

水凝胶在医学领域的研究现状

王薇^{1,2}, 李丹杰^{1,2}, 李菲^{1,2}, 夏培斌^{1,2}, 王超威^{1,2}, 余刘洋^{1,2}, 杨亚杰^{1,2}, 程杰^{1,2},
崔景强^{1,2*}

(1. 河南省医用高分子材料技术与应用重点实验室, 河南 长垣 453400;
2. 河南驼人医疗器械研究院有限公司, 河南 长垣 453400)

摘要: 水凝胶是一个三维网络且具有高含水量和高溶胀性的结构聚合物, 可以模拟人体组织, 具有良好的生物相容性, 是组织工程理想的生物材料。本文主要介绍了水凝胶在医学领域的应用现状, 旨在为水凝胶在医学领域的研究和产品转化提供参考, 并对水凝胶在医学领域的发展进行了展望, 提出了未来可进一步研究的方向。

关键词: 水凝胶; 医学领域; 制备; 应用

中图分类号: TQ0631.3

文献标识码: B

文章编号: 1009-797X(2024)05-0018-05

DOI: 10.13520/j.cnki.rpte.2024.05.005

水凝胶是一类极为亲水的三维网络结构凝胶, 它在水中迅速溶胀并在此溶胀状态下可以保持大量体积的水而不溶解, 具有良好的相容性和生物降解性, 被广泛的应用到药物输送、组织再生等医学领域。本文将主要对水凝胶的制备方法、性质及应用进行综述, 重点介绍水凝胶的制备方法及其在医学领域中的应用。

1 水凝胶的分类与制备

根据水凝胶的键合方式的不同, 水凝胶可以分为物理水凝胶和化学水凝胶。

1.1 物理水凝胶的制备

物理凝胶是通过物理作用力, 如静电作用、氢键、链的缠绕等形成的, 通过加热凝胶可转变为溶液, 所以也被称为假凝胶或热可逆凝胶。制备物理水凝胶通常采用的方法有: 缔合交联、离子交联、氢键和疏水相互作用、结晶作用。

刘畅^[1]以丙烯酰胺(AM)为亲水主单体, 辛基酚聚氧乙烯 10 醚丙烯酸酯(OP10-AC)为疏水单体, 在表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)的水溶液中, 通过自由基胶束聚合制备一系列疏水缔合水凝胶(简称 HA-gels), 具有优异的性能。

Haitao Zhang 等^[2]采用物理双交联法制备了聚丙烯酰胺(CMC-Fe³⁺/PAAm)双网络水凝胶。在这种水凝胶中, Fe³⁺交联羧甲基纤维素(CMC)用作耗散能量的第一网络, 疏水缔合 PAAm 用作维持水凝胶完

整性的第二网络。由于这些物理相互作用, 制备的水凝胶显示出良好的机械性能(例如, 拉伸强度为 1.82 MPa; 韧性为 6.52 mJ/m³)。此外, CMC-Fe³⁺/PAAm 水凝胶具有良好的导电性(1.82 S/m)、应变敏感性(应变为 50%~600% 时的应变系数=4.02)和快速响应时间(260 ms)。该研究表明 CMC-Fe³⁺/PAAm 水凝胶, 用于精确监测各种人体运动, 在柔性和可拉伸应变传感器中具有潜在的应用。Zhang Y 等^[3]成功地制备了由物理交联 PVA 和疏水缔合聚丙烯酰胺(HAPAM)组成的新型物理双网络水凝胶(PDN 凝胶)。

Sa 等^[4]将生物活性明胶甲基丙烯酸盐(GelMA)与 2-(2-甲氧基乙氧基)甲基丙烯酸乙酯(MEO₂MA)和 2-(3-(6-甲基-4-氧代-1,4-二氢嘧啶-2-基)脲基)甲基丙烯酸酯乙酯(UPyMA)聚合, 生成一种杂化支化共聚物。当温度升高到该超分子共聚物的较低临界溶液温度(LCST)以上时, 会发生快速凝胶化, 其中 PMEO₂MA 片段脱水并组装成簇, 从而提供疏水微环境, 促进 UPy 二聚以连接聚合物链, 形成四重氢键增强的交联网络。该动态超分子水凝胶可用于调节干细胞用于组织再生应用。

