



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109751** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/483 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 10540	(72) Винахідник(и):	Шканд Тетяна Віталіївна (UA), Чиж Микола Олексійович (UA), Слета Ірина Вадимівна (UA), Татарець Анатолій Леонідович (UA), Рошаль Олександр Давидович (UA), Паценкер Леонід Давідович (UA), Сандомирський Борис Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки:	26.09.2014	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.09.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Флуоресцентная диагностика биологических тканей від 11.01.2007 (Інтернет-публікація) ULR: http://www.osu.ru/doc/1536 (знайдено 27.04.2015) Летута С.Н. Оптическая диагностика клеток биологических тканей в процессе их культивирования в полимерных средах / С.Н. Летута, В.С. Маряхина, Р.Р. Рахматуллин // Квантовая электроника. – 2011. - Т. 41. - №4. - С. 314-317 Дыкман Л.А. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы / Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов // Acta naturae. – 2011. – Т.3. - № 2(9) С. 36-58 RU 2008120679 A, 10.12.2009 US 20070111273 A1, 17.05.2007
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.04.2015, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2015, Бюл.№ 18		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГІДРОГЕЛЮ В БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИНАХ

(57) Реферат:

Спосіб визначення гідрогелю в біологічних тканинах належить до медицини та біології і може бути використаний для люмінесцентного визначення областей локалізації та реологічного стану гідрогельних біоструктурних матеріалів, у тому числі хірургічних імплантатів, а також оцінки ефективності доставки лікарських препаратів гідрогельними носіями. Спосіб передбачає визначення гідрогелю в біологічних тканинах шляхом збудження та реєстрації люмінесценції від люмінесцентного барвника, ковалентно зв'язаного з гідрогелем, який відрізняється тим, що використовують люмінесцентний барвник, чутливий до в'язкості гідрогелю або використовують

UA 109751 C2

люмінесцентний барвник, нечутливий до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища, або спосіб передбачає одночасне використання не менше двох люмінесцентних барвників, щонайменше один з яких є чутливим до в'язкості гідрогелю, а інший є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища, причому як люмінесцентний барвник, чутливий до в'язкості гідрогелю, використовують барвник Seta-460. Зазначені барвники збуджуються та/або випромінюють світло на різних довжинах хвиль та/або мають різні часи життя люмінесценції.

Винахід належить до медицини та біології і може бути використаний для люмінесцентного визначення областей локалізації та реологічного стану (механічної тривкості, щільності або в'язкості) гідрогельних біоструктурних матеріалів, у тому числі хірургічних імплантатів, а також ефективності доставки лікарських препаратів на гідрогельних носіях.

Гідрогелі використовують в медицині як хірургічні імплантати [1], у тому числі для запобігання розвитку аневризми серця в постінфарктний період [2], як наповнювачі для усунення дефектів кісткової тканини [3] та як альгінатні пов'язки для тампонування глибоких інфікованих ран [4]. Гідрогелі використовують також у клінічній фармакології як транспортні системи для адресної доставки лікарських препаратів [5], а також в багатьох інших медичних, ветеринарних та біологічних застосуваннях [6]. При цих застосуваннях вкрай необхідною задачею є візуалізація гідрогелю, визначення областей локалізації гідрогелю та/або продуктів його біодеградації (розпаду в біологічних тканинах), моніторингу деградації гідрогельних імплантатів у реальному часі, а також встановлення реологічних властивостей гідрогелів.

Існує спосіб неінвазивного *in vivo* визначення та моніторингу біодеградуемого желатинового гідрогелю, в якому використовують люмінесценцію мезобромованих пентаметинціанінових барвників [7]. Але ці барвники не мають реакційних груп, за допомогою яких їх можна ковалентно зв'язати з молекулами гідрогелю. Вони утримуються у желатині лише завдяки слабкій гідрофобній взаємодії. В результаті цього барвники легко мігрують з желатину, що заважає визначенню гідрогелю, бо ці барвники мають однаковий колір (спектр) та інтенсивність люмінесценції як в желатині, так і у вільному стані поза желатинової фази. Крім того, ці барвники у вільному (незв'язаному з желатином) стані накопичуються у печінці, лімфатичних вузлах, слинних залозах та багатьох шляхах гепатобіліарної екскреції, що є негативним явищем.

Цю проблему вирішено у способі неінвазивного *in vivo* визначення ПЕГ-декстранового гідрогелю та колагену за допомогою ковалентного прив'язування люмінесцентних барвників Texas Red та флуоресцеїну [8], неінвазивного визначення хітозанових (амінополісахаридних) мембран, ковалентно мічених ізотіоціанатом тетраметилпродаміну (TRITC) [9], колагену, ковалентно міченого ціаніновим барвником ZW800-1 [10], а також альгінатного гідрогелю, ковалентно міченого ізотіоціанатом флуоресцеїну (FITC) [11, 12] та ізотіоціанатом родаміну В (RITC) [12]. Ковалентне зв'язування допомагає запобігти відриву молекул барвника від молекул гідрогелю, однак недолік цих способів полягає у тому, що застосовані барвники є не чутливими до середовища, тобто їх спектральні характеристики, такі як довжина хвилі та інтенсивність люмінесценції, не змінюються при зміні таких властивостей середовища як в'язкість, полярність та гідрофільність. Тому за цим способом неможливо відрізнити люмінесценцію барвника, зв'язаного з недеградованим щільним гідрогелем, що має високу в'язкість, від люмінесценції продуктів деградації гідрогелю, до яких також прив'язано барвник, що мають знижену щільність та в'язкість. Тобто за цим способом неможливо визначити реологічний стан гідрогелю.

За прототип взято спосіб визначення гідрогельного біодеградуемого імплантату на основі ПЕГильованого фібрінотену (PEGylated fibrinogen, PF), до якого ковалентно прив'язано люмінесцентний ціаніновий барвник Cy5,5 у вигляді реакційного NHS естеру Cy5,5-NHS [1, С. 452-453]. Гідрогель імплантують у вигляді циліндричних пробок розміром 5 мм або сферичних мікро-кульок (200×500 мкм), або гідрогельних попередників (хімічних сполук, з яких утворюється гідрогель шляхом загушення або полімеризації), які вводять та полімеризують *in situ*, тобто безпосередньо у місці введення. Люмінесцентний барвник Cy5,5 забезпечує люмінесцентний сигнал для *in vivo* визначення та кількісної оцінки ресорбції (розсмоктування) гідрогелю та продуктів його деструкції.

Люмінесцентний барвник Cy5,5 є не чутливим до середовища, тому за цим способом визначають загалом область локалізації наступних компонентів (Фіг. 1):

1) щільного гідрогелю з прив'язаним барвником (PEGylated fibrinogen, PF);

2) продуктів деградації гідрогелю, до яких ковалентно прив'язано люмінесцентний барвник (Cy5,5);

3) вільного барвника (Cy5,5), що відщепився від гідрогелю в процесі його деградації.

Через нечутливість барвника до середовища всі ці перелічені компоненти мають однаковий спектр (колір) та інтенсивність люмінесценції, і тому їх неможливо відрізнити (диференціювати) один від іншого. Таким чином, недоліком цього способу є неможливість визначення реологічного стану гідрогелю, тобто неможливість відрізнити люмінесценцію щільного гідрогелю (наприклад, гідрогельного імплантату) від люмінесценції продуктів його деградації, а також неможливість визначити область локалізації щільного гідрогелю. Крім того, люмінесценція вільного барвника, що відщепився від щільного гідрогелю в процесі деградації, заважає визначенню дійсної області локалізації як щільного, так і деградованого гідрогелю.

На теперішній час не відомо будь-яких способів, які б дозволяли відрізнати гідрогель з високою щільністю від продуктів його деградації, що мають меншу щільність, тобто ідентифікувати реологічний стан гідрогелю.

Задачею винаходу є забезпечення можливості визначення областей локалізації щільного гідрогелю; областей локалізації щільного гідрогелю разом з продуктами його деградації; областей локалізації продуктів деградації гідрогелю; областей локалізації щільного гідрогелю і продуктів його деградації з можливістю їх диференціації.

Ця задача вирішується тим, що у відомому способі визначення гідрогелю, який передбачає використання ковалентно прив'язаного люмінесцентного барвника, згідно з винаходом використовують люмінесцентний барвник, який є чутливим до в'язкості гідрогелю, або люмінесцентний барвник, який є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища, у тому числі до реологічного стану гідрогелю, або одночасно використовують не менше двох люмінесцентних барвників, щонайменше один з яких є чутливим до в'язкості гідрогелю, а інший - не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища. При цьому якщо ці барвники мають різні спектральні характеристики, такі як різні довжини хвиль збудження люмінесценції, або різні довжини хвиль смуг випромінювання, або різні часи життя люмінесценції, виникає можливість розрізнати люмінесцентний сигнал від цих барвників і, відповідно, розрізнати області локалізації щільного гідрогелю та деградованого гідрогелю зі зниженою в'язкістю.

В жодному з відомих джерел інформації не пропонується використовувати чутливість спектральних характеристик люмінесцентного барвника до в'язкості середовища та варіювання цих властивостей для диференціації щільного гідрогелю та продуктів його деградації з метою одержання надзвичайно важливої інформації про області локалізації гідрогелю з різним реологічним станом. Вперше це зроблено у способі, що заявляється.

Позитивний ефект способу, що заявляється, полягає у тому, що на відміну від прототипу він дозволяє вирішувати наступні проблеми:

- 1) визначати області локалізації щільного гідрогелю (Приклад 1);
- 2) визначати області локалізації щільного гідрогелю разом з продуктами його деградації (Приклад 2);
- 3) визначати області локалізації продуктів деградації гідрогелю (Приклад 3);
- 4) визначати реологічний стан гідрогелю та диференціювати області локалізації щільного гідрогелю, що мають високу в'язкість, та продуктів його деградації, що мають меншу в'язкість (Приклад 3).

Вирішення цих проблем забезпечує можливість моніторингу у статичі та динаміці стану та рівня деградації гідрогельних біоструктурних матеріалів, у тому числі хірургічних імплантатів у загальній та реконструктивній хірургії, а також можливість дослідження транспорту та адресної доставки лікарських препаратів у реальному часі.

