичными клетками мозга) геля НКЦ-графт-ПНИПАМ, поэтому он перспективен для применения в качестве импланта участков мозга, удаленных хирургическим путем, а также микрофлюидных моделей мозга на чипе, пригодных для эффективного скрининга кандидатов на лекарственные препараты и анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера при патогенезе физиологические состояния.

5. Получено два вида чернил: с термочувствительным откликом на основании ПНИПАМ и магнитным откликом за счет содержания магнетита. Совмещая чернила, был создан мультистимульный актюатор, который при помещении в воду, нагретую до 40 °С, принимает запрограммированную за счет распределения компонентов форму (ролл, спираль, лепесток и захватчик) имитирует движение растений и способен к перемещению за счет притяжения к постоянному магниту.

6. Изучена независимая реакция полученного актюатора на стимулы (температура и магнитное поле) и возможность программирования 3D-структуры. Эти свойства делают актюатор подходящим для производства медицинских устройств и инвазивных биомедицинских применений.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей работе применяют следующие сокращения с соответствующими обозначениями:

НКЦ	Нанокристаллическая целлюлоза
ПНИПАМ	Поли(N-изопропилакриламид)
ОПЦ	метод псевдоживой полимеризации с обратимой передачи цепи
НКЦ-графт-ПНИПАМ	НКЦ с привитым ПНИПАМ
НКТР	низшая критическая температура растворения
ТОФП	температура объемно-фазового перехода
ВПС	взаимопроникающие полимерные сети
ПВС	поливиниловый спирт
ПАМ	полиакриламид
поли(НИПАМ-АЭМА)	поли(НИПАМ-со-2-аминоэтилметакрилат гидрохлорид
ОГ	оксид графена
поли(НИПАМ-АА)	поли(НИПАМ-со-акриламид)
НИПАМ	N-изопропилакриламид
МЕМ	модифицированная среда Eagle
HBSS	Сбалансированный солевой раствор Хэнкса
ФБС	фетальная бычья сыворотка
T98G	клетки глиобластомы человека
A431	клетки карциномы человека
ПТК	паклитаксел
ДРС	динамическое рассеяние света
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

МТТ-анализ	колориметрический тест, тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
ДМФА	N,N - диметилформамид
АИБН	2,2'-азобис(2-метилпропионитрил)
ДМСО	диметилсульфоксид
ГПХ	гель-проникающая хроматография
IC50	концентрации полумаксимального ингибирования

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin X., Hoffman A.S., Stayton P.S. Poly(N -isopropylacrylamide- c o -propylacrylic acid) Copolymers That Respond Sharply to Temperature and pH // *Biomacromolecules*. 2006. Vol. 7, № 5. P. 1381–1385.
2. Heskins M., Guillet J.E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide) // *J. Macromol. Sci. Part A - Chem.* 1968. Vol. 2, № 8. P. 1441–1455.
3. Schild H.G. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application // *Prog. Polym. Sci.* 1992. Vol. 17, № 2. P. 163–249.
4. Najafi M. et al. Poly(N -isopropylacrylamide): Physicochemical Properties and Biomedical Applications // *Temperature-Responsive Polymers*. Wiley, 2018. P. 1–34.
5. Ito D., Kubota K. Solution Properties and Thermal Behavior of Poly(N - n -propylacrylamide) in Water // *Macromolecules*. 1997. Vol. 30, № 25. P. 7828–7834.
6. Ono Y., Shikata T. Hydration and Dynamic Behavior of Poly(N -isopropylacrylamide)s in Aqueous Solution: A Sharp Phase Transition at the Lower Critical Solution Temperature // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 31. P. 10030–10031.
7. Gandhi A. et al. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications // *Asian J. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 10, № 2. P. 99–107.
8. Taylor M., Tomlins P., Sahota T. Thermoresponsive Gels // *Gels*. 2017. Vol. 3, № 1. P. 4.
9. Xia L.-W. et al. Nano-structured smart hydrogels with rapid response and high elasticity // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4, № 1. P. 2226.
10. Pérez-Madrigal M.M. et al. Paradigm Shift for Preparing Versatile M²⁺-Free Gels from Unmodified Sodium Alginate // *Biomacromolecules*. 2017. Vol. 18, № 9. P. 2967–2979.

11. Lanza S. et al. Recent Advances in Poly(N -isopropylacrylamide) Hydrogels and Derivatives as Promising Materials for Biomedical and Engineering Emerging Applications // *Adv. Eng. Mater.* 2023. Vol. 25, № 4.
12. Cheng H., Shen L., Wu C. LLS and FTIR Studies on the Hysteresis in Association and Dissociation of Poly(N- isopropylacrylamide) Chains in Water // *Macromolecules*. 2006. Vol. 39, № 6. P. 2325–2329.
13. Xing B. et al. Hydrophobic Interaction and Hydrogen Bonding Cooperatively Confer a Vancomycin Hydrogel: A Potential Candidate for Biomaterials // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, № 50. P. 14846–14847.
14. Gallagher S. et al. Swelling and Shrinking Properties of Thermo-Responsive Polymeric Ionic Liquid Hydrogels with Embedded Linear pNIPAAm // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15, № 4. P. 5337–5349.
15. Lin S.-Y., Chen K.-S., Run-Chu L. Drying methods affecting the particle sizes, phase transition, deswelling/reswelling processes and morphology of poly(N-isopropylacrylamide) microgel beads // *Polymer (Guildf)*. 1999. Vol. 40, № 23. P. 6307–6312.
16. Katsumoto Y. et al. Conformational Change of Poly(N -isopropylacrylamide) during the Coil–Globule Transition Investigated by Attenuated Total Reflection/Infrared Spectroscopy and Density Functional Theory Calculation // *J. Phys. Chem. A*. 2002. Vol. 106, № 14. P. 3429–3435.
17. Dybal J., Trchová M., Schmidt P. The role of water in structural changes of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide) studied by FTIR, Raman spectroscopy and quantum chemical calculations // *Vib. Spectrosc.* 2009. Vol. 51, № 1. P. 44–51.
18. Boutris C., Chatzi E.G., Kiparissides C. Characterization of the LCST behaviour of aqueous poly(N-isopropylacrylamide) solutions by thermal and cloud point techniques // *Polymer (Guildf)*. 1997. Vol. 38, № 10. P. 2567–2570.
19. Zhuo R., Li W. Preparation and characterization of macroporous poly(N -isopropylacrylamide) hydrogels for the controlled release of proteins // *J. Polym.*

Sci. Part A Polym. Chem. 2003. Vol. 41, № 1. P. 152–159.