Liang 等^[5]开发了一种在双液相分段微流控装置

作者简介: 王薇(1994-), 女, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为医用高分子材料。

* 为通讯作者

收稿日期: 2022-11-02

中一步多功能连续合成沸石的技术。通过将二氧化硅溶液和氧化铝溶液分别泵入位于 PTFE 外管轴上的两个紧密填充的不锈钢毛细管中,然后在 PTFE 管中在 90 °C 下结晶。合成的沸石 A 晶体通过 X 射线衍射、傅立叶变换红外光谱和扫描电子显微镜进行了表征。水凝胶段的尺寸决定混合效率并控制结晶过程。外管尺寸的减小或超声波辐射可减小水凝胶段的尺寸,导致混合效率的提高,结晶过程的强化,并随后形成高结晶性 A 沸石晶体。本文所开发的技术可应用于其它类型沸石的连续合成。

1.2 化学水凝胶的制备

化学水凝胶是通过化学键交联形成的三维网络聚合物,与物理水凝胶不同,化学水凝胶不可逆,所以也被称为真凝胶。制备化学水凝胶通常采用的方法有:高能辐射交联法、自由基聚合法、酶催化交联法和高分子功能团间的反应。

Nagaoka N 等^[6]采用辐射聚合交联合成聚 N-异丙基丙烯酰胺水凝胶。Ikada Y 等^[7]利用辐射法将聚乙烯醇(PVA)、聚环氧乙烷、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮和甲基纤维素的中等浓度水溶液浇铸在玻璃板上并用电子束照射以产生交联的水凝胶。

Jennifer 等^[8]采用 UV 自由基聚合技术合成用于控制释放药物或其他溶质的水凝胶,在单体和溶质存在的情况下进行光聚合,将溶质截留在水凝胶中。建立了一个动力学凝胶模型,以研究溶质材料对聚合过程和随后的网络结构的影响。

Yza E 等^[9]在过氧化氢和过氧化物酶的存在下,通过透明质酸酐和硫酸软骨素酐的酶催化交联形成了可注射的 BMSCs 负载水凝胶系统,这种可注射的 BMSCs 负载水凝胶可以作为骨修复和再生的有效 3D 支架。

Khan F 等^[10]利用氨基官能(AF)单体与壳聚糖(CS)的分子相互作用制备水凝胶(HGs)。这种 AF 单体能够通过 CS 物理相互作用在短时间(在 10~19 s 的范围内)形成 HGs。这种共价交联反应过程的替代方法,有效的降低了生物材料的使用成本。

2 水凝胶在医学领域的基本性质

在医学领域,水凝胶需要满足生物相容性、生物降解性和纳米复合性。

2.1 生物相容性

生物相容性不仅仅指材料本身的性质,更多的是

指材料与机体相互作用的结果。考虑到机体复杂的修复过程存在免疫排斥的隐患,所以当水凝胶被用于生物医学领域时,其生物相容性是需要考虑和评价的重要指标。

Shim W S 等^[11]通过在两端加入 pH 敏感的磺胺甲磺低聚物(SMO),合成了 pH 和温度敏感嵌段共聚物热敏性聚(e-己内酯-共丙交酯)-聚(乙二醇)-聚(e-己内酯-丙交酯)(PCLA-PEG-PCLA)嵌段共聚物,在生理条件下(pH 7.4 和 37 °C)能形成稳定的凝胶,该共聚物能够作为药物递送系统和细胞治疗的候选物。

Yin L 等^[12]研究含聚(丙烯酸-共-丙烯酰胺)/O-羧甲基壳聚糖互穿聚合物网络(SPH-IPN)的超多孔水凝胶的溶胀对 pH、离子强度和温度刺激的敏感性。以胰岛素为模型药物,检测到聚合物与蛋白质的相互作用。在溶胀的 SPH 互穿网络中,随着 O-羧甲基壳聚糖网络量的增加,聚合物对压缩和 37 °C 暴露时间的保水能力提高。对 AD293 和 RBL-2H3 细胞进行的 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-联苯四唑溴化铵(MTT)测定以及对大鼠肠道进行的原位乳酸脱氢酶测定和形态学研究证实,SPH-IPN 具有良好的生物相容性,而且 SPH 互穿网络也可以作为肽和蛋白质药物的递送载体。

