

СТВОРЕННЯ ГІДРОГЕЛІВ НА ОСНОВІ ПЕРОКСИХІТОЗАНУ З ПЕРВИННО-ТРЕТИННИМИ ПЕРОКСИДНИМИ ФРАГМЕНТАМИ ДЛЯ МЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

© Соломко Н.Ю., Дронь І.А., Будішевська О.Г., Воронов С.А., 2008

Полімераналогічними перетвореннями хітозану та трет-бутилпероксиметилового естеру бутендикарбонової кислоти одержано пероксихітозани з регульованою кількістю первинно-третинних пероксидних фрагментів. На їх основі одержано рН-залежні гідрогелі з антибактеріальними властивостями.

Polymeranalogical interaction of chitosan with tert-butylperoxymethyl ester of butendicarbon acid yields in peroxychitosanes with controlled quantity of primary-tertiary peroxide fragments. New pH-sensitive smart hydrogels with antibacterial properties were created on their basis.

Постановка проблеми. Особливо важливою проблемою в хімії медико-біологічних полімерів є створення полімерів з такими властивостями, які дали би змогу використовувати їх у різноманітних галузях медицини, як діагностичні препарати, лікарські препарати пролонгованої дії, полімери з фізіологічно-активними властивостями, засоби для захисту тканин від опромінення при лікуванні пухлин, для протиопікової терапії, для шовних та перев'язочних матеріалів [1].

Для вирішення цих завдань можуть бути використані полімерні матеріали, відомі як гідрогелі. Особливо перспективними є так звані “розумні” гідрогелі, які змінюють свій об'єм під впливом зміни зовнішніх умов – рН середовища, температури, опромінення, іонної сили тощо. Такі гідрогелі використовують як транспортні форми лікарських препаратів (ЛП), біологічно-активних речовин (БАР) та ферментів [2–4], наприклад, для прискорення лікування пошкоджень шкіряного покриву.

Оскільки такі препарати призначені для контакту з кров'ю, тканинами, шкірою, вони не повинні викликати токсичної, пірогенної, гемолітичної дії, а також виділяти мігруючі допоміжні хімічні речовини (молекули мономеру, зшиваючого агенту, розчинника, ініціатору тощо), вони повинні достатньо швидко біодеградувати або виводитись з організму, не створюючи при цьому токсичних продуктів.

Вищепереліченим вимогам відповідають такі природні та синтетичні полімери, як хітозан (Хіт) та полівіліпіролідон (ПВП). Увага до Хіт гідрогелів постійно зростає завдяки біосумісності, низькій токсичності, структурній подібності (аналогії) до природних глюкоаміногліканів, здатності на відміну від целюлози до деградабельності в організмі людини в присутності ферментів хітанази і лізоцину [5, 6]. Своєю чергою, ПВП – гемосумісний, має високу адсорбційну здатність і схильність до комплексоутворення. Він може сорбувати лікарські препарати, токсини, що використовується в лікарській практиці для пролонгованої дії ЛП та виведення токсинів із організму людини [7].

У зв'язку з цим, створення гідрогелів, які містили би фрагменти Хіт та ПВП для використання їх у медичних цілях, а саме, для лікування різних ушкоджень шкіряного покриву природи, є актуальним питанням сьогодення. При цьому важливо підібрати водорозчинні ініціатори, зшиваючі агенти і методи проведення тривимірної полімеризації для синтезу біосумісних, гемосумісних, біодеградабельних, антибактеріальних гелів, здатних абсорбувати та виділяти низькомолекулярні фізіологічно-активні речовини.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Гідрогелі, що використовують у медицині, одержані переважно на основі синтетичних полімерів – поліакриламід, N-віліпіролідону, гідроксиетилакрилату, поліакрилової кислоти та її кополімерів. Разом з тим, практично всі синтетичні полімери

не деструктують в фізіологічних умовах, що обмежує їх застосування як транспортних форм ЛП та імплантантів [8]. Тому останнім часом актуальним стає питання використання природних полімерів або їхніх кополімерів із синтетичними полімерами.

Мета роботи. Можна очікувати, що з введенням до структури Хіт пероксидних груп можна одержати новий тип похідних Хіт – реакційноздатні пероксидні хітозани. Такі біополімери будуть здатні прищеплюватися до планарних полімерних поверхонь, брати участь у конструюванні ковалентнозшитих полімерних каркасів гелів або виконувати роль реакційноздатних поліемулгаторів синтезу латексів. Тому актуальним було вирішення проблеми синтезу пероксидованого Хіт, вивчення його властивостей та можливостей застосування.

Метою роботи є одержання пероксидних хітозанів з регульованою кількістю первинно-третинних пероксидних фрагментів за допомогою полімераналогічних перетворень хітозану та трет-бутилпероксиметилового естеру бутендикарбонової кислоти та синтезувати на їх основі полімерний каркас рН-залежних гідрогелів.

Експериментальна частина. Синтез трет-бутилпероксиметилового естеру бутендикарбонової кислоти (ПМ) здійснювали ацилуванням трет-бутилпероксиметанола малеїновим ангідридом у присутності каталізатора піридину.