20. Zhao Z. et al. Fast synthesis of temperature-sensitive PNIPAAm hydrogels by microwave irradiation // Eur. Polym. J. 2008. Vol. 44, № 4. P. 1217–1224.

21. Ohya S., Kidoaki S., Matsuda T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: interrelationship between microscopic structure and mechanical property of surface regions and cell adhesiveness // Biomaterials. 2005. Vol. 26, № 16. P. 3105–3111.

22. Li H. et al. Modeling and Simulation of the Swelling Behavior of pH-Stimulus-Responsive Hydrogels // Biomacromolecules. 2005. Vol. 6, № 1. P. 109–120.

23. Gao G. et al. Snap-Buckling Motivated Controllable Jumping of Thermo-Responsive Hydrogel Bilayers // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2018. Vol. 10, № 48. P. 41724–41731.

24. Keerl M., Richtering W. Synergistic depression of volume phase transition temperature in copolymer microgels // Colloid Polym. Sci. 2006. Vol. 285, № 4. P. 471–474.

25. Erol O. et al. Transformer Hydrogels: A Review // Adv. Mater. Technol. 2019. Vol. 4, № 4.

26. Hirokawa Y., Tanaka T. Volume phase transition in a nonionic gel // J. Chem. Phys. 1984. Vol. 81, № 12. P. 6379–6380.

27. Ju G. et al. Smart Transportation Between Three Phases Through a Stimulus-Responsive Functionally Cooperating Device // Adv. Mater. 2013. Vol. 25, № 21. P. 2915–2919.

28. Sun T., Song W., Jiang L. Control over the responsive wettability of poly(N-isopropylacrylamide) film in a large extent by introducing an irresponsive molecule // Chem. Commun. 2005. № 13. P. 1723.

29. Wang X., Wu C. Light-Scattering Study of Coil-to-Globule Transition of a Poly(N -isopropylacrylamide) Chain in Deuterated Water // Macromolecules.

1999. Vol. 32, № 13. P. 4299–4301.

30. Wang M. et al. Binary Solvent Colloids of Thermosensitive Poly(N -isopropylacrylamide) Microgel for Smart Windows // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014. Vol. 53, № 48. P. 18462–18472.

31. Füllbrandt M. et al. Dynamics of Linear Poly(N -isopropylacrylamide) in Water around the Phase Transition Investigated by Dielectric Relaxation Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B.* 2014. Vol. 118, № 13. P. 3750–3759.

32. Hirotsu S. Phase Transition of a Polymer Gel in Pure and Mixed Solvent Media // *J. Phys. Soc. Japan.* 1987. Vol. 56, № 1. P. 233–242.

33. Zhang Y. et al. Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 41. P. 14505–14510.

34. Narayana S., Ahmed M.G. Design and evaluation of ocular hydrogel containing combination of ofloxacin and dexamethasone for the treatment of conjunctivitis // *Brazilian J. Pharm. Sci.* 2022. Vol. 58.

35. Tibbitt M.W., Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. Vol. 103, № 4. P. 655–663.

36. Shi Y. et al. Energy gels: A bio-inspired material platform for advanced energy applications // *Nano Today.* 2016. Vol. 11, № 6. P. 738–762.

37. Bustamante-Torres M. et al. Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials // *Gels.* 2021. Vol. 7, № 4. P. 182.

38. Hong F. et al. Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review // *Food Chem. X.* 2024. Vol. 21. P. 101095.

39. Ahmed E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review // *J. Adv. Res.* 2015. Vol. 6, № 2. P. 105–121.

40. Lin F. et al. In situ polymerization approach to cellulose–polyacrylamide interpenetrating network hydrogel with high strength and pH-responsive properties // *Cellulose.* 2019. Vol. 26, № 3. P. 1825–1839.

41. Lanza S. et al. Dual-Responsive Polypropylene Meshes Actuating as Thermal and SERS Sensors // ACS Biomater. Sci. Eng. 2022. Vol. 8, № 8. P. 3329–3340.
42. Ali A., Ahmed S. Recent Advances in Edible Polymer Based Hydrogels as a Sustainable Alternative to Conventional Polymers // J. Agric. Food Chem. 2018. Vol. 66, № 27. P. 6940–6967.
43. Armelin E. et al. Protective Coatings for Aluminum Alloy Based on Hyperbranched 1,4-Polytriazoles // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. Vol. 9, № 4. P. 4231–4243.
44. Ahmed E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review // J. Adv. Res. 2015. Vol. 6, № 2. P. 105–121.
45. Zarzyka I., Pyda M., Di Lorenzo M.L. Influence of crosslinker and ionic comonomer concentration on glass transition and demixing/mixing transition of copolymers poly(N-isopropylacrylamide) and poly(sodium acrylate) hydrogels // Colloid Polym. Sci. 2014. Vol. 292, № 2. P. 485–492.
46. Ma X.M. et al. Restorable, high-strength poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels constructed through chitosan-based dual macro-cross-linkers with rapid response to temperature jumps // RSC Adv. 2017. Vol. 7, № 75. P. 47767–47774.
47. Li Y. et al. Preparation and characterization of PAM/SA tough hydrogels reinforced by IPN technique based on covalent/ionic crosslinking // J. Appl. Polym. Sci. 2015. Vol. 132, № 4.
48. Zhao D. et al. Facile synthesis of self-healing and layered sodium alginate/polyacrylamide hydrogel promoted by dynamic hydrogen bond // Carbohydr. Polym. 2021. Vol. 256. P. 117580.
49. Xiao J. et al. Freeze-Thawing Chitosan/Ions Hydrogel Coated Gauzes Releasing Multiple Metal Ions on Demand for Improved Infected Wound Healing // Adv. Healthc. Mater. 2021. Vol. 10, № 6.
50. Li G. et al. Self-assembly of thermo- and pH-responsive poly(acrylic acid)- b -poly(N -isopropylacrylamide) micelles for drug delivery // J. Polym. Sci.

Part A Polym. Chem. 2008. Vol. 46, № 15. P. 5028–5035.

51. Sperling L.H. Interpenetrating Polymer Networks: An Overview. 1994. P. 3–38.

52. Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications // Adv. Drug Deliv. Rev. 2012. Vol. 64. P. 18–23.

53. Brahima S. et al. Modeling of drug release behavior of pH and temperature sensitive poly(NIPAAm- co -AAc) IPN hydrogels using response surface methodology and artificial neural networks // Mater. Sci. Eng. C. 2017. Vol. 75. P. 425–432.

54. Liu M., Su H., Tan T. Synthesis and properties of thermo- and pH-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)/polyaspartic acid IPN hydrogels // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 87, № 4. P. 2425–2431.