2.2 生物降解性

生物可降解材料通常是指该材料在一定时间内,在机体内发挥相应的功能,一段时间过后,开始降解,降解产物能够被机体吸收或者随机体的新陈代谢排出体外。水凝胶的生物可降解性是研究者们关注的一个热点。

Shen X 等^[13]为选择适合缺血心肌冠状动脉血管生成的水凝胶,评价了各种水凝胶的生物相容性和生物降解性,包括合成的 6 种透明质酸水凝胶、纤维蛋白水凝胶、聚乙烯醇-壳聚糖水凝胶和弹性蛋白水凝胶。在体外检测了它们的降解率、细胞毒性、免疫反应和血管生成速率,发现具有适当的降解速率和低的免疫反应的水凝胶,适合于缺血心肌中的冠状动脉血管生成。

Xiong Y Q^[14]以胶原和透明质酸为基质,碳二亚胺为交联剂,合成了可降解医用水凝胶,用于药物的控释。

2.3 纳米复合性

纳米材料合成工艺简单,但是微粒易团聚、表面

吸附性过强,故水凝胶的纳米复合性往往是将纳米材料的刚性、稳定性等属性和水凝胶的软湿性能相结合,提高水凝胶的机械性能,同时还能赋予水凝胶一些新的性能。

Liu H 等^[15]制备具有海藻酸盐凝胶核和氧化铁(-Fe₂O₃)壳的清晰磁性纳米复合珠,纳米颗粒通过胶体颗粒在液-液界面的自组装和随后的原位凝胶制备。含海藻酸钠的水滴通过以下方法原位凝胶化:从乙二胺四乙酸钙(Ca-EDTA)螯合物中释放的钙离子通过缓慢水解 d-葡萄糖基-内酯(GDL)降低 pH 值。得到的混合珠具有核-壳结构的样品很容易通过去除己烷收集。这种制作方法简单、高校,制备的混合珠可作为生物分子的递送载体,药物、化妆品、食品补充剂和活细胞。

Chiew C 等^[16]制备埃洛石/海藻酸盐的生物纳米复合微球,重点研究了埃洛石/海藻酸盐生物纳米复合材料的力学、化学和传质性能。发现制备的埃洛石/海藻酸盐生物纳米复合材料成为包括生物加工和组织工程在内的多种应用的更有前景的材料。

3 水凝胶在医学领域中的应用

3.1 药物释放载体

一些抗脂肪肝、抗癌、抗炎等药物难溶于水,多以固体分散体的形式给药,但是固体分散体的给药方式缓释效果差,故可借助药物释放载体。目前药物释放载体有两种方式,一种是持续释放药物,这种方式是治疗癌症一个很关键的方式;另一种是刺激响应释放药物,能够智能的响应体内的生理条件的变化和体外刺激。

Zhanga Y 等^[17]基于水凝胶的多相理论建立了一个新的数学模型,并采用商业有限元求解器来模拟溶胀水凝胶的药物释放。模拟结果表明,水凝胶载体的溶胀从边缘到中心开始,当水凝胶的溶胀接近新的平衡状态时,药物释放最初是反常传输,随后是 Fickian 扩散。

Anirudhan T S 等^[18]提出了一种水凝胶/胶束复合体系作为双药物释放载体的制备方法。该水凝胶由聚乙二醇(PEG)和聚乙烯醇(PVA)制备。研究了胶束和 PEG-PVA/胶束 DDDS 的药物释放行为,并将其作为 pH 和温度的函数。通过幂律方程分析药物的释放曲线,揭示药物的释放机制。聚合物胶束作为水不溶性药物的稳定和递送,在生物医学领域正受到

高度关注。

3.2 组织填充材料

传统的组织填充材料,包括人工填充物和自体组织移植。人工填充材料如硅胶假体,患者可能存在免疫排斥反应的风险,自体组织移植是局部填充常见的方式,但是手术后并发症高,恢复时间长。水凝胶用作注射性软组织填充材料,相对更安全,具有更广泛的临床应用前景。