Запропонований спосіб є придатним для визначення таких гідрогелів як колаген, желатин, альгінатний, хітозановий, ПЕГильований, ПЕГ-декстрановий, амінополісахаридний, карбоксиметилцелюлозний, акриловий та полі(вінілпірролідонний) гідрогель, але не обмежується цими гідрогелями (Приклади 1, 28 і 29). Для реалізації цього способу гідрогель повинен бути хімічно зв'язаним з одним або кількома люмінесцентними барвниками. Такий люмінесцентно мічений гідрогель може бути отриманий прив'язуванням барвника до вже існуючого гідрогелю, який далі вводять у біологічні тканини шляхом імплантації (Приклад 15), або прив'язуванням барвника до попередника гідрогелю (Приклади 4-13), який далі загущують або полімеризують до стану гідрогелю. Загущення може бути проведено як поза біологічної тканини (Приклад 14) з наступною імплантацією (Приклад 15), так і безпосередньо у біологічних тканинах, як описано на прикладі альгінатного гідрогелю (Приклади 16-18).

Запропонований спосіб передбачає ретельний вибір люмінесцентних барвників для кожного гідрогелю у залежності від його характеристик та конкретної задачі, наприклад, необхідності визначення області локалізації щільного гідрогельного біоструктурного матеріалу, або продуктів його деградації, або дослідження ефективності транспорту лікарських препаратів. Так, наприклад, наші дослідження показали, що люмінесцентний скварайновий барвник Seta-460 може бути успішно застосований для визначення областей локалізації щільного альгінатного гідрогелю та дослідження зміни його в'язкості у часі (Приклади 21, 25 і 26). У той же час люмінесцентний нафталевий барвник TG-404, не може бути використаним для вирішення цієї задачі, якщо гідрогель є альгінатним, бо альгінат люмінесцентно мічений цим барвником, не вдається перевести в стан гелю. Але цей барвник є придатним для визначення області локалізації незагущеного альгінату у біологічних тканинах (Приклад 22). Ціаніновий барвник Cy5 та флуоресцеїновий барвник FITC можуть використовуватися для визначення щільного

гідрогелю разом з продуктами його деградації, наприклад, при дослідженні процесів розсмоктування гідрогельних імплантатів (Приклади 23-25). Але сквараїновий барвник Seta-670 не може застосовуватися для визначення гідрогелю, бо при ковалентному зв'язуванні з ним його люмінесценція гаситься (Приклад 9). Сквараїн-ротаксановий барвник SeTau-647 є

5

придатним для довготривалого моніторингу локалізації гідрогелю та продуктів його розпаду (Приклад 26).
Відомо, що синє, зелене та жовте світло, що відповідає довжинам хвиль менше ніж приблизно 600 нм, інтенсивно поглинається біологічними тканинами і тому може використовуватися для одержання люмінесцентного сигналу лише з поверхні таких тканин або з

10

глибин, що не перевищують приблизно 1 міліметр. Для одержання люмінесцентного сигналу крізь тканини на відстані від кількох міліметрів до кількох сантиметрів використовують довгохвильові барвники, які поглинають та/або випромінюють світло у червоній та ближній інфрачервоній області спектру приблизно від 600 нм до 900 нм. Тому саме довгохвильові барвники є найпридатнішими для досягнення мети цього винаходу, що ілюструють Приклади

15

19, 20 і 26.

Для одночасного визначення областей локалізації гідрогелю з різним реологічним станом (щільний чи деградований) пропонується використовувати одночасно не менше двох люмінесцентних барвників, щонайменше один з яких є чутливим до в'язкості гідрогелю, а інший - не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища. Таку можливість продемонстровано у Прикладах 25 і 26 з використанням чутливого до в'язкості гідрогелю барвника Seta-460 та не чутливих до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища барвників Cy5 та SeTau-647. Ці барвники мають різні довжини хвиль збудження люмінесценції та різні положення смуг люмінесценції. Це дозволяє розрізняти люмінесцентний сигнал від них і, відповідно, диференціювати області локалізації щільного гідрогелю та продуктів його

20

25

деградації. Можливість моніторингу у реальному часі дифузії низькомолекулярних органічних сполук, у тому числі лікарських препаратів, за допомогою трьох барвників (Seta-460, Seta-555 та SeTau-647) продемонстровано у Прикладі 27.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Визначення в біологічних тканинах щільного гідрогелю з застосуванням люмінесцентного барвника, що є чутливим до в'язкості гідрогелю.

30

Люмінесцентний барвник, який є чутливим до в'язкості гідрогелю, за допомогою хімічних реакцій ковалентно прив'язують до колагену, або желатину, або альгінатного, ПЕГильованого фібриногенного, ПЕГ-декстранового або амінополісахоридного гідрогелю, або гідрогелю іншого типу або гідрогельного попередника. Одержаний таким чином люмінесцентно мічений гідрогель вводять у біологічну тканину шляхом імплантації, або люмінесцентно мічений попередник загушують або полімеризують до стану гідрогелю *in situ*.

35

Через необхідні проміжки часу, зазвичай від декількох хвилин до декількох діб, біологічну тканину, до якої введено люмінесцентно мічений гідрогель, опромінюють світлом певної довжини хвилі, що призводить до люмінесценції барвника. Цю люмінесценцію визначають візуально без застосування будь-яких приладів або реєструють за допомогою фотокамери, або люмінесцентного мікроскопу, або спектрофлуориметру, або будь-якого іншого приладу, здатного реєструвати або вимірювати люмінесценцію.

40

Визначають області люмінесценції та/або колір (довжину хвилі) люмінесценції та/або час життя люмінесценції, та на основі цієї інформації роблять висновок щодо областей локалізації щільного та/або деградованого гідрогелю. Наявність та інтенсивність люмінесцентного сигналу свідчить про наявність та концентрацію в дослідному зразку щільного гідрогелю з високою в'язкістю (Фіг. 2). Область люмінесценції відповідає області локалізації щільного гідрогелю.

45

Приклад 2. Визначення в біологічних тканинах щільного гідрогелю разом з продуктами його деградації з застосуванням люмінесцентного барвника, що є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища.

50

Люмінесцентний барвник, який є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища, за допомогою хімічних реакцій ковалентно прив'язують до гідрогелю або його попередника. Одержаний таким чином люмінесцентно мічений гідрогель вводять у біологічну тканину, вимірюють люмінесценцію, як описано у Прикладі 1 та роблять висновок щодо загальної області локалізації щільного та/або деградованого гідрогелю. Наявність та інтенсивність люмінесцентного сигналу свідчать про наявність та концентрацію в дослідному зразку щільного гідрогелю з високою в'язкістю та/або продуктів його деградації з низькою в'язкістю (Фіг. 3). Область люмінесценції відповідає області локалізації щільного гідрогелю разом з продуктами його деградації.

55

Приклад 3. Визначення та диференціація в біологічних тканинах щільного гідрогелю та продуктів його деградації з застосуванням не менш ніж двох люмінесцентних барвників, щонайменше один з яких є чутливим до в'язкості гідрогелю, а інший є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища.

До гідрогелю або його попередника за допомогою хімічних реакцій ковалентно прив'язують люмінесцентні барвники, щонайменше один з яких є чутливим до в'язкості гідрогелю, а інший є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища. Одержаний таким чином люмінесцентно мічений гідрогель вводять у біологічну тканину та вимірюють люмінесценцію, як описано у Прикладі 1.

Визначають області люмінесценції та/або колір (довжину хвилі) люмінесценції та/або час життя люмінесценції барвника, який є чутливим до в'язкості гідрогелю та на основі цієї інформації роблять висновок щодо області локалізації щільного гідрогелю. Наявність та інтенсивність люмінесцентного сигналу свідчить про наявність та концентрацію в дослідному зразку щільного гідрогелю. Область люмінесценції відповідає області локалізації щільного гідрогелю.

Визначають область люмінесценції та/або колір (довжину хвилі) люмінесценції та/або час життя люмінесценції барвника, який є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища та на основі цієї інформації роблять висновок щодо області локалізації щільного та/або деградованого гідрогелю. Наявність та інтенсивність люмінесцентного сигналу свідчить про наявність та концентрацію в дослідному зразку щільного гідрогелю та/або продуктів його деградації (Фіг. 4). Область люмінесценції відповідає області локалізації як щільного гідрогелю, так і продуктів його деградації.

Математичне віднімання від області люмінесценції "нечутливого" барвника області люмінесценції "чутливого" барвника дає інформацію про область локалізації деградованого гідрогелю.

Приклад 4. Отримання аміно-модифікованого альгілату натрію.

2,0 г альгілату натрію (Sigma-Aldrich, Германия) розчиняли в 200 мл 50 мМ MES буфера, pH 6,1. MES буфер готували розчиненням 9,8 г 4-морфолінетансульфоїкислоти в 1 л води та доведенням його кислотності до необхідного pH додаванням концентрованого розчину гідроксиду натрію. При постійному перемішуванні до розчину альгілату послідовно додавали 930 мг гідрохлориду N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодііміду (EDC) та 310 мг N-гідроксисукциніміду (NHS). Через 30 хвилин до реакційної суміші додавали 2 г 1,6-діаміногексану та перемішували протягом 12 годин. Для видалення залишків 1,6-діаміногексану, аміномодифікований альгілат натрію осаджували ізопропанолом, відфільтровували та промивали ізопропанолом. Вихід: 2,03 г.

Приклад 5. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з люмінесцентним сквараїновим барвником Seta-460.

500 мг аміномодифікованого альгілату натрію, одержаного за Прикладом 4, розчиняли в 55 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з pH 9,0, додавали розчин 7 мг барвника Seta-460-NHS (NHS естер) фірми SETA BioMedicals в 1 мл N,N-диметилформаміду (ДМФА) та перемішували впродовж 12 годин. Після цього мічений барвником альгілат висаджували ізопропанолом, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 450 мг. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 470 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 519 нм.

Приклад 6. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з флуоресцеїном.

350 мг аміномодифікованого альгілату натрію, одержаного за Прикладом 4, розчиняли в 45 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з pH 9,0, додавали розчин 5,1 мг ізотіоціаната флуоресцеїну (FITC) в 1 мл ДМФА та перемішували впродовж 2 годин. Після цього мічений барвником альгілат висаджували ізопропанолом, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 195 мг. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 492 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 513 нм.

Приклад 7. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з нафталевим барвником TG-404.

250 мг аміномодифікованого альгілату натрію, одержаного за Прикладом 4, розчиняли в 33 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з pH 9,0, додавали розчин 5,1 мг барвника TG-404-NHS (NHS естер) фірми SETA BioMedicals в 1,5 мл ДМФА та перемішували впродовж 2 годин. Після цього мічений барвником альгілат висаджували ізопропанолом, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 248 мг. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 395 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 519 нм.

Приклад 8. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з ціаніновим барвником Cy5.