55. Kamoun E.A. et al. Thermo-and pH-sensitive hydrogel membranes composed of poly(N-isopropylacrylamide)-hyaluronan for biomedical applications: Influence of hyaluronan incorporation on the membrane properties // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 106. P. 158–167.

56. Liu M., Su H., Tan T. Synthesis and properties of thermo- and pH-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)/polyaspartic acid IPN hydrogels // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 87, № 4. P. 2425–2431.

57. Wu J. et al. Biomedical applications of stimuli-responsive “smart” interpenetrating polymer network hydrogels // Mater. Today Bio. 2024. Vol. 25. P. 100998.

58. Sato Matsuo E., Tanaka T. Kinetics of discontinuous volume–phase transition of gels // J. Chem. Phys. 1988. Vol. 89, № 3. P. 1695–1703.

59. Shibayama M., Nagai K. Shrinking Kinetics of Poly(N -isopropylacrylamide) Gels T -Jumped across Their Volume Phase Transition Temperatures // Macromolecules. 1999. Vol. 32, № 22. P. 7461–7468.

60. Friedrich T. et al. Thermoresponsive Copolymer Hydrogels on the Basis of N -Isopropylacrylamide and a Non-Ionic Surfactant Monomer: Swelling

Behavior, Transparency and Rheological Properties // *Macromolecules*. 2010. Vol. 43, № 23. P. 9964–9971.

61. Liu C.-Y. et al. Thermal-/Light-Tunable Hydrogels Showing Reversible Widening and Closing Actuators Based on Predesigned Interpenetrated Networks // *ACS Appl. Polym. Mater.* 2022. Vol. 4, № 3. P. 1931–1939.

62. Lee E. et al. Photothermally driven fast responding photo-actuators fabricated with comb-type hydrogels and magnetite nanoparticles // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 15124.

63. Wang Z.-C. et al. In Situ Formation of Thermosensitive PNIPAAm-Based Hydrogels by Michael-Type Addition Reaction // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2010. Vol. 2, № 4. P. 1009–1018.

64. Morozova S.M. Recent Advances in Hydrogels via Diels–Alder Crosslinking: Design and Applications // *Gels*. 2023. Vol. 9, № 2. P. 102.

65. Lee E. et al. Photothermally driven fast responding photo-actuators fabricated with comb-type hydrogels and magnetite nanoparticles // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 15124.

66. Rana M.M. et al. Effects of synthesis-solvent polarity on the physicochemical and rheological properties of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAm) hydrogels // *J. Mater. Res. Technol.* 2021. Vol. 13. P. 769–786.

67. Li Q.-F. et al. Highly luminescent hydrogels synthesized by covalent grafting of lanthanide complexes onto PNIPAM via one-pot free radical polymerization // *J. Mater. Chem. C*. 2016. Vol. 4, № 15. P. 3195–3201.

68. Kim S., Healy K.E. Synthesis and Characterization of Injectable Poly(N -isopropylacrylamide- co -acrylic acid) Hydrogels with Proteolytically Degradable Cross-Links // *Biomacromolecules*. 2003. Vol. 4, № 5. P. 1214–1223.

69. Bom S. et al. Diving into 3D (bio)printing: A revolutionary tool to customize the production of drug and cell-based systems for skin delivery // *Int. J. Pharm.* 2021. Vol. 605. P. 120794.

70. Bom S. et al. Effects of Starch Incorporation on the Physicochemical

Properties and Release Kinetics of Alginate-Based 3D Hydrogel Patches for Topical Delivery // *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, № 8. P. 719.

71. Economidou S.N., Lamprou D.A., Douroumis D. 3D printing applications for transdermal drug delivery // *Int. J. Pharm.* 2018. Vol. 544, № 2. P. 415–424.

72. Gu Z. et al. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications // *Asian J. Pharm. Sci.* 2020. Vol. 15, № 5. P. 529–557.

73. Kirchmayer D.M., Gorkin III R., in het Panhuis M. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing // *J. Mater. Chem. B*. 2015. Vol. 3, № 20. P. 4105–4117.

74. Kotta S., Nair A., Alsabeelah N. 3D Printing Technology in Drug Delivery: Recent Progress and Application // *Curr. Pharm. Des.* 2019. Vol. 24, № 42. P. 5039–5048.

75. Ngo T.D. et al. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges // *Compos. Part B Eng.* 2018. Vol. 143. P. 172–196.

76. Prasad L.K., Smyth H. 3D Printing technologies for drug delivery: a review // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2016. Vol. 42, № 7. P. 1019–1031.

77. Wang S., Lee J.M., Yeong W.Y. Smart hydrogels for 3D bioprinting // *Int. J. Bioprinting*. 2024. Vol. 1, № 1. P. 3.

78. Firth J., Basit A.W., Gaisford S. The Role of Semi-Solid Extrusion Printing in Clinical Practice. 2018. P. 133–151.

79. Gillispie G. et al. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability // *Biofabrication*. 2020. Vol. 12, № 2. P. 022003.

80. Herrada-Manchón H., Fernández M.A., Aguilar E. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters? // *Gels*. 2023. Vol. 9, № 7. P. 517.

81. Tang G., Du B., Stadler F.J. A novel approach to analyze the rheological properties of hydrogels with network structure simulation // *J. Polym.*

Res. 2018. Vol. 25, № 1. P. 4.

82. Stojkov G. et al. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications // Gels. 2021. Vol. 7, № 4. P. 255.

83. Ribeiro A. et al. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting // Biofabrication. 2017. Vol. 10, № 1. P. 014102.

84. Skardal A. et al. Bioprinting Cellularized Constructs Using a Tissue-specific Hydrogel Bioink // J. Vis. Exp. 2016. № 110.

85. Cui X. et al. Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks // Adv. Healthc. Mater. 2020. Vol. 9, № 15.

86. You F., Eames B.F., Chen X. Application of Extrusion-Based Hydrogel Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering // Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18, № 7. P. 1597.

87. Schwab A. et al. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting // Chem. Rev. 2020. Vol. 120, № 19. P. 11028–11055.

88. Seoane-Viaño I. et al. Semi-solid extrusion 3D printing in drug delivery and biomedicine: Personalised solutions for healthcare challenges // J. Control. Release. 2021. Vol. 332. P. 367–389.

89. Amorim P.A. et al. Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting // Bioprinting. 2021. Vol. 22. P. e00129.

90. Bom S. et al. On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour // Int. J. Pharm. 2022. Vol. 615. P. 121506.

91. Cooke M.E., Rosenzweig D.H. The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting // APL Bioeng. 2021. Vol. 5, № 1.