Parirokh M 等^[19]研究灰色三氧化矿物聚集体(GMTA)、白色三氧化矿物聚集体(WMTA)和一种新的实验性骨水泥(富钙骨水泥,CEM)对皮下组织的反应,发现所有材料均具有良好的皮下组织耐受性。

Holland 等^[20]探索根管填充材料对牙本质芯片根尖填充后,根尖周愈合过程是否有影响。研究了猴子的牙齿被填充了九种不同的填充材料。治疗后 90 天,组织学数据显示所研究的九种材料的结果没有差异。这一事实表明,当存在塞子时,填充材料不会影响愈合过程。

Mo J 等^[21]寻找整形外科中理想的可注射的软组织填充剂,总结了使用亲水性聚丙烯酰胺凝胶作为可注射软组织填充剂的经验。发现使用亲水性聚丙烯酰胺凝胶的初步效果非常好,并发症少,是理想的软组织填充剂。

3.3 医用敷料

传统敷料,如纱布,容易黏着创面,更换时会造成再次机械性损伤,外界环境微生物容易通过,交叉感染的机会较高。水凝胶作为医用敷料,可保持创面湿润,保留创面本身释放的生物活性物质,在为创面愈合提供一个最佳的微环境外,还可以使创面愈合的过程加速。

Jiang S 等^[22]研究两性离子(甲基丙烯酸磺胺甜菜碱,SBMA)水凝胶敷料对大鼠压疮创面愈合的影响。方法:根据缺血再灌注损伤原理,采用 24 只 SD 大鼠建立压力性溃疡模型。然后使用随机数表将 24 只模型大鼠随机分为生理盐水组(NS)、PEG 组和 SBMA 组,每组 8 只。在去除伤口坏死组织后,分别用生理盐水、PEG 和 SBMA 水凝胶敷料处理伤口。在干预后 4、7、10 和 14 天,观察各组的伤口面积,在干预后 7 和 14 天观察组织结构和胶原沉积,并使用免疫组织化学方法观察 CD31、VEGF、Ki67 和 CK10 的表达。结果 SBMA 组各时间点的伤口愈合率均显著高于其他两组(均 P<0.05),PEG 组明显高于 NS 组(均

P0.05)。SBMA 组干预后 7 天 CD31 和 VEGF 的表达最高 (P0.05), 干预后 14 天下降。Ki67 在上皮组织中的表达逐渐增加, SBMA 组的表达增加最快, PEG 组次之, 最后是 NS 组。干预后 14 天, 三组出现了伤口上皮化, 与其他两组相比, SBMA 组最高。结论: 两性离子水凝胶敷料在促进压疮创面血管生成和再上皮化, 促进创面愈合方面具有一定优势。

Boonkaew B 等^[23]研究伤口感染和脓毒症对烧伤患者的影响, 制备了一种新型烧伤创面敷料, 其含有银纳米颗粒 (SNP), 用于治疗 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙烷磺酸钠盐 (AMPS- Na^+) 水凝胶中的感染。将硝酸银溶解在 AMPS Na^+ 溶液中, 然后暴露于伽马辐射以形成 SNP 注入的水凝胶。 γ 辐射导致无菌水凝胶敷料的交联聚合物网络, 并在一步过程中减少银离子以形成注入水凝胶中的 SNP。在模拟体液溶液中浸泡 72 h 后, 约 80% 的总银从水凝胶中释放; 因此, 它们可用于伤口长达 3 天。所有水凝胶均对正常人皮肤成纤维细胞无毒。载银水凝胶对铜绿假单胞菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有良好的抑制作用。对猪烧伤模型的初步研究结果表明, 5-mM 银水凝胶在防止伤口细菌定植方面是有效的, 其结果与市售银敷料 (ActicoatTM, Polymm silver[®]) 相当。