525 мг аміномодифікованного альгілату натрію, одержаного за Прикладом 4, розчиняли в 70 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з рН 9,0, додавали розчин 9,0 мг ціанінового барвника Cy5 (NHS естер) фірми General Electric Healthcare в 1 мл дистильованої води та перемішували впродовж 2 годин. Після цього мічений барвником альгілат висаджували 170 мл ізопропанолу, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 521 мг. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 647 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 666 нм.

Приклад 9. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного зі сквараїновим барвником Seta-670.

375 мг аміномодифікованного альгілату натрію, одержаного за Прикладом 4, розчиняли в 50 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з рН 9,0, додавали розчин 8,9 мг сквараїнового барвника Seta-670-NHS (NHS естер) фірми SETA BioMedicals в 1 мл дистильованої води та перемішували впродовж 2 годин. Після цього мічений барвником альгілат висаджували ізопропанолом, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 345 мг.

Виміряні у воді спектри поглинання барвника Seta-670 та альгілату натрію, міченого цим барвником (Seta-670 - Альгілат натрію), наведено на Фіг. 5. Максимум смуги поглинання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з барвником Seta-670-NHS у водному розчині - 666 нм, а максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 687 нм. Але ця люмінесценція на стільки слабка, що її дуже важко зареєструвати та неможливо використовувати для визначення альгілату та альгілатного імплантату.

Приклад 10. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з діарилазоліним барвником K4-215.

375 мг аміномодифікованного альгілату натрію, одержаного за Прикладом 4, розчиняли в 50 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з рН 9,0, додавали розчин 5,0 мг барвника K4-215-NHS (NHS естер) фірми SETA BioMedicals в 1,5 мл ДМФА та перемішували впродовж 2 годин. Після цього мічений барвником альгілат висаджували ізопропанолом, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 322 мг. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 397 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 576 нм.

Приклад 11. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного одночасно з двома барвниками - сквараїновим барвником Seta-460 та ціаніновим барвником Cy5 у співвідношенні 1:2,4.

До розчину 270 мг аміномодифікованного альгілату натрію (одержаного за Прикладом 4) в 15 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з рН 9,0 додавали розчин 3,0 мг сквараїнового барвника Seta-460-NHS і 10,0 мг ціанінового барвника Cy5-NHS (NHS естер) в 1 мл ДМФА. Одержаний розчин перемішували 2 години при кімнатній температурі, після чого мічений барвниками альгілат висаджували 50 мл ізопропанолу, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 215 мг.

Вимірний у воді спектр поглинання люмінесцентно міченого альгілату та його спектр люмінесценції при збудженні на довжинах хвиль 470 нм та 630 нм наведено на Фіг. 6. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 469 нм та 647 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 518 нм та 667 нм (довжина хвилі збудження 450 нм). Отримане мольне співвідношення барвників Seta-460: Cy5, ковалентно зв'язаних з альгілатом, складає 1:2,4.

Приклад 12. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного одночасно з двома барвниками - сквараїновим барвником Seta-460 та ціаніновим барвником Cy5 у співвідношенні 1:1.

До розчину 270 мг аміномодифікованного альгілату натрію (одержаного за Прикладом 4) в 15 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з рН 9,0 додавали розчин 6,0 мг сквараїнового барвника Seta-460-NHS і 5,0 мг ціанінового барвника Cy5-NHS (NHS естер) в 1 мл ДМФА. Одержаний розчин перемішували 2 години при кімнатній температурі, після чого мічений барвниками альгілат висаджували 50 мл ізопропанолу, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 208 мг.

Вимірний у воді спектр поглинання люмінесцентно міченого альгілату та спектр люмінесценції при збудженні на довжинах хвиль 470 нм та 630 нм наведено на Фіг. 7. Максимум смуги поглинання у водному розчині - 469 нм та 647 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 518 нм та 667 нм (довжина хвилі збудження 450 нм). Отримане мольне співвідношення барвників Seta-460: Cy5, ковалентно зв'язаних з альгілатом, складає 1:1.

Приклад 13. Отримання альгілату натрію, ковалентно зв'язаного одночасно з двома барвниками - сквараїновим барвником Seta-460 та сквараїн-ротаксановим барвником SeTau-647 у співвідношенні 1,1:1,0.

До розчину 250 мг аміномодифікованого альгілату натрію (одержаного за Прикладом 4) в 15 мл 50 мМ бікарбонатного буфера з pH 9,0 додавали розчин 6,0 мг сквараїнового барвника Seta-460-NHS і 10,5 мг сквараїн-ротаксанового барвника SeTau-647-NHS (NHS естер) фірми SETA BioMedicals в 2 мл ДМФА. Одержаний розчин перемішували 2 години при кімнатній температурі, після чого мічений барвниками альгілат висаджували 50 мл ізопропанолу, відфільтровували та промивали на фільтрі ізопропанолом. Вихід: 210 мг.

Максимум смуги поглинання у водному розчині - 469 нм та 649 нм, максимум смуги люмінесценції у водному розчині - 518 нм та 695 нм (довжина хвилі збудження 450 нм). Отримане мольне співвідношення барвників Seta-460: Cy5, ковалентно зв'язаних з альгілатом, складає 1,1:1,0.

Приклад 14. Отримання люмінесцентно міченого альгілатного імплантату для хірургічної трансплантації.

Для виготовлення 10 г гелю з масовою часткою альгілату 10 % беруть 9 мл ізотонічного розчину хлориду натрію та 1 г люмінесцентно міченого альгілату натрію. Суміш перемішують механічною мішалкою для пришвидшення процесу набухання полімеру та наступного гелеутворення. Після отримання гомогенного гелю, його тримають в ультразвуковій бані (40 кГц) протягом кількох годин при температурі 40-50 °C для виділення пухирів повітря та остаточної гомогенізації суміші. Швидкість гелеутворення та тривалість ультразвукової обробки гелю залежать від кількості альгілату. Зі зростанням вмісту альгілату в гелі час обробки підвищують. Гель переносять у металічну, скляну або полімерну ємність, що має форму майбутнього імпланту, та залишають на 1 добу для остаточного структурування. Отриманий люмінесцентно мічений імплантат зберігають при температурі 3-5 °C. Перед використанням імплантату його стерилізують протягом 20 хвилин при температурі 110-115 °C у скляній формі в паровому стерилізаторі.

Приклад 15. Введення люмінесцентно міченого альгілатного імплантату методом хірургічної трансплантації в стегнові м'язи щурів.

Для експериментів на щурах використовують одержані за Прикладом 14 люмінесцентно мічені альгілатні імплантати, які мають вигляд циліндричних таблеток діаметром 0,5 см і висотою 0,25 см. Дослідну тварину (m. gluteus щур-самець лінії Вістар) під наркозом фіксують на операційному столі. Після попередньої обробки операційного поля (бритья шерсті, обробка антисептиком) проводять надріз шкіри в області зовнішньої поверхні стегна і розширення операційної рани за допомогою стискачів. Проводять розтин м'язової тканини до 0,5-1,0 см і занурюють імплантат з подальшим пошаровим ушиванням стегового м'язу та шкіри.

Приклад 16. Введення люмінесцентно міченого альгілатного імплантату методом ін'єкції in situ.

Альгілат натрію, ковалентно зв'язаний з люмінесцентним барвником, розчиняють у фізіологічному розчині до концентрації 0,5-1 %. У шприц набирають послідовно, як правило, 0,03-0,05 мл 10 %-ного розчину глюконату кальцію та 0,03-0,05 мл одержаного розчину люмінесцентно міченого альгілату натрію. За допомогою ін'єкційної голки весь розчин у шприці заколюють на необхідну глибину у дослідну біологічну тканину. Взаємодія розчину люмінесцентно міченого альгілату натрію з розчином глюконату кальцію приводить до утворення альгілатного імплантату у біологічній тканині.

Приклад 17. Введення люмінесцентно міченого альгілатного імплантату методом ін'єкції в стегнові м'язи щурів.

Дослідну тварину під наркозом фіксують на операційному столі. Після попередньої обробки операційного поля (бритья шерсті, обробка антисептиком) проводять надріз шкіри в області зовнішньої поверхні стегна і розширення операційної рани за допомогою утримувачів. Альгілат натрію, ковалентно зв'язаний з люмінесцентним барвником, готують in situ за Прикладом 16. У шприц набирають послідовно 0,05 мл 10 %-ного розчину глюконату кальцію та 0,05 мл одержаного розчину люмінесцентно міченого альгілату натрію. За допомогою ін'єкційної голки весь розчин у шприці заколюють на глибину 1 мм стегового м'язу. Взаємодія розчину люмінесцентно міченого альгілату натрію з розчином глюконату кальцію приводить до утворення альгілатного імплантату у біологічній тканині. Після одержання люмінесцентних зображень проводили ушивання країв операційної рани.

Приклад 18. Введення люмінесцентно міченого альгілатного імпланту методом ін'єкції в міокард щурів.

Дослідну тварину під наркозом фіксують на операційному столі. Після попередньої обробки операційного поля (бритья шерсті, обробка антисептиком) проводять торакотомію в 4-5 межребір'ї. Серце виводять в операційну рану верхівкою до верху. Альгілат натрію, ковалентно зв'язаний з люмінесцентним барвником, готують за Прикладом 16. У шприц набирають

поєдновано 0,03 мл 10 %-ного розчину глюконату кальцію та 0,03 мл одержаного розчину люмінесцентно міченого альгілату натрію. За допомогою ін'єкційної голки весь розчин у шприці заколюють на глибину 0,5-1 мм міокарду. Серце занурюють в грудну порожнину з подальшим пошаровим ушиванням операційної рани.

5 Приклад 19. Порівняння глибини визначення альгілатного імплантату, ковалентно зв'язаного з довгохвильовим, червоним барвником Cy5 та зеленим барвником Seta-460.

Альгілатний імплантат, одержаний за Прикладом 12 ковалентним зв'язуванням альгілату одночасно з довгохвильовим, червоним барвником Cy5 та зеленим барвником Seta-460 у мольному співвідношенні 1:1, вводять на глибину 1 мм і 3 мм в стегно щура (Фіг. 8,а). На
10 поверхню стегна наносять люмінесцентні маркери з того ж самого міченого імплантату, які використовували як стандарти яскравості. Стегно з імплантатами опромінюють з відстані 10 см спочатку світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 636 нм та потужністю 3 Вт зі смуговим фільтром (bandpass filter) 640 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр (longpass filter) 670 нм (Фіг. 8,б). Після цього стегно з
15 імплантатами опромінюють з такої ж відстані 10 см світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 470 нм, такою ж саме потужністю 3 Вт та смуговим фільтром 470 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 1-5 (Фіг. 8,в). Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці (ISO-100), діафрагмою та експозицією (1 с).