92. Shahbazi M., Jäger H. Current Status in the Utilization of Biobased Polymers for 3D Printing Process: A Systematic Review of the Materials, Processes, and Challenges // ACS Appl. Bio Mater. 2021. Vol. 4, № 1. P. 325–369.

93. Chhabra R.P., Richardson J.F. Non-Newtonian flow in the process

industries: fundamentals and engineering applications. Butterworth-Heinemann, 1999.

94. Encyclopedia of Tribology / ed. Wang Q.J., Chung Y.-W. Boston, MA: Springer US, 2013.

95. Ramesh S. et al. Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities // Bioprinting. 2021. Vol. 21. P. e00116.

96. Mohammed A.A. et al. Optimization of semisolid extrusion (pressure-assisted microsyringe)-based 3D printing process for advanced drug delivery application // Ann. 3D Print. Med. 2021. Vol. 2. P. 100008.

97. Townsend J.M. et al. Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting // Prog. Polym. Sci. 2019. Vol. 91. P. 126–140.

98. Jiang T. et al. Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication // Appl. Phys. Rev. 2019. Vol. 6, № 1.

99. Zhang X. et al. Crosslinker-free silk/decellularized extracellular matrix porous bioink for 3D bioprinting-based cartilage tissue engineering // Mater. Sci. Eng. C. 2021. Vol. 118. P. 111388.

100. Tang L. et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications // Prog. Mater. Sci. 2021. Vol. 115. P. 100702.

101. Tadepalli S. et al. Bio-Optics and Bio-Inspired Optical Materials // Chem. Rev. 2017. Vol. 117, № 20. P. 12705–12763.

102. Yin X. et al. Highly transparent, strong, and flexible fluorographene/fluorinated polyimide nanocomposite films with low dielectric constant // J. Mater. Chem. C. 2018. Vol. 6, № 24. P. 6378–6384.

103. Kanai T. et al. Fabrication of Tunable Spherical Colloidal Crystals Immobilized in Soft Hydrogels // Small. 2010. Vol. 6, № 7. P. 807–810.

104. Li S. et al. Polarization-induced alignment of azobenzene/fluorinated polyimide for three-dimensional shape-persistent and photo-responsive elastic helices // Compos. Sci. Technol. 2019. Vol. 169. P. 158–166.

105. Omer A.M. Energy, environment and sustainable development // *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2008. Vol. 12, № 9. P. 2265–2300.
106. Wang S. et al. Supramolecular strategy for smart windows // *Chem. Commun.* 2019. Vol. 55, № 29. P. 4137–4149.
107. Wang L. et al. Stimuli-directed self-organized chiral superstructures for adaptive windows enabled by mesogen-functionalized graphene // *Mater. Today.* 2017. Vol. 20, № 5. P. 230–237.
108. Khandelwal H., Schenning A.P.H.J., Debije M.G. Infrared Regulating Smart Window Based on Organic Materials // *Adv. Energy Mater.* 2017. Vol. 7, № 14.
109. Ghosh A., Norton B. Advances in switchable and highly insulating autonomous (self-powered) glazing systems for adaptive low energy buildings // *Renew. Energy.* 2018. Vol. 126. P. 1003–1031.
110. Gao Y. et al. A novel soft matter composite material for energy-saving smart windows: from preparation to device application // *J. Mater. Chem. A.* 2015. Vol. 3, № 20. P. 10738–10746.
111. Ke Y. et al. Emerging Thermal-Responsive Materials and Integrated Techniques Targeting the Energy-Efficient Smart Window Application // *Adv. Funct. Mater.* 2018. Vol. 28, № 22.
112. Li X.-H. et al. Broadband Light Management with Thermochromic Hydrogel Microparticles for Smart Windows // *Joule.* 2019. Vol. 3, № 1. P. 290–302.
113. Zhou Y. et al. Temperature-responsive hydrogel with ultra-large solar modulation and high luminous transmission for “smart window” applications // *J. Mater. Chem. A.* 2014. Vol. 2, № 33. P. 13550–13555.
114. Zhou Y. et al. VO₂/hydrogel hybrid nanothermochromic material with ultra-high solar modulation and luminous transmission // *J. Mater. Chem. A.* 2015. Vol. 3, № 3. P. 1121–1126.
115. Wang Y. et al. VO₂@SiO₂/Poly(N-isopropylacrylamide) Hybrid

Nanothermochromic Microgels for Smart Window // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2018. Vol. 57, № 38. P. 12801–12808.

116. Li X.-H. et al. Broadband Light Management with Thermochromic Hydrogel Microparticles for Smart Windows // *Joule*. 2019. Vol. 3, № 1. P. 290–302.

117. Wang S. et al. Warm/cool-tone switchable thermochromic material for smart windows by orthogonally integrating properties of pillar[6]arene and ferrocene // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 1737.

118. Wei G. et al. Thermal-responsive PNIPAm-acrylic/Ag NRs hybrid hydrogel with atmospheric window full-wavelength thermal management for smart windows // *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*. 2020. Vol. 206. P. 110336.

119. Zou M. et al. A thermo-sensitive, injectable and biodegradable in situ hydrogel as a potential formulation for uveitis treatment // *J. Mater. Chem. B*. 2019. Vol. 7, № 28. P. 4402–4412.

120. Tan H. et al. Thermosensitive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 36. P. 6844–6853.

121. Takahashi H. et al. Controlled Chain Length and Graft Density of Thermoresponsive Polymer Brushes for Optimizing Cell Sheet Harvest // *Biomacromolecules*. 2010. Vol. 11, № 8. P. 1991–1999.

122. Gupta M.K. et al. Cell Protective, ABC Triblock Polymer-Based Thermoresponsive Hydrogels with ROS-Triggered Degradation and Drug Release // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, № 42. P. 14896–14902.

123. Zhan Y. et al. Thermo/redox/pH-triple sensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels for anticancer drug delivery // *J. Mater. Chem. B*. 2015. Vol. 3, № 20. P. 4221–4230.

124. Mohan A. et al. pNIPAm-Based pH and Thermoresponsive Copolymer Hydrogel for Hydrophobic and Hydrophilic Drug Delivery // *Gels*. 2024. Vol. 10, № 3. P. 184.

125. Choi J.H. et al. Development of a Temperature-Responsive Hydrogel

Incorporating PVA into NIPAAm for Controllable Drug Release in Skin Regeneration // ACS Omega. 2023. Vol. 8, № 46. P. 44076–44085.