3.4 3D 生物打印方面的应用

3D 生物打印是以计算机三维设计模型为基础, 定制组织、器官和医疗辅具等生物医学产品的一个重要技术, 能够为各种疾病的精准治疗及器官发育及病变机制研究提供比动物实验更高效的研究手段, 故 3D 生物打印的材料须具有可打印性、良好的生物相容性、力学性能等, 水凝胶就是一种良好的 3D 生物打印的材料。

Jiang Y^[24]等设计了一种基于纤维素纳米纤维和凝胶的高强度水凝胶 (CNF/GEL), 用于 3D 打印。Jang T S^[25]等汇总了现有的水凝胶复合 3D 打印技术, 包括基于激光的 3D 打印、基于喷嘴的 3D 打印和基于喷墨打印机的 3D 打印系统, 并根据添加剂的类型, 讨论了四种主要的水凝胶复合体系: 聚合物或水凝胶复合材料、颗粒增强水凝胶复合物、纤维增强水凝胶复合体和各向异性填料增强水凝胶复合体。

3.5 角膜接触镜材料及其他领域的应用

角膜接触镜又名隐形眼镜, 常见的角膜接触镜材料, 如聚甲基丙烯酸甲酯, 佩戴不舒适、易脱落, 透气性差, 易引起角膜水肿。而水凝胶柔软, 近似生物

组织, 具有良好的生物相容性, 还可以保持长期植入人体的稳定性。当然, 水凝胶在医用美容材料、分析和医学诊断方面也有一定的研究与应用。

4 存在问题及展望

水凝胶因其具有良好的生物相容性、生物降解性和纳米复合性, 在医学领域受到广泛的关注, 在医药释放载体、组织填充材料、医用敷料等方面的研究取得了很大的进展, 但是目前多处于理论研究阶段, 研究具有一定的局限性, 距离产业化仍有很长的一段路要走, 尤其是水凝胶作为 3D 打印材料时, 如何制备出满足人体力学要求的、适应复杂的、精细的人体内环境的水凝胶支架仍是难题。因此, 只有不同领域的专家共同努力, 相互协作, 才能解决水凝胶在医学领域应用中遇到的难题, 早日让水凝胶更好的造福人类。

参考文献:

- [1] 刘畅. 疏水缔合水凝胶的交联结构与性能研究 [D]. 吉林大学, 2013.
- [2] Zhang H, Wu X, Qin Z, et al. Dual physically cross-linked carboxymethyl cellulose-based hydrogel with high stretchability and toughness as sensitive strain sensors[J]. Cellulose, 2020, 27(17).
- [3] Zhang Y, Song M, Diao Y, et al. Preparation and properties of polyacrylamide/polyvinyl alcohol physical double network hydrogel[J]. Rsc Advances, 2016, 6(113):112 468-112 476.
- [4] Sa, Liu, Dawei, et al. Quadruple hydrogen bonds and thermo-triggered hydrophobic interactions generate dynamic hydrogels to modulate transplanted cell retention.[J]. Biomaterials Science, 2019.
- [5] Liang, Yu, Yichang, et al. A two-phase segmented microfluidic technique for one-step continuous versatile preparation of zeolites-ScienceDirect[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 219(1):78-85.
- [6] Nagaoka N, Safrani A, Yoshida M, et al. Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels by radiation polymerization and cross-linking[J]. Macromolecules, 1993, 136(26):7 386-7 388.
- [7] Ikada Y, Mita T, Horii F, et al. Preparation of hydrogels by radiation technique[J]. Radiation Physics & Chemistry, 1977, 9(4-6):633-645.
- [8] Jennifer, H, Ward, et al. Preparation of controlled release systems by free-radical UV polymerizations in the presence of a drug[J]. Journal of Controlled Release, 2001.
- [9] Yza E, Hong C, Tza C, et al. Injectable hydrogels from enzyme-catalyzed crosslinking as BMSCs-laden scaffold for bone repair and regeneration[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 96:841-849.
- [10] Khan F, Aratsu F, Kobayashi S, et al. A simple strategy