20 Результати, представлені на Фіг. 8, свідчать, що яскравість світіння люмінесцентних маркерів у червоному та зеленому діапазоні однакова. Червоний барвник Cy5 дає змогу надійно одержувати люмінесцентне зображення з глибини біологічних тканин щонайменше 3 мм, у той час як люмінесцентний сигнал від зеленого барвника Seta-460 значно менший і потребує підсилювання або більшої експозиції (10 с) для визначення (Фіг. 8,г).

25 Приклад 20. Визначення альгілатного імплантату, ковалентно зв'язаного з довгохвильовим, червоним барвником Cy5 та зеленим барвником FITC.

Альгілатні імплантати, одержані за Прикладом 15 з використанням люмінесцентних барвників Cy5 і FITC вводять на глибину 1 мм і 5 мм у серце, стегно і печінку щура. Імплантати, мічені барвником Cy5, опромінюють світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 630 нм та
30 потужністю 3 Вт. Люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр (longpass filter) 670 нм. Імплантати, мічені барвником FITC, опромінюють світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 470 нм та такою ж саме потужністю 3 Вт. Люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр ЖС-18. Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці
35 (ISO-100), діафрагмою та експозицією.

Результати, представлені на Фіг. 9, свідчать, що червоний барвник Cy5 дає змогу надійно одержувати люмінесцентне зображення з глибини біологічних тканин щонайменше 5 мм (Фіг. 9,а,в,д), у той час як зелений барвник FITC - лише 1 мм у стегні (Фіг. 9,г), але зовсім непридатний для одержання зображення у серці та печінці (Фіг. 9,б,є).

40 Приклад 21. Визначення динаміки зміни в'язкості альгілатного гідрогелю люмінесцентним барвником Seta-460 із застосуванням люмінесцентної мікроскопії.

Альгілат натрію ковалентно зв'язують з барвником Seta-460 за Прикладом 5 та використовують для одержання альгілатних імплантатів в міокарді щурів за Прикладом 15. Люмінесцентне зображення реєструють люмінесцентним мікроскопом ЛОМО "Люмам К-1" з
45 об'єктивом ЛОМО ЛК190 43×1,0 та фотокамерою "САН-690С" через 20 хвилин, а також 1, 3, 7 14 і 21 добу після введення у міокард. Збудження люмінесценції здійснюють ксеноновою лампою потужністю 120 Вт зі смуговим фільтром (bandpass filter) ФС 1-2. Люмінесцентне зображення спостерігають та реєструють через зелений довгохвильовий пропускний фільтр (longpass filter).

50 Барвник Seta-460 яскраво світиться лише у в'язкому, щільному гідрогелі, а при зниженні в'язкості втрачає люмінесценцію. Тому зображення, представлені на Фіг. 10, дають змогу визначити динаміку зміни в'язкості гідрогелю в міокарді: деградація гідрогелю у часі призводить до зменшення його в'язкості, що видно із зменшення області локалізації щільного гідрогелю, на 7-му добу настає фрагментація імпланту, а після 21-ої доби гідрогель повністю деградує та
55 втрачає щільність.

Приклад 22. Визначення у міокарді щура альгілату, ковалентно зв'язаного з барвником TG-404.

60 Взаємодія розчину альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з люмінесцентним барвником TG-404-NHS, з розчином глюконату кальцію за Прикладом 15 не приводить до утворення гідрогелю ні in vivo у біологічних тканинах, ні in vitro у пробірці. Введений у міокард щура розчин

альгілату натрію, ковалентно зв'язаного з люмінесцентним барвником TG-404-NHS, залишається нев'язкою рідиною, область локалізації якої можна визначити за люмінесценцією барвника. Люмінесцентне зображення реєструють люмінесцентним мікроскопом ЛОМО "Люмам К-1" з об'єктивом ЛОМО ЛК190 43×1,0 та фотокамерою "САМ-690С" через 20 хвилин після введення у міокард. Збудження люмінесценції здійснюють ксеноновою лампою потужністю 120 Вт зі смуговим фільтром (bandpass filter) ФС 1-2. Люмінесцентне зображення спостерігають та реєструють через зелений довгохвильовий пропускний фільтр (longpass filter). Зображення на Фіг. 11 дають змогу визначити область локалізації гідрогелю в міокарді: а) гідргель в області пошкодження міокарду ін'єкційною голкою; б) поширення гідрогелю в міокарді; в) гідргель всередині кровоносної судини.

Приклад 23. Визначення області локалізації щільного гідрогельного імплантату разом з продуктами його деградації люмінесцентним барвником Су5.

Альгілат натрію ковалентно зв'язують з барвником Су5 за Прикладом 8 та використовують для одержання альгілатних імплантатів в міокарді двох щурів за Прикладом 15. Серця цих щурів ізолюють, відповідно, через 20 хвилин та 24 години після ін'єкції імплантату. Для визначення імплантату ізолювані серця опромінюють світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 636 нм та потужністю 3 Вт з використанням смугового (bandpass) фільтру 640 нм. Люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр (longpass filter) 670 нм. Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці (ISO-100), діафрагмою та експозицією. Для корекції яскравості зображень у полі зору фотокамери розташовують маркер яскравості з того ж самого люмінесцентно міченого гідрогелю. Візуально та за допомогою фотокамери встановлюють місце розташування імплантату, який світиться у червоній області спектру. Після цього серце розсікають на частини в місці максимальної концентрації імплантату та знову вимірюють, як зазначено вище. Люмінесцентні зображення, одержані через 20 хвилин та 24 години коректують таким чином, щоб маркери яскравості мали однакову яскравість. На Фіг. 12 представлено розсічене серце щура через 20 хвилин (Фіг. 12,а,б) та 24 години (Фіг. 12,в,г) після ін'єкції імплантату у звичайному світлі (Фіг. 12,а,в) та люмінесцентне зображення у тому ж ракурсі (Фіг. 12,б,г). Зменшення інтенсивності світіння та області локалізації гідрогелю, що світиться, свідчить про його розсмоктування в міокарді та надає змогу досліджувати динаміку біодеградації імплантату.

Приклад 24. Визначення альгілатного імплантату у міокарді щура та визначення ступеня його деградації у часі люмінесцентним барвником FITC.

Альгілатний імплантат, одержаний ковалентним зв'язуванням альгілату натрію з барвником FITC за Прикладом 6, вводять в міокард серця щура за Прикладом 17 на глибину 0,5-1 мм. Проводять розріз серця через місце введення імплантату. Поряд з серцем розміщують люмінесцентний маркер з того ж самого міченого імплантату, який використовують як стандарт яскравості. Визначення гідрогелю проводять через 20 хвилин, 1, 4 і 18 годин. Половинки серця з імплантатами опромінюють з відстані 10 см світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 470 нм, потужністю (3 Вт) та смуговим фільтром 470 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 1-5 (зелений канал). Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці (ISO-100), діафрагмою та експозицією (1 с).

Люмінесцентні зображення, одержані у зеленому каналі через 20 хвилин (Фіг. 13,а) та 1 годину (Фіг. 13,б) після введення імплантату мали різний вигляд. Область люмінесценції через 20 хвилин має дуже малий розмір через слабку проникненість зеленого світла крізь біологічні тканини. Через одну годину спостерігається збільшення області світіння завдяки розтіканню гідрогелю та наближенню його до поверхні. Подальше розтікання, через 4 години (Фіг. 13,в) та 18 годин (Фіг. 13,г) приводить до зменшення області світіння гідрогелю.

Приклад 25. Диференціація областей локалізації гідрогелю з різним реологічним станом люмінесцентними барвниками Seta-460 та Су5.

Альгілатний імплантат, одержаний за Прикладом 12 ковалентним зв'язуванням альгілату одночасно з червоним барвником Су5 та зеленим барвником Seta-460 у мольному співвідношенні 1:1, вводять на глибину 1 мм і 3 мм в стегно щура (Фіг. 14,а). На поверхню стегна наносять люмінесцентні маркери з того ж самого міченого імплантату, які використовують як стандарти яскравості. Визначення гідрогелю проводять через 30 хвилин, 18, 48 і 72 години. Стегно з імплантатами опромінюють з відстані 10 см спочатку світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 636 нм та потужністю 3 Вт зі смуговим фільтром 640 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 670 нм (червоний канал). Після цього стегно з імплантатами опромінюють з такої ж відстані (10 см) світлодіодом з

довжиною хвилі випромінювання 470 нм, такою ж саме потужністю (3 Вт) та смуговим фільтром 470 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 1-5 (зелений канал). Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці (ISO-100), діафрагмою та експозицією (1 с).

На Фіг. 14 наведено одержані зображення стегна щура через 30 хвилин (а-г), 18 годин (д-з), 48 годин (і-м) та 72 години (н-р) після ін'єкції гідрогельного імплантату, ковалентно зв'язаного з барвниками Seta-460 та Cy5, у звичайному світлі (а, д, і, н) та люмінесцентне зображення у тому ж ракурсі у зеленому (в, ж, л, п) та червоному (г, з, м, р) каналах, а також в обох каналах одночасно (б, є, к, о). Люмінесцентні зображення, одержані як у зеленому так і у червоному кольорі через 30 хвилин та 18 годин після введення імплантату, свідчать, що області локалізації гідрогелю, введенного на глибину 1 мм і 3 мм змінюються по-різному (Фіг. 14,а-з). На глибині 1 мм область локалізації гідрогелю збільшується, а на глибині 3 мм - зменшується. Це свідчить про те, що завдяки рухливій активності щура, протягом цього часу гідрогель повністю приймає форму, що відповідає положенню тканин м'язу.

Після цього область локалізації гідрогелю, виміряна у зеленому каналі (барвник Seta-460), починає зменшуватися (Фіг. 14,і-л,н-п). Тобто барвник Seta-460, що є чутливим до в'язкості середовища, дає змогу контролювати динаміку змін реологічного стану гідрогелю. Зменшення області його люмінесценції свідчить про біодеградацію щільного гідрогельного імплантату.

Область локалізації гідрогелю, виміряна у червоному каналі (барвник Cy5), продовжує збільшуватися протягом щонайменше 48 годин (Фіг. 14,к,м) і лише через 72 години зменшує розміри та інтенсивність люмінесценції (Фіг. 14,о,р). Барвник Cy5, що є не чутливим до фізико-хімічних властивостей середовища, дає змогу визначити область локалізації щільного гідрогельного імплантату разом з продуктами його біодеградації. Таким чином, цей барвник може забезпечувати моніторинг транспорту лікарських препаратів гідрогельним носієм.