126. Choi J.H. et al. Development of a Temperature-Responsive Hydrogel Incorporating PVA into NIPAAm for Controllable Drug Release in Skin Regeneration // ACS Omega. 2023. Vol. 8, № 46. P. 44076–44085.

127. Agostinis P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update // CA. Cancer J. Clin. 2011. Vol. 61, № 4. P. 250–281.

128. Overchuk M. et al. Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine // ACS Nano. 2023. Vol. 17, № 9. P. 7979–8003.

129. Luo Z. et al. Lanthanide-based nanoparticles for cancer phototherapy // Coord. Chem. Rev. 2024. Vol. 508. P. 215773.

130. Gan S. et al. Recent Advances in Hydrogel-Based Phototherapy for Tumor Treatment // Gels. 2023. Vol. 9, № 4. P. 286.

131. Shin H.H. et al. Near-Infrared Light-Triggered Thermo-responsive Poly(N-Isopropylacrylamide)-Pyrrole Nanocomposites for Chemo-photothermal Cancer Therapy // Nanoscale Res. Lett. 2020. Vol. 15, № 1. P. 214.

132. Shin H.H. et al. Near-Infrared Light-Triggered Thermo-responsive Poly(N-Isopropylacrylamide)-Pyrrole Nanocomposites for Chemo-photothermal Cancer Therapy // Nanoscale Res. Lett. 2020. Vol. 15, № 1. P. 214.

133. Rodrigues M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective // Physiol. Rev. 2019. Vol. 99, № 1. P. 665–706.

134. Su J. et al. Hydrogel Preparation Methods and Biomaterials for Wound Dressing // Life. 2021. Vol. 11, № 10. P. 1016.

135. Hu J. et al. Thermosensitive PNIPAM-Based Hydrogel Crosslinked by Composite Nanoparticles as Rapid Wound-Healing Dressings // Biomacromolecules. 2023. Vol. 24, № 3. P. 1345–1354.

136. Hu J. et al. Thermosensitive PNIPAM-Based Hydrogel Crosslinked by Composite Nanoparticles as Rapid Wound-Healing Dressings //

Biomacromolecules. 2023. Vol. 24, № 3. P. 1345–1354.

137. Peng Y. et al. Construction of programmed time-released multifunctional hydrogel with antibacterial and anti-inflammatory properties for impaired wound healing // J. Nanobiotechnology. 2024. Vol. 22, № 1. P. 126.

138. Peng Y. et al. Construction of programmed time-released multifunctional hydrogel with antibacterial and anti-inflammatory properties for impaired wound healing // J. Nanobiotechnology. 2024. Vol. 22, № 1. P. 126.

139. Gan J. et al. Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin // RSC Adv. 2016. Vol. 6, № 39. P. 32967–32978.

140. Gan J. et al. Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin // RSC Adv. 2016. Vol. 6, № 39. P. 32967–32978.

141. Ren Z. et al. Effective Bone Regeneration Using Thermosensitive Poly(N -Isopropylacrylamide) Grafted Gelatin as Injectable Carrier for Bone Mesenchymal Stem Cells // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. Vol. 7, № 34. P. 19006–19015.

142. Ren Z. et al. Effective Bone Regeneration Using Thermosensitive Poly(N -Isopropylacrylamide) Grafted Gelatin as Injectable Carrier for Bone Mesenchymal Stem Cells // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. Vol. 7, № 34. P. 19006–19015.

143. M. T.R. et al. HYDROGELS THE THREE DIMENSIONAL NETWORKS: A REVIEW // Int. J. Curr. Pharm. Res. 2021. P. 12–17.

144. Kaliaraj G. et al. Hydrogels—A Promising Materials for 3D Printing Technology // Gels. 2023. Vol. 9, № 3. P. 260.

145. Arabpour Z. et al. Exploring Hydrogel Nanoparticle Systems for Enhanced Ocular Drug Delivery // Gels. 2024. Vol. 10, № 9. P. 589.

146. Annala A. et al. Self-Healing Thermosensitive Hydrogel for Sustained Release of Dexamethasone for Ocular Therapy // ACS Polym. Au. 2023. Vol. 3, №

1. P. 118–131.

147. Shaibie N.A. et al. Poly(N -isopropylacrylamide)-Based Polymers: Recent Overview for the Development of Temperature-Responsive Drug Delivery and Biomedical Applications // *Macromol. Chem. Phys.* 2023. Vol. 224, № 20.

148. Ghezzi M. et al. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions // *J. Control. Release.* 2021. Vol. 332. P. 312–336.

149. Gade L. et al. Stimuli-responsive drug delivery systems for inflammatory skin conditions // *Acta Biomater.* 2024. Vol. 187. P. 1–19.

150. Dartora V.F.C. et al. Chitosan hydrogels with MK2 inhibitor peptide-loaded nanoparticles to treat atopic dermatitis // *J. Control. Release.* 2023. Vol. 362. P. 591–605.

151. Dartora V.F.C. et al. Chitosan hydrogels with MK2 inhibitor peptide-loaded nanoparticles to treat atopic dermatitis // *J. Control. Release.* 2023. Vol. 362. P. 591–605.

152. Zhao Q. et al. Shape memory polymer network with thermally distinct elasticity and plasticity // *Sci. Adv.* 2016. Vol. 2, № 1.

153. Li X. et al. Reversible bidirectional bending of hydrogel-based bilayer actuators // *J. Mater. Chem. B.* 2017. Vol. 5, № 15. P. 2804–2812.

154. Qin C. et al. A supramolecular assembly of cross-linked azobenzene/polymers for a high-performance light-driven actuator // *J. Mater. Chem. A.* 2015. Vol. 3, № 32. P. 16453–16460.

155. Si Q. et al. Controllable and Stable Deformation of a Self-Healing Photo-Responsive Supramolecular Assembly for an Optically Actuated Manipulator Arm // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. Vol. 10, № 35. P. 29909–29917.

156. Li S. et al. Polarization-induced alignment of azobenzene/fluorinated polyimide for three-dimensional shape-persistent and photo-responsive elastic helices // *Compos. Sci. Technol.* 2019. Vol. 169. P. 158–166.

157. Razzaq M.Y., Behl M., Lendlein A. Memory-effects of magnetic

nanocomposites // *Nanoscale*. 2012. Vol. 4, № 20. P. 6181.

158. Kumar U.N. et al. Non-contact actuation of triple-shape effect in multiphase polymer network nanocomposites in alternating magnetic field // *J. Mater. Chem.* 2010. Vol. 20, № 17. P. 3404.

159. Wang H.S. et al. High-Performance Electroactive Polymer Actuators Based on Ultrathick Ionic Polymer–Metal Composites with Nanodispersed Metal Electrodes // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 26. P. 21998–22005.