- for robust preparation and characterisation of hydrogels derived from chitosan and amino functional monomers for biomedical applications[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6.
- [11] Shim W S , Kim J H , Park H , et al. Biodegradability and biocompatibility of a pH- and thermo-sensitive hydrogel formed from a sulfonamide-modified poly(ϵ -caprolactone-co-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone-co-lactide) block copolymer[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(30):5 178-5 185.
- [12] Yin L ,Zhao Z, Hu Y, et al. Polymer-protein interaction, water retention, and biocompatibility of a stimuli-sensitive superporous hydrogel containing interpenetrating polymer networks[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 108(2):1 238-1 248.
- [13] Shen X ,Tanaka K,Takamori A. Coronary Arteries Angiogenesis in Ischemic Myocardium: Biocompatibility and Biodegradability of Various Hydrogels[J]. *Artificial Organs*, 2010, 33(10).
- [14] Xiong Y Q,Xiao-Wei H E . Preparation of the Medical Composite Hydrogel Based on Collagen and its Properties[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2009.
- [15] Liu H, Wang C , Gao Q , et al. Facile fabrication of well-defined hydrogel beads with magnetic nanocomposite shells[J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(1-2):92-98.
- [16] Chiew C,Poh PE,Pasbakhsh P , et al. Physicochemical characterization of halloysite/alginate bionanocomposite hydrogel[J]. *Applied Clay Science*, 2014.
- [17] Zhanga Y, Jia Y.Finite Element Analysis of Controlled Drug Release Based on Biphasic Model of Hydrogel Carrier[J]. *Polymers and Polymer Composites*, 2012, 20(1-2):5-8.
- [18] Anirudhan T S ,Parvathy J ,Nair A S.A novel composite matrix based on polymeric micelle and hydrogel as a drug carrier for the controlled release of dual drugs[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136:1 118-1 127.
- [19] Parirokh M,Mirsoltani B,Raouf M, et al. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate[J]. *International Endodontic Journal*, 2015, 44(4):283-289.
- [20] Holland, Nery, M.J, 等 . The effect of the filling material in the tissue reactions following apical plugging of the root canal with dentin chips[C]// *Telemac-mascaret Users Conference*. 2012.
- [21] Mo J,Ge J, Chao M . The application of hydrophilic polyacrylamide gel as soft tissue filling agent in plastic surgery[J]. *JOURNAL OF PRACTICAL AESTHETIC AND PLASTIC SURGERY*, 2000.
- [22] Jiang S , Wu J , Wang X , et al. Application of zwitterionic hydrogel dressing in pressure ulcer wounds:an experimental study[J]. *Journal of Nursing Science*, 2018.
- [23] Boonkaew B, Barber P M, Rengpipat S,et al.Development and Characterization of a Novel, Antimicrobial,Sterile Hydrogel Dressing for Burn Wounds: Single-Step Production with Gamma Irradiation Creates Silver Nanoparticles and Radical Polymerization[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 103(10):3 244-3 253.
- [24] Jiang Y, Xv X, Liu D, et al. Preparation of Cellulose Nanofiber-reinforced Gelatin Hydrogel and Optimization for 3D Printing Applications[J]. 2018.
- [25] Jang T S , Jung HD, Pan HM , et al. 3D printing of hydrogel composite systems:Recent advances in technology for tissue engineering[J]. *国际生物打印期刊*, 2018, 4(1):28.

Research status of hydrogel in medical field

Wang Wei^{1,2}, Li Danjie^{1,2}, Li Fei^{1,2}, Xia Peibin^{1,2}, Wang Chaowei^{1,2}, Yu Liuyang^{1,2}, Yang Yajie^{1,2}, Cheng Jie^{1,2}, Cui Jingqiang^{1,2*}

- (1. Henan Key Laboratory of Medical Polymer Materials Technology and Application, Changyuan 453000, Henan, China;
2. Henan Tuoren Medical Instrument Research Institute Co. LTD., Changyuan 453000, Henan, China)

Abstract: Hydrogel is a three-dimensional network with high water content and high swelling properties. It has good biocompatibility and can simulate human tissue, making it an ideal biomaterial for tissue engineering. This article mainly introduces the application status of hydrogel in the medical field, aiming to provide reference for the research and product transformation of hydrogel in the medical field. Finally, the development of hydrogels in the medical field is prospected, and the future research directions are proposed.

Key words: hydrogel; medical field; preparation; application

(R-03)