Приклад 26. Визначення областей локалізації гідрогелю люмінесцентними барвниками Seta-460 та SeTau-647.

Альгінатний імплантат, одержаний за Прикладом 13 ковалентним зв'язуванням альгілату одночасно з червоним сквараїн-ротаксановим барвником SeTau-647 та зеленим барвником Seta-460 у мольному співвідношенні 1,1:1,0, вводять через заздалегідь пострижену шкіру в м'язи стегна щура на глибину 3 мм. На поверхню стегна наносять люмінесцентні маркери з того ж самого міченого імпланту, які використовують як стандарти яскравості. Визначення гідрогелю проводять через 30 хвилин, 5 годин, 24 години, 48 годин і 21 добу. Стегно з імплантатами опромінюють з відстані 10 см спочатку світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 636 нм та потужністю 3 Вт зі смуговим фільтром 640 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 670 нм. Після цього стегно з імплантатами опромінюють з такої ж відстані 10 см світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 470 нм, такою ж саме потужністю 3 Вт та смуговим фільтром 470 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 1-5. Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці (ISO-100), діафрагмою та експозицією (1 с).

На Фіг. 15 показано одержані люмінесцентні зображення стегна щура через 30 хвилин (а, б) та 24 години (в, г) після ін'єкції гідрогельного імплантату, ковалентно зв'язаного з барвниками Seta-460 та SeTau-647, у зеленому (а, в) та червоному (б, г) каналах. Зображення, одержані при освітленні довжиною хвилі 470 нм (зелений канал) свідчать, що це збудження не придатне для отримання люмінесцентних зображень через шкіру бо поверхневі шари шкіри розсіюють та поглинають короткохвильове випромінювання (Фіг. 15,а,в). Зображення, одержані у червоному кольорі (червоний канал) демонструють, що використання світла з довжиною хвилі 600-750 нм дозволяє спостерігати за розповсюдженням гелю через шкіру без втрати роздільної здатності зображення (Фіг. 15,б). Впродовж 24 годин після введення імплантату область локалізації гідрогелю збільшується завдяки розповсюдженню гелю в м'язових тканинах (Фіг. 15,г). А завдяки високій стабільності сквараїн-ротаксанового барвника SeTau-647 спостереження локалізації гідрогелю та продуктів його розпаду можна проводити впродовж тривалого часу, щонайменше 21 добу.

Приклад 27. Визначення дифузії гідрогельного носія трьома люмінесцентними барвниками - Seta-460, Seta-555 та SeTau-647.

Альгінатний гідрогель, одержаний аналогічно Прикладу 12 ковалентним зв'язуванням альгілату одночасно з зеленим барвником Seta-460, жовтим барвником Seta-555 та червоним барвником SeTau-647 у мольному співвідношенні 1:1:1, вводять на глибину 3 мм в стегно щура. На поверхню стегна наносять люмінесцентні маркери з того ж самого міченого імплантату, які використовують як стандарти яскравості. Визначення гідрогелю проводять через 30 хвилин, 18,

24 і 48 години. Стегно з гідрогелем опромінюють з відстані 10 см спочатку світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 636 нм та потужністю 3 Вт зі смуговим фільтром 640 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 670 нм (червоний канал). Після цього стегно з гідрогелем опромінюють з такої ж відстані (10 см) світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 532 нм, такою ж саме потужністю (3 Вт) та смуговим фільтром 532 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через жовтий смуговий пропускний фільтр 562/40 нм. Далі стегно з гідрогелем опромінюють з такої ж відстані (10 см) світлодіодом з довжиною хвилі випромінювання 470 нм, такою ж саме потужністю (3 Вт) та смуговим фільтром 470 нм, а люмінесценцію спостерігають та реєструють через довгохвильовий пропускний фільтр 1-5 (зелений канал). Люмінесцентне зображення реєструють фотокамерою "Canon EOS 5D Mark II" з однаковою чутливістю матриці (ISO-100), діафрагмою та експозицією (1 с).

Люмінесцентні зображення, одержані у зеленому, жовтому та червоному каналах через вказані проміжки часу після введення гідрогелю, свідчать, що ці області змінюються у часі порізно. Зелена область, що відповідає щільному гідрогелю (барвник Seta-460 є чутливим до в'язкості середовища), зменшується, а жовта та червона області, що вказують на присутність ще й продуктів деградації гідрогелю (барвники Seta-555 та SeTau-647 є не чутливими до в'язкості середовища), спочатку збільшуються через дифузію (розсмоктування) гідрогелю, а потім зменшуються, бо концентрація продуктів деградації гідрогелю стає нижчою, ніж можливо зареєструвати ($\sim 10^{-6}$ М). При цьому область світіння барвника Seta-555 (жовта область) змінюється швидше, ніж червона область світіння барвника SeTau-647 через більшу молекулярну масу останнього. Це свідчить про можливість моніторингу дифузії низькомолекулярних органічних сполук, у тому числі лікарських препаратів, у реальному часі.

Приклад 28. Отримання хітозану, ковалентно зв'язаного з люмінесцентним сквараїновим барвником Seta-460.

25 мг флуоресцентного барвника Seta-460-Carboxy розчиняють в 0,5 мл 50 мМ MES буфера (рН 6,1). До розчину Seta-460-Carboxy послідовно додають 8 мг гідрохлориду N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодііміду (EDC) та 4 мг N-гідрокисукциніміду (NHS), перемішують впродовж 30 хвилин (Розчин 1). Окремо готують водний розчин 500 мг хітозану у 50 мл 0,1 М оцтової кислоти (Розчин 2). Для експерименту використовують низькомолекулярний хітозан, деацетильований на 75-85 % (Sigma-Aldrich, Німеччина). До розчину хітозану (Розчин 2) при постійному інтенсивному перемішуванні по краплях додають Розчин 1 та продовжують перемішувати при кімнатній температурі впродовж 12 годин. Далі хітозан, ковалентно зв'язаний з барвником Seta-460, осаджують додаванням 100 мл ацетону, відфільтровують та промивають на фільтрі ізопропанолом та ацетоном. Вихід: 465 мг.

Приклад 29. Введення люмінесцентно міченого хітозанового імплантату методом ін'єкції in situ.

В 8 мл фосфатно-сольового буферу (PBS), що містить 5,4 мкл оцтової кислоти, розчиняють 200 мг хітозану, ковалентно зв'язаного з люмінесцентним барвником. До охолодженого до $\sim 10^{\circ}\text{C}$ розчину хітозану додають по краплях розчин 1,9 г динатрієвої солі бета-гліцерин фосфату в 2 мл PBS. Отриманий розчин фільтрують через 0,22 мкм мембранний фільтр, набирають 0,06-0,10 мл профільтрованого розчину в шприц, та за допомогою ін'єкційної голки весь розчин у шприці заколюють на необхідну глибину у дослідну біологічну тканину. Нагрівання розчину люмінесцентно міченого хітозану до температури тіла приводить до утворення імплантату безпосередньо у біологічній тканині.

Джерела інформації:

1. Regenerative medicine applications in organ transplantation. Ed. G. Orlando, J.P. Lerut, S. Soker, R.J. Stratta, Elsevier, 2014.

2. Landa N, Miller L, Feinberg MS. et al. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. Circulation, 2008, V. 117, Iss. 11, p. 1388-1396.

3. Гажва Ю.В., Бонарцев А.П., Мухаметшин Р.Ф. и др. Разработка и исследование in vivo и in vitro костно-пластического материала на основе композиции гидроксиапатита, поли-3-оксибутирата и альгината натрия. Современные технологии в медицине, 2014, Т. 6, № 1, - С. 6-13.

4. Кузнецов Н.А, Никитин В.Г. Щадящие хирургические вмешательства и интерактивные повязки в лечении инфицированных ран. Хирургия, 2006, Т. 8, № 2, - С. 39-46.

5. Polyethylene glycols - advances in research and application. Ed. Q.A. Acton. ScholarlyEditions, Atlanta, Georgia, 2013.

6. Progress in molecular and environmental bioengineering - from analysis and modeling to technology applications. Ed. A. Carpi. Chapter 5. Gulrez S.K.H., Al-Assaf S., Phillips G.O. Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications. InTech, 2011, 660 p. ISBN 978-953-307-268-5, DOI: 10.5772/771.

5 7. Owens E.A., Hyun H., Kim S.H., Lee J.H., Park G.L., Ashitate Y., Choi J., Hong G.H., Alyabyev S., Lee S.J., Khang G., Henary M., Choi H.S. Highly charged cyanine fluorophores for trafficking scaffold degradation. Biomed. Mater., 2013, V. 8, 014109 (9pp). doi:10.1088/1748-6041/8/1/014109

8. Artzi N., Oliva N., Puron C, Shitreet S., Artzi S., Ramos A, et al. In vivo and in vitro tracking of erosion in biodegradable materials using non-invasive fluorescence imaging. Nat. Mater., 2011, V. 10, p. 704-709.

9. Cunha-Reis C, El Haj A.J., Yang X., Yang Y. Fluorescent labeling of chitosan for use in non-invasive monitoring of degradation in tissue engineering. J. Tissue Eng. Regen. Med., 2013, V. 7, p. 39-50.

10. Kim S.H., Lee J.H., Hyun H., Ashitate Y., Park G., Robichaud K., Lunsford E., Lee S.J., Khang G., Choi H.S. Near-infrared fluorescence imaging for noninvasive trafficking of scaffold degradation. Sci. Rep., 2013, V. 3, p. 1198. doi: 10.1038/srep01198. Epub 2013 Feb 5.

11. Liu J., Zhang Y., Yang T., Ge Y., Zhang S., Chen Zh., Gu N. Synthesis, characterization, and application of composite alginate microspheres with magnetic and fluorescent functionalities. J. App. Polymer Sci., 2009, Vol. 113, 4042-4051.

12. Zhu H., Srivastava R., Brown J.Q., McShane M.J. Combined physical and chemical immobilization of glucose oxidase in alginate microspheres improves stability of encapsulation and activity. Bioconjugate Chem., 2005, V. 16, 1451-1458.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

25

1. Спосіб визначення гідрогелю в біологічних тканинах шляхом збудження та реєстрації люмінесценції від люмінесцентного барвника, ковалентно зв'язаного з гідрогелем, який **відрізняється** тим, що використовують люмінесцентний барвник, чутливий до в'язкості гідрогелю.