160. van Manen T., Janbaz S., Zadpoor A.A. Programming the shape-shifting of flat soft matter // *Mater. Today*. 2018. Vol. 21, № 2. P. 144–163.

161. Ionov L. Hydrogel-based actuators: possibilities and limitations // *Mater. Today*. 2014. Vol. 17, № 10. P. 494–503.

162. Montero de Espinosa L. et al. Bioinspired Polymer Systems with Stimuli-Responsive Mechanical Properties // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117, № 20. P. 12851–12892.

163. Hu Z., Zhang X., Li Y. Synthesis and Application of Modulated Polymer Gels // *Science* (80-.). 1995. Vol. 269, № 5223. P. 525–527.

164. Kim D., Lee H.S., Yoon J. Highly bendable bilayer-type photo-actuators comprising of reduced graphene oxide dispersed in hydrogels // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 20921.

165. Zheng J. et al. Mimosa inspired bilayer hydrogel actuator functioning in multi-environments // *J. Mater. Chem. C*. 2018. Vol. 6, № 6. P. 1320–1327.

166. Asoh T. et al. Fabrication of Temperature-Responsive Bending Hydrogels with a Nanostructured Gradient // *Adv. Mater.* 2008. Vol. 20, № 11. P. 2080–2083.

167. Tan Y. et al. A Fast, Reversible, and Robust Gradient Nanocomposite Hydrogel Actuator with Water-Promoted Thermal Response // *Macromol. Rapid Commun.* 2018. Vol. 39, № 8.

168. Yang Y. et al. Photothermal Nanocomposite Hydrogel Actuator with Electric-Field-Induced Gradient and Oriented Structure // *ACS Appl. Mater.*

Interfaces. 2018. Vol. 10, № 9. P. 7688–7692.

169. Wu Z.L. et al. Three-dimensional shape transformations of hydrogel sheets induced by small-scale modulation of internal stresses // Nat. Commun. 2013. Vol. 4, № 1. P. 1586.

170. Ma C. et al. A Multiresponsive Anisotropic Hydrogel with Macroscopic 3D Complex Deformations // Adv. Funct. Mater. 2016. Vol. 26, № 47. P. 8670–8676.

171. Zong L. et al. Activation of Actuating Hydrogels with WS₂ Nanosheets for Biomimetic Cellular Structures and Steerable Prompt Deformation // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. Vol. 9, № 37. P. 32280–32289.

172. Peng X. et al. Complex shape deformations of homogeneous poly(N-isopropylacrylamide)/graphene oxide hydrogels programmed by local NIR irradiation // J. Mater. Chem. B. 2017. Vol. 5, № 39. P. 7997–8003.

173. Hauser A.W. et al. Photothermally Reprogrammable Buckling of Nanocomposite Gel Sheets // Angew. Chemie. 2015. Vol. 127, № 18. P. 5524–5527.

174. Hu Z., Zhang X., Li Y. Synthesis and Application of Modulated Polymer Gels // Science (80-.). 1995. Vol. 269, № 5223. P. 525–527.

175. Kim D. et al. Programmable Volume Phase Transition of Hydrogels Achieved by Large Thermal Hysteresis for Static-Motion Bilayer Actuators // Chem. Mater. 2016. Vol. 28, № 23. P. 8807–8814.

176. Shi Q. et al. Photothermal Surface Plasmon Resonance and Interband Transition-Enhanced Nanocomposite Hydrogel Actuators with Hand-Like Dynamic Manipulation // Adv. Opt. Mater. 2017. Vol. 5, № 22.

177. Fusco S. et al. An Integrated Microrobotic Platform for On-Demand, Targeted Therapeutic Interventions // Adv. Mater. 2014. Vol. 26, № 6. P. 952–957.

178. Huang H.-W. et al. Soft micromachines with programmable motility and morphology // Nat. Commun. 2016. Vol. 7, № 1. P. 12263.

179. Breger J.C. et al. Self-Folding Thermo-Magnetically Responsive Soft Microgrippers // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. Vol. 7, № 5. P. 3398–3405.

180. Malachowski K. et al. Stimuli-Responsive Theragrippers for Chemomechanical Controlled Release // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014. Vol. 53, № 31. P. 8045–8049.
181. Stoychev G., Puretskiy N., Ionov L. Self-folding all-polymer thermoresponsive microcapsules // *Soft Matter*. 2011. Vol. 7, № 7. P. 3277.
182. Stoychev G. et al. Hierarchical Multi-Step Folding of Polymer Bilayers // *Adv. Funct. Mater.* 2013. Vol. 23, № 18. P. 2295–2300.
183. Stoychev G. et al. Shape-Programmed Folding of Stimuli-Responsive Polymer Bilayers // *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, № 5. P. 3925–3934.
184. Du X. et al. Photothermally Triggered Shape-Adaptable 3D Flexible Electronics // *Adv. Mater. Technol.* 2017. Vol. 2, № 10.
185. Jiang S. et al. Unusual and Superfast Temperature-Triggered Actuators // *Adv. Mater.* 2015. Vol. 27, № 33. P. 4865–4870.
186. Liu L. et al. Giving Direction to Motion and Surface with Ultra-Fast Speed Using Oriented Hydrogel Fibers // *Adv. Funct. Mater.* 2016. Vol. 26, № 7. P. 1021–1027.
187. Liu L. et al. Giving Direction to Motion and Surface with Ultra-Fast Speed Using Oriented Hydrogel Fibers // *Adv. Funct. Mater.* 2016. Vol. 26, № 7. P. 1021–1027.
188. Ma C. et al. Bioinspired Anisotropic Hydrogel Actuators with On–Off Switchable and Color-Tunable Fluorescence Behaviors // *Adv. Funct. Mater.* 2018. Vol. 28, № 7.
189. Wei S. et al. Bioinspired Synergistic Fluorescence-Color-Switchable Polymeric Hydrogel Actuators // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2019. Vol. 58, № 45. P. 16243–16251.
190. Ma C. et al. Bioinspired Anisotropic Hydrogel Actuators with On–Off Switchable and Color-Tunable Fluorescence Behaviors // *Adv. Funct. Mater.* 2018. Vol. 28, № 7.
191. Wang L. et al. Actuating and memorizing bilayer hydrogels for a self-

deformed shape memory function // Chem. Commun. 2018. Vol. 54, № 10. P. 1229–1232.

192. Chen Z. et al. Graphene oxide/poly (N-isopropylacrylamide) hybrid film-based near-infrared light-driven bilayer actuators with shape memory effect // Sensors Actuators B Chem. 2018. Vol. 255. P. 2971–2978.

193. Zheng W.J. et al. Tough Al-alginate/Poly(N -isopropylacrylamide) Hydrogel with Tunable LCST for Soft Robotics // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. Vol. 7, № 3. P. 1758–1764.

194. Cheng Y. et al. Bilayer hydrogel mixed composites that respond to multiple stimuli for environmental sensing and underwater actuation // J. Mater. Chem. B. 2018. Vol. 6, № 48. P. 8170–8179.

195. Yao C. et al. Poly(N -isopropylacrylamide)-Clay Nanocomposite Hydrogels with Responsive Bending Property as Temperature-Controlled Manipulators // Adv. Funct. Mater. 2015. Vol. 25, № 20. P. 2980–2991.

196. Sydney Gladman A. et al. Biomimetic 4D printing // Nat. Mater. 2016. Vol. 15, № 4. P. 413–418.

197. Arslan H. et al. 3D Printing of Anisotropic Hydrogels with Bioinspired Motion // Adv. Sci. 2019. Vol. 6, № 2.

198. Zhang E. et al. Infrared-driving actuation based on bilayer graphene oxide-poly(N-isopropylacrylamide) nanocomposite hydrogels // J. Mater. Chem. A. 2014. Vol. 2, № 37. P. 15633.

199. Feil H. et al. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers // Macromolecules. 1993. Vol. 26, № 10. P. 2496–2500.

200. Fratzl P., Barth F.G. Biomaterial systems for mechanosensing and actuation // Nature. 2009. Vol. 462, № 7272. P. 442–448.

201. Roche E.T. et al. A Bioinspired Soft Actuated Material // Adv. Mater. 2014. Vol. 26, № 8. P. 1200–1206.

202. Wu B. et al. pH and Thermo Dual-Responsive Fluorescent Hydrogel

Actuator // *Macromol. Rapid Commun.* 2019. Vol. 40, № 4.

203. Liu Y. et al. Programmable responsive shaping behavior induced by visible multi-dimensional gradients of magnetic nanoparticles // *Soft Matter*. 2012. Vol. 8, № 12. P. 3295.

204. Rubinstein M., Colby R.H. *Polymer Physics*. 2003. Vol. 23.

205. Gicquel E. et al. Adsorption versus grafting of poly(N-Isopropylacrylamide) in aqueous conditions on the surface of cellulose nanocrystals // *Carbohydr. Polym.* Elsevier, 2019. Vol. 210, № October 2018. P. 100–109.

206. Kubota K. et al. Characterization of Poly(N-isopropylmethacrylamide) in Water // *Polym. J.* 1990. Vol. 22, № 12. P. 1051–1057.

207. Lang X. et al. Chain terminal group leads to distinct thermoresponsive behaviors of linear PNIPAM and polymer analogs // *Polymer (Guildf)*. 2018. Vol. 145. P. 137–147.

208. Ohnsorg M.L. et al. Tuning PNIPAm self-assembly and thermoresponse: roles of hydrophobic end-groups and hydrophilic comonomer // *Polym. Chem.* 2019. Vol. 10, № 25. P. 3469–3479.

209. Stepanova M., Korzhikova-Vlakh E. Modification of Cellulose Micro- and Nanomaterials to Improve Properties of Aliphatic Polyesters/Cellulose Composites: A Review // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 7. P. 1477.

210. Prince E. et al. Nanocolloidal hydrogel mimics the structure and nonlinear mechanical properties of biological fibrous networks // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2023. Vol. 120, № 51.

211. Rubinstein M., Colby R.H. *Polymer Physics*. Oxford University PressOxford, 2003.

212. Dzhuzha A. et al. Amphiphilic Polypeptides Obtained by Post-Polymerization Modification of Poly-l-Lysine as Systems for Combined Delivery of Paclitaxel and siRNA // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 4. P. 1308.

213. Zhang Y. et al. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles // *AAPS J.* AAPS J, 2010. Vol. 12, № 3. P.

263–271.

214. Reimers G.W., Khalafalla S.E. Preparing magnetic fluids by a peptizing method. US Department of the Interior, 1972. Vol. 59.

215. Sciortino F., Tartaglia P., Zaccarelli E. One-Dimensional Cluster Growth and Branching Gels in Colloidal Systems with Short-Range Depletion Attraction and Screened Electrostatic Repulsion // *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, № 46. P. 21942–21953.

216. Dibble C.J., Kogan M., Solomon M.J. Structure and dynamics of colloidal depletion gels: Coincidence of transitions and heterogeneity // *Phys. Rev. E*. 2006. Vol. 74, № 4. P. 041403.

217. Kokufuta E. et al. Geometrical Characteristics of Polyelectrolyte Nanogel Particles and Their Polyelectrolyte Complexes Studied by Dynamic and Static Light Scattering // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, № 29. P. 8634–8640.

218. Tizazu G. Investigation of the Effect of Molecular Weight, Density, and Initiator Structure Size on the Repulsive Force between a PNIPAM Polymer Brush and Protein // *Adv. Polym. Technol.* / ed. Verge P. 2022. Vol. 2022. P. 1–20.

219. Zeng M., Zhang Y. Colloidal nanoparticle inks for printing functional devices: emerging trends and future prospects // *J. Mater. Chem. A*. 2019. Vol. 7, № 41. P. 23301–23336.

220. Morozova S.M. et al. Multicolored Nanocolloidal Hydrogel Inks // *Adv. Funct. Mater.* 2021. Vol. 2105470. P. 1–8.

221. Chau M. et al. Ion-Mediated Gelation of Aqueous Suspensions of Cellulose Nanocrystals // *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16, № 8. P. 2455–2462.

222. Prince E. et al. Nanofibrillar Hydrogel Recapitulates Changes Occurring in the Fibrotic Extracellular Matrix // *Biomacromolecules*. 2021. Vol. 22, № 6. P. 2352–2362.

223. Kojima H. Studies on the phase transition of hydrogels and aqueous solutions of thermosensitive polymers // *Polym. J.* 2018. Vol. 50, № 6. P. 411–418.

224. Halperin A., Kröger M., Winnik F.M. Poly(N -isopropylacrylamide)

Phase Diagrams: Fifty Years of Research // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2015. Vol. 54, № 51. P. 15342–15367.

225. Trongsatitkul T., Budhlall B.M. Microgels or microcapsules? Role of morphology on the release kinetics of thermoresponsive PNIPAm-co-PEGMa hydrogels // *Polym. Chem.* 2013. Vol. 4, № 5. P. 1502–1516.