30 2. Спосіб визначення гідрогелю в біологічних тканинах шляхом збудження та реєстрації люмінесценції від люмінесцентного барвника, ковалентно зв'язаного з гідрогелем, який **відрізняється** тим, що використовують люмінесцентний барвник, нечутливий до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища.

35 3. Спосіб визначення гідрогелю в біологічних тканинах шляхом збудження та реєстрації люмінесценції від люмінесцентного барвника, ковалентно зв'язаного з гідрогелем, який **відрізняється** тим, що одночасно використовують не менше двох люмінесцентних барвників, щонайменше один з яких є чутливим до в'язкості гідрогелю, а інший є не чутливим до в'язкості, полярності та гідрофільності середовища.

40 4. Спосіб визначення гідрогелю за п. 1, де як люмінесцентний барвник, чутливий до в'язкості гідрогелю, використовують барвник Seta-460.

5. Спосіб визначення гідрогелю за п. 3, де як люмінесцентний барвник, чутливий до в'язкості гідрогелю, використовують барвник Seta-460.

6. Спосіб визначення гідрогелю за п. 3, де барвники збуджуються та/або випромінюють світло на різних довжинах хвиль та/або мають різні часи життя люмінесценції.

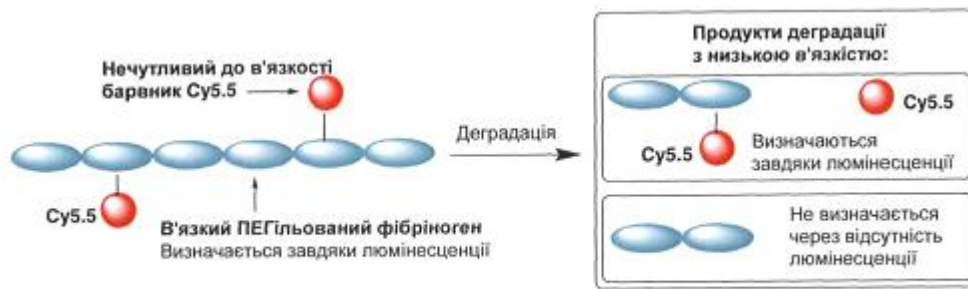


Fig. 1



Fig. 2

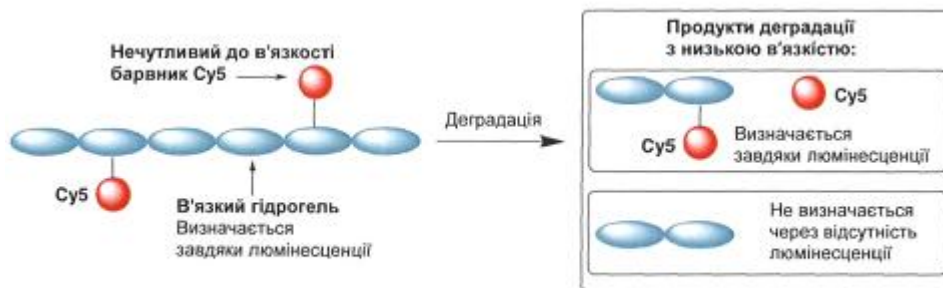


Fig. 3

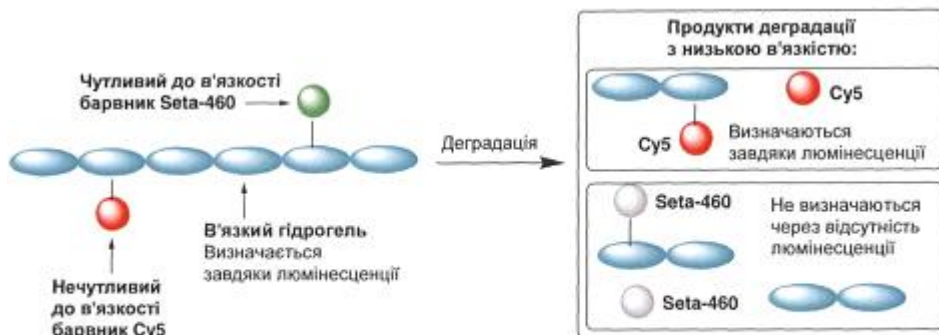


Fig. 4

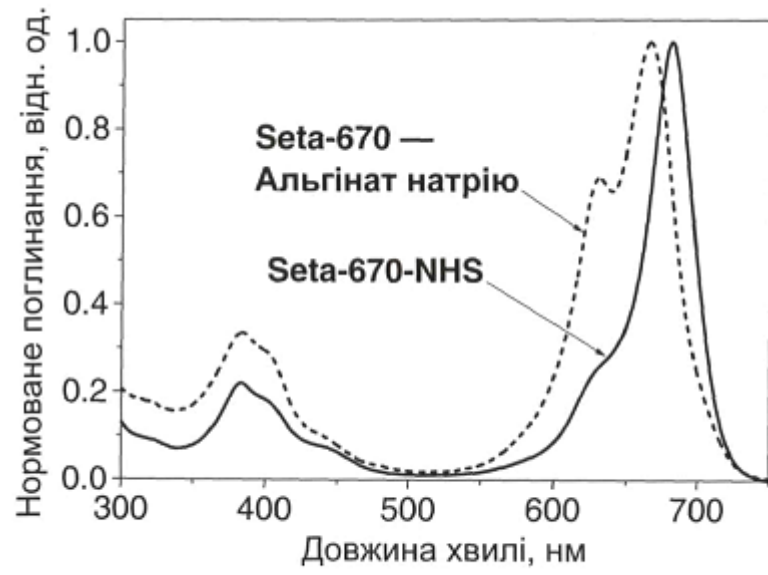


Fig. 5