226. Francis R. et al. Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide) copolymer containing anhydride and imide comonomers – A theoretical study on reversal of LCST // *Polymer (Guildf)*. 2007. Vol. 48, № 22. P. 6707–6718.

227. Qi W. et al. Effect of pH on the aggregation behavior of cellulose nanocrystals in aqueous medium // *Mater. Res. Express*. 2019. Vol. 6, № 12. P. 125078.

228. Anikushin B.M. et al. Zeta Potential of Nanosized Particles of Cellulose as a Function of pH // *Chem. Technol. Fuels Oils*. 2022. Vol. 57, № 6. P. 913–916.

229. da Fonsêca J.H.L., D'Ávila M.A. Rheological behavior of carboxymethylcellulose and cellulose nanocrystal aqueous dispersions // *Rheol. Acta*. Springer Berlin Heidelberg, 2021. Vol. 60, № 9. P. 497–509.

230. Smellie R.H., La Mer V.K. Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes // *J. Colloid Sci.* 1958. Vol. 13, № 6. P. 589–599.

231. Belyaeva A.A. et al. Fibrillar biocompatible colloidal gels based on cellulose nanocrystals and poly(N-isopropylacrylamide) for direct ink writing // *J. Colloid Interface Sci.* 2023. Vol. 635. P. 348–357.

232. Gauthier-Jaques M. et al. Synthesis and Application of Reactive Polymers via <sc>RAFT</sc> Polymerization // *RAFT Polymerization*. Wiley, 2021. P. 829–871.

233. Lowe A.B., McCormick C.L. Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media // *Prog. Polym. Sci.* 2007. Vol. 32, № 3. P. 283–351.

234. Roberts M.G. et al. Functionalization of Cellulose Nanocrystals with

POEGMA Copolymers via Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition for Potential Drug-Delivery Applications // *Biomacromolecules*. 2020. Vol. 21, № 6. P. 2014–2023.

235. Khabibullin A. et al. Injectable Shear-Thinning Fluorescent Hydrogel Formed by Cellulose Nanocrystals and Graphene Quantum Dots // *Langmuir*. 2017. Vol. 33, № 43. P. 12344–12350.

236. Belyaeva A.A. et al. Fibrillar biocompatible colloidal gels based on cellulose nanocrystals and poly(N-isopropylacrylamide) for direct ink writing // *J. Colloid Interface Sci.* 2023. Vol. 635. P. 348–357.

237. Zoppe J.O. et al. Surface Interaction Forces of Cellulose Nanocrystals Grafted with Thermoresponsive Polymer Brushes // *Biomacromolecules*. 2011. Vol. 12, № 7. P. 2788–2796.

238. Thérien-Aubin H. et al. Temperature-Responsive Nanofibrillar Hydrogels for Cell Encapsulation // *Biomacromolecules*. 2016. Vol. 17, № 10. P. 3244–3251.

239. Lee Y.R. et al. Smart Cellulose Nanofluids Produced by Tunable Hydrophobic Association of Polymer-Grafted Cellulose Nanocrystals // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 36. P. 31095–31101.

240. Canovic E.P. et al. Characterizing Multiscale Mechanical Properties of Brain Tissue Using Atomic Force Microscopy, Impact Indentation, and Rheometry // *J. Vis. Exp.* 2016. № 115.

241. FLIEGER R., GREBE R. Cell-elastometry: a new method to measure erythrocyte membrane elasticity // *Biorheology*. 1997. Vol. 34, № 3. P. 223–234.

242. Boudjema F., Khelidj B., Lounis M. Dynamical properties of the brain tissue under oscillatory shear stresses at large strain range // *J. Phys. Conf. Ser.* 2017. Vol. 790. P. 012002.

243. Capella V. et al. Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-N-isopropylacrylamide hydrogel // *Heliyon*. 2019. Vol. 5, № 4. P. e01474.

244. Mahmoud K.A. et al. Effect of Surface Charge on the Cellular Uptake

and Cytotoxicity of Fluorescent Labeled Cellulose Nanocrystals // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2010. Vol. 2, № 10. P. 2924–2932.

245. Podgórski R., Wojasiński M., Ciach T. Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays // Sci. Rep. 2022. Vol. 12, № 1. P. 9047.

246. Effendi W.I. et al. Synergistic interaction of gemcitabine and paclitaxel by modulating acetylation and polymerization of tubulin in non-small cell lung cancer cell lines // Cancer Manag. Res. 2019. Vol. 11. P. 3669–3679.

247. Ayalew L. et al. Conjugation of Paclitaxel to Hybrid Peptide Carrier and Biological Evaluation in Jurkat and A549 Cancer Cell Lines // ACS Med. Chem. Lett. 2017. Vol. 8, № 8. P. 814–819.

248. Zhu Z. et al. Modulation of alternative splicing induced by paclitaxel in human lung cancer // Cell Death Dis. 2018. Vol. 9, № 5. P. 491.

249. Zhang D., Wang. Folate-mediated targeted and intracellular delivery of paclitaxel using a novel deoxycholic acid-O-carboxymethylated chitosan-folic acid micelles // Int. J. Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 325–337.

250. Borghese C. et al. Adipose-Derived Stem Cells Primed with Paclitaxel Inhibit Ovarian Cancer Spheroid Growth and Overcome Paclitaxel Resistance // Pharmaceutics. 2020. Vol. 12, № 5. P. 401.

251. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Anal. Biochem. 1968. Vol. 25. P. 192–205.

252. Bilston L.E., Liu Z., Phan-Thien N. Linear Viscoelastic Properties of Bovine Brain Tissue in Shear // Biorheology. 1997. Vol. 34, № 6. P. 377–385.

253. Sridharan A., Muthuswamy J. Quantitative Assessment of the Mechanical Properties of the Neural Interface // Handbook of Neuroengineering. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. P. 213–259.

254. Belyaeva A.A. et al. Thermosensitive injectable fibrillar gels based on cellulose nanocrystals grafted with poly(N-isopropylacrylamide) as biocompatible brain implants // Carbohydr. Polym. 2024. Vol. 346. P. 122596.

255. Urošević M. et al. Hydrogels based on N-isopropylmethacrylamide and N-isopropylacrylamide // *Adv. Technol.* 2018. Vol. 7, № 1. P. 79–91.
256. Chen D., Pei Q. Electronic Muscles and Skins: A Review of Soft Sensors and Actuators // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117, № 17. P. 11239–11268.
257. Belyaeva A.A., Eksakusto P.O., Morozova S.M. Thermally and magnetically responsive single layer bioinspired soft actuator with patterned structure obtained by direct ink writing // *Mater. Today Commun.* 2024. Vol. 39. P. 108879.