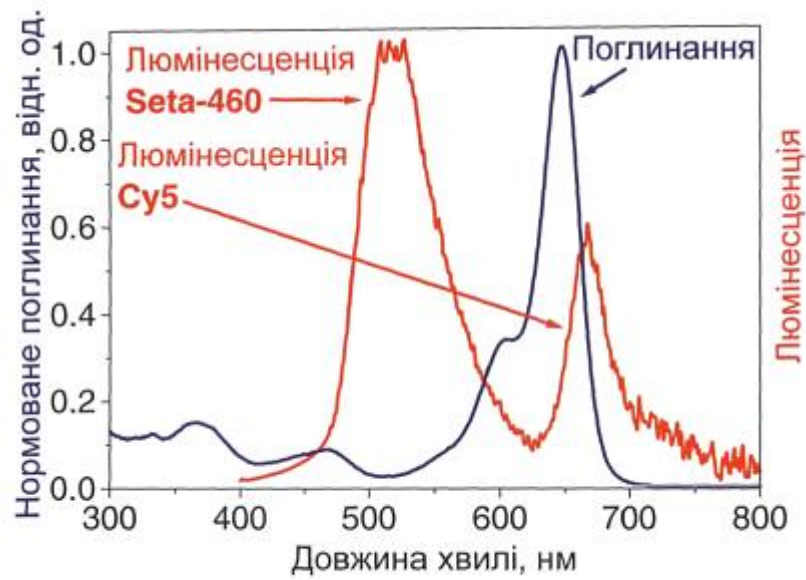


Fig. 6

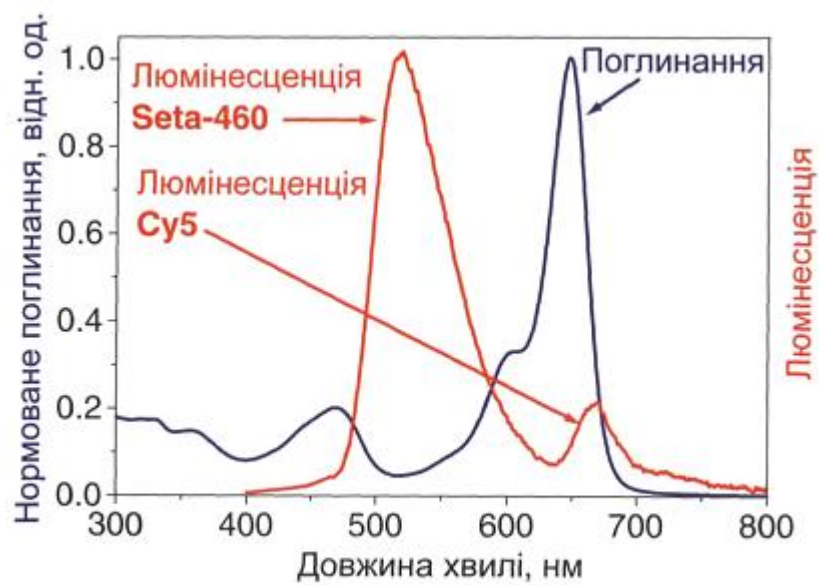


Fig. 7

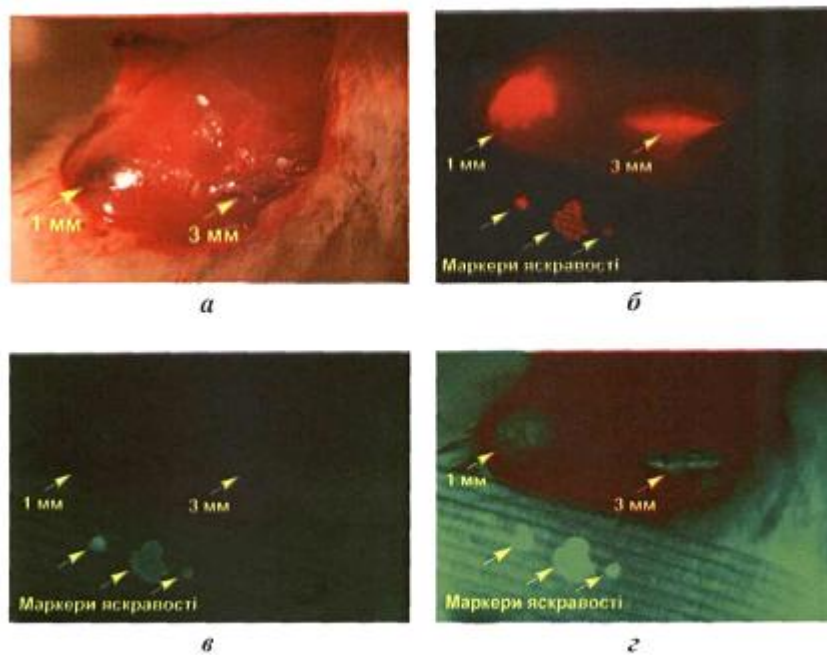


Fig. 8

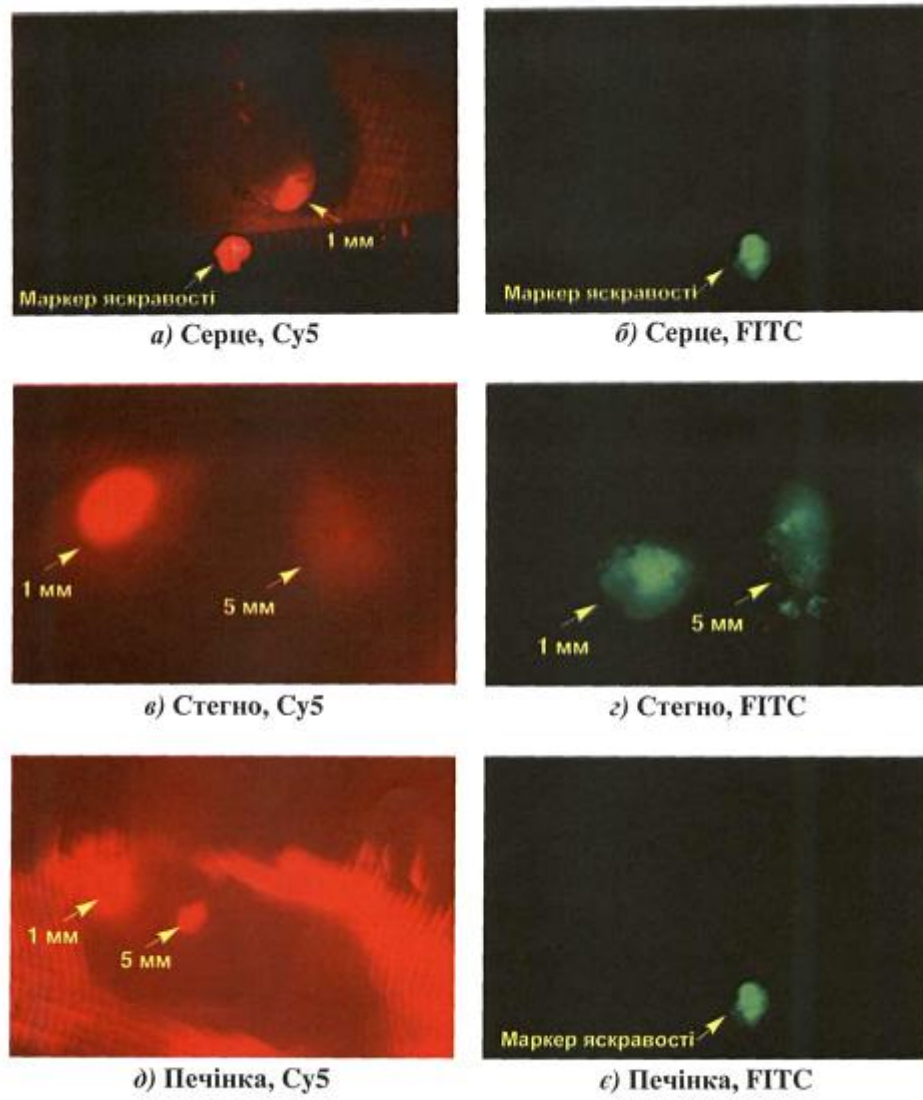


Fig. 9

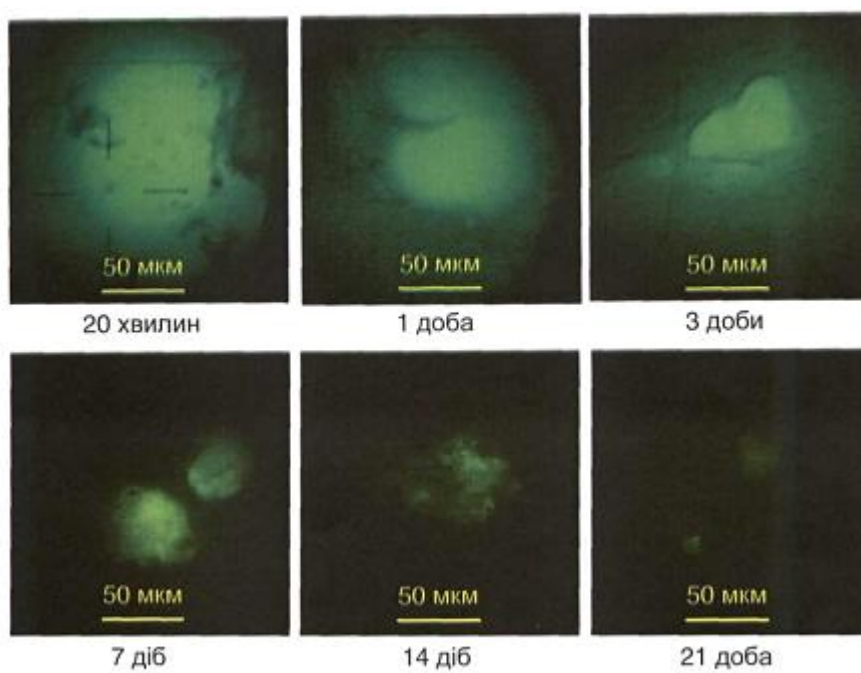


Fig. 10

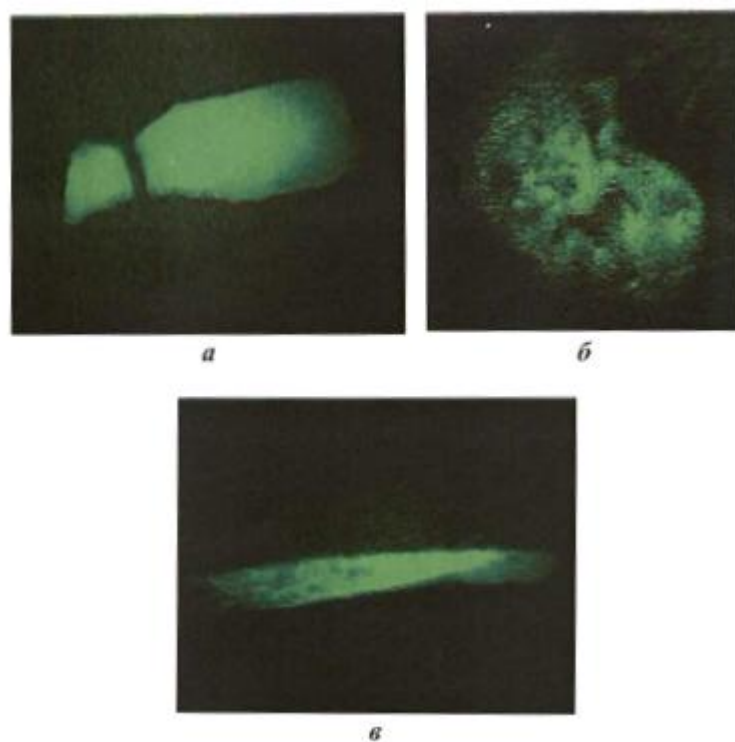


Fig. 11

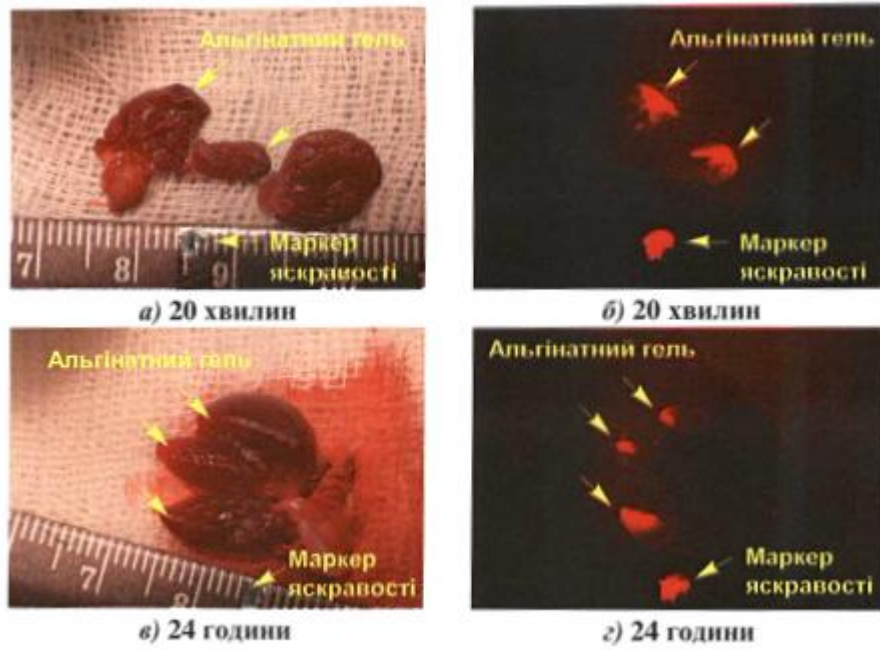


Fig. 12

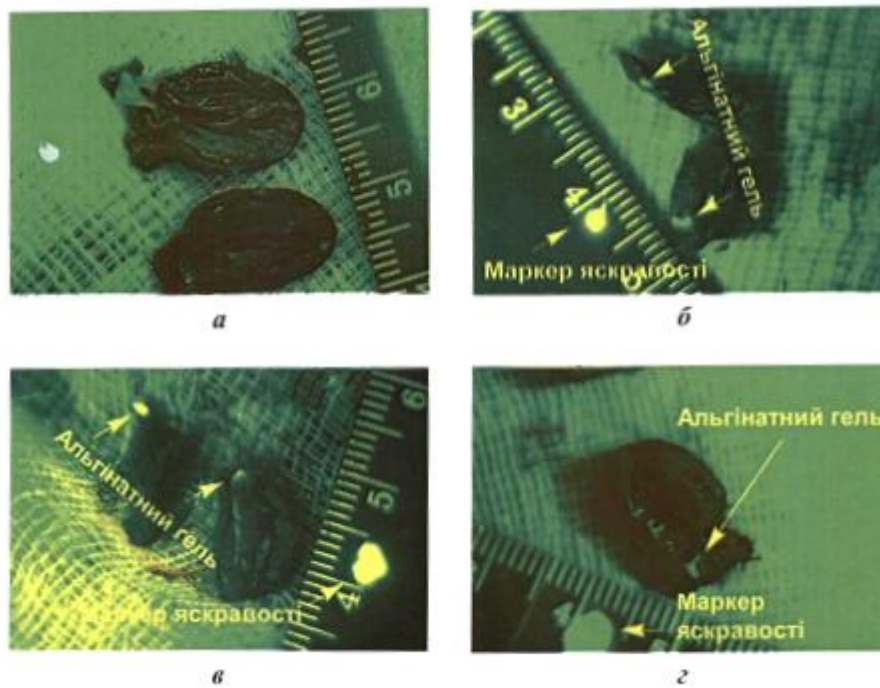
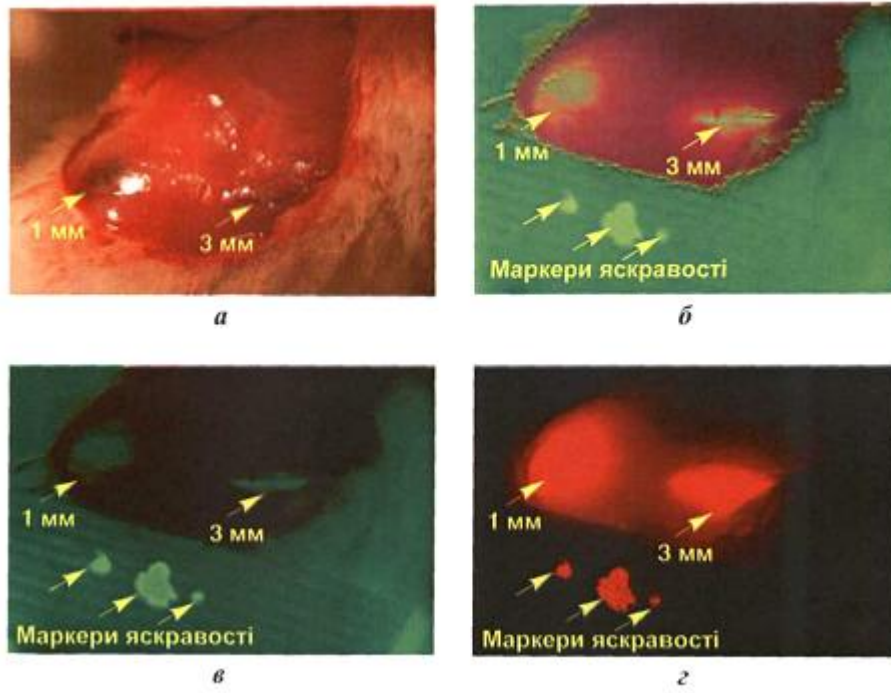
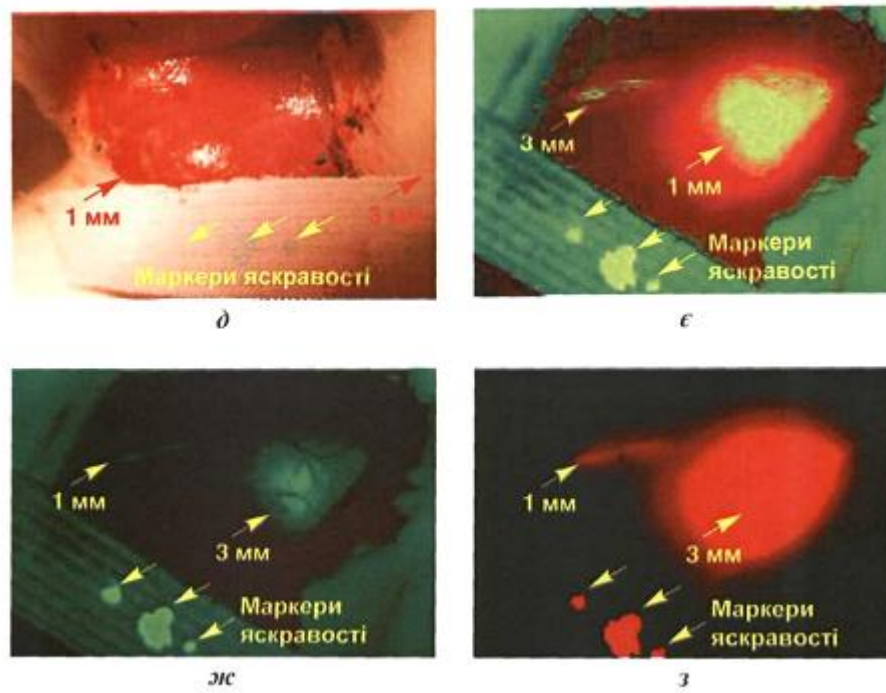


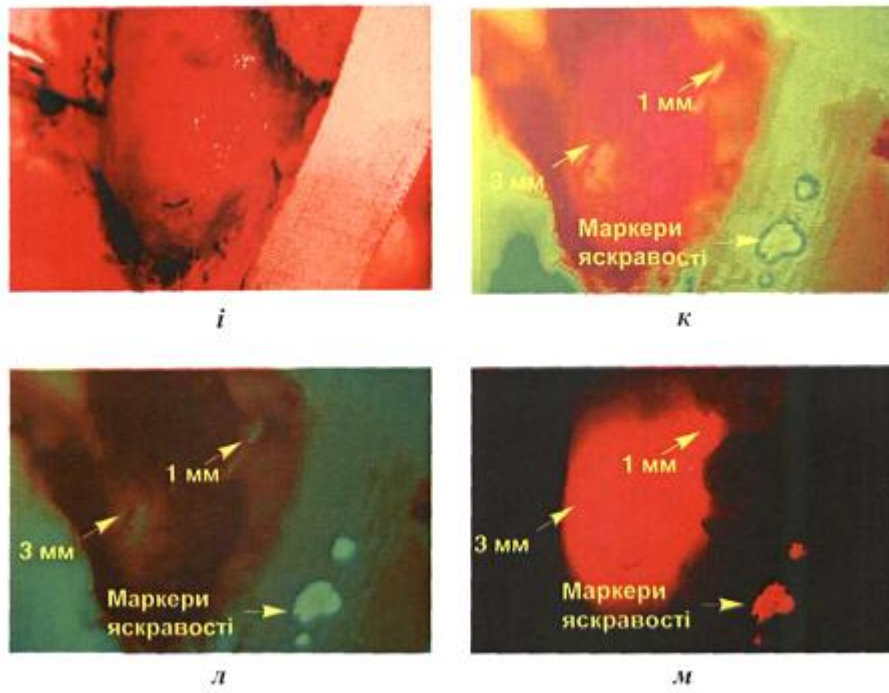
Fig. 13



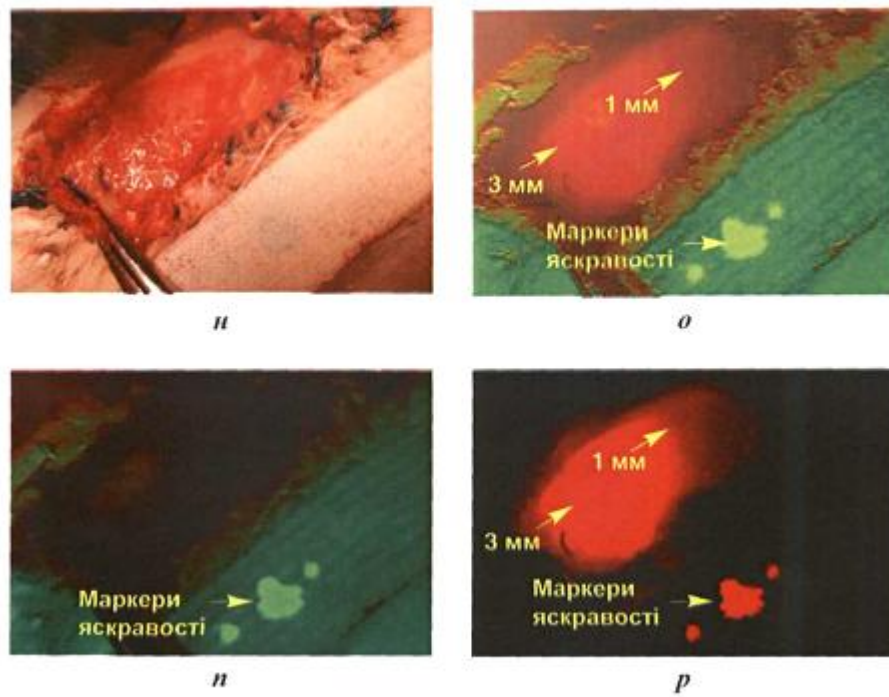
Фіг. 14 (а-г)



Фіг. 14 (д-з)



Фіг. 14 (і-м)



Фіг. 14 (н-р)

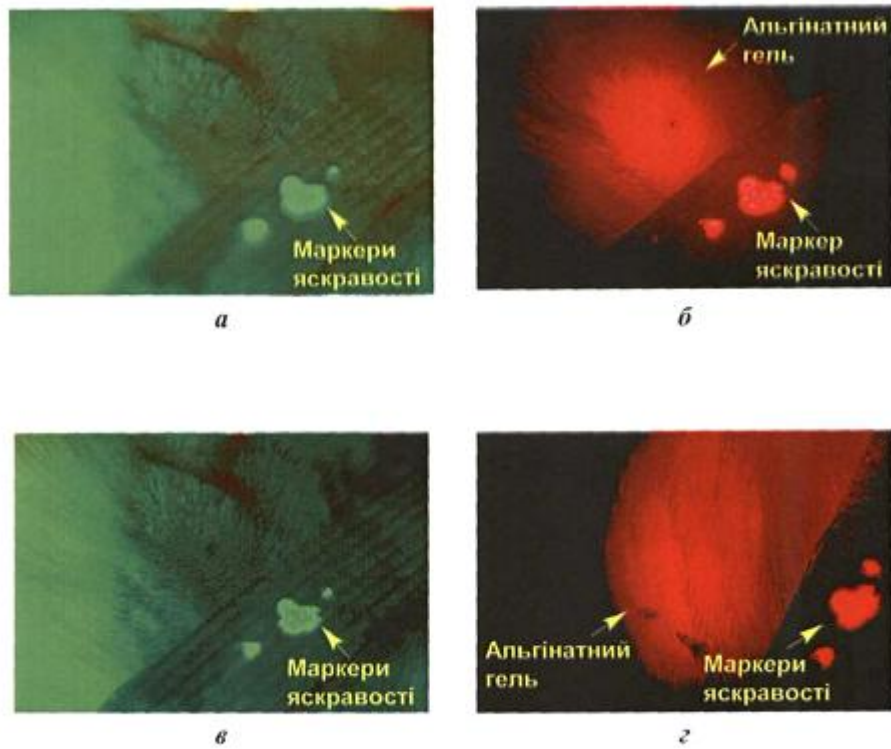


Fig. 15