Кополімери хітозан-пр-полівінілпіролідон (Хіт-ПВП) для формування гідрогелів одержували прищепленою кополімеризацією вінілпіролідону (ВП) і солі хітозану та трет-бутилпероксиметилового естеру бутендикарбонової кислоти (Хіт-ПМ) у водних розчинах при 333 К. Концентрацію ВП варіювали в певних межах, концентрація Хіт у розчинах становила 1 %. Гідрогелі формували набуханням кополімерів Хіт-ПВП у воді.

Вимірювання ступеня набухання гідрогелів Хіт-ПВП проводили з використанням приладу Догадкіна за відомою методикою [9]. Ступень набухання визначали за рівнянням [10]:

$$a = \frac{(W_S - W_D)}{W_D}, \quad (1)$$

де a – абсорбція води плівкою Хіт-ПВП завтовшки 0,15±0,2 мм; W_D та W_S – вага зразка плівки – сухої і набухшої відповідно, г.

Ступень рівноважного набухання визначали за рівнянням [10]:

$$a_p = \frac{(W_E - W_D)}{W_D}, \quad (2)$$

де a_p – найбільша абсорбція води плівкою Хіт-ПВП (рівноважна); W_D та W_E – вага зразка плівки сухої і максимально набухлої відповідно, г.

Антибактеріальну активність гідрогелів Хіт-ПВП визначали на прикладі бактеріальної культури *Sarcina flava* та бацилярної культури *Bacillus cereus*. Аналізували вплив плівок гідрогелів на ріст та життєздатність клітин мікроорганізмів.

Вміст активного кисню $[O]_{\text{акт}}$ у пероксидному реагенті ПМ визначали газо-рідинною хроматографією (ГРХ) та ІЧ-спектроскопією.

Будову пероксидного реагенту ПМ підтверджували ІЧ-спектрами (зкомпенсованими) крапельних шарів ПМ у вазеліновій олії, що одержували за допомогою спектрофотометра “Specord-80M” в діапазоні 500–4000 cm^{-1} .

Аналіз ІЧ-спектрів проводився на основі таблиць характерних частот поглинання, наведених у роботі [11].

ГРХ пероксидного реагенту ПМ проводили на хроматографі Селміхром з колонками (3×3000) мм з абсорбентом *Unertan super* (фракція 0,125–0,16 мм), модифікованим 5 % *Carbowax 40 M*, швидкість потоку газу-носію (гелію) – 25 мл/хв при таких температурах: випарник 325 К, термостат колонок – 343 К, детектор – 393 К. Концентрації продуктів повного розкладу ПМ (пропанону та 2-метил-2-пропанолу) визначали методом внутрішнього стандарту. Як стандарт для кількісного визначення використовували хлороформ для ГРХ [12].

Рентгеноструктурні дослідження чистих Хіт та ПВП та їх кополімерів Хіт-ПВП різного складу досліджували методом ширококутового розсіювання рентгенівських променів з використанням рентгенівського дифрактометра ДРОН-4-07, рентенографічна схема якого виконана за методом Дебая–Шредера на проходження рентгенівських променів через дослідний зразок [13].

Результати та обговорення. Одним з перспективних напрямків створення нових біосумісних та біодеградабельних похідних Хіт є полімераналогічні перетворення макромолекул Хіт. Нові матеріали на основі Хіт, що містять в своєму складі первинно-третинні пероксидні фрагменти були одержані взаємодією Хіт з ПМ за схемою 1.

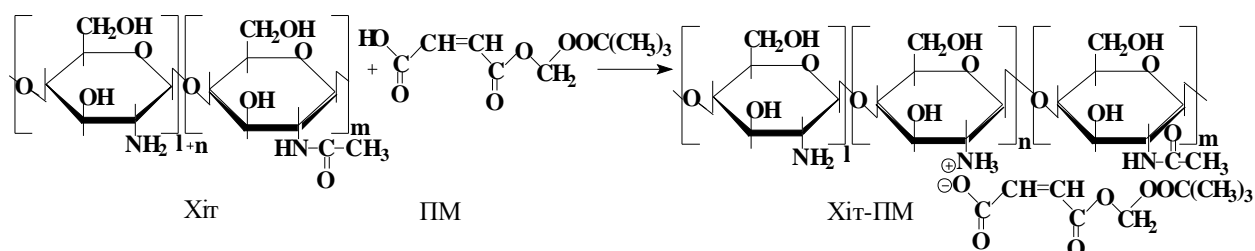


Схема 1. Одержання пероксидовмісного хітозану полімераналогічними перетвореннями

Синтез ПМ, який використовували як реагент при одержанні пероксихітозанів, здійснювали за схемою 2.

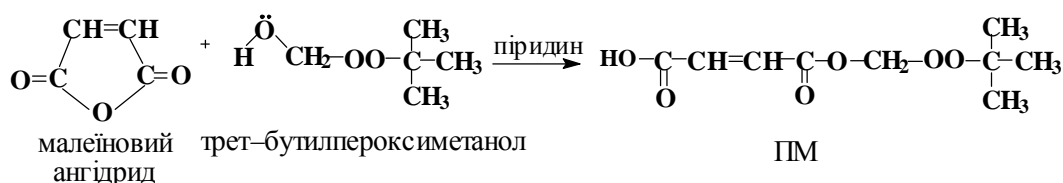


Схема 2. Ацилювання трет-бутилпероксиметанолу малеїновим ангідридом

Будову ПМ підтверджували ПМР-дослідженнями, ІЧ-спектроскопією, газо-рідинною та тонкошаровою хроматографією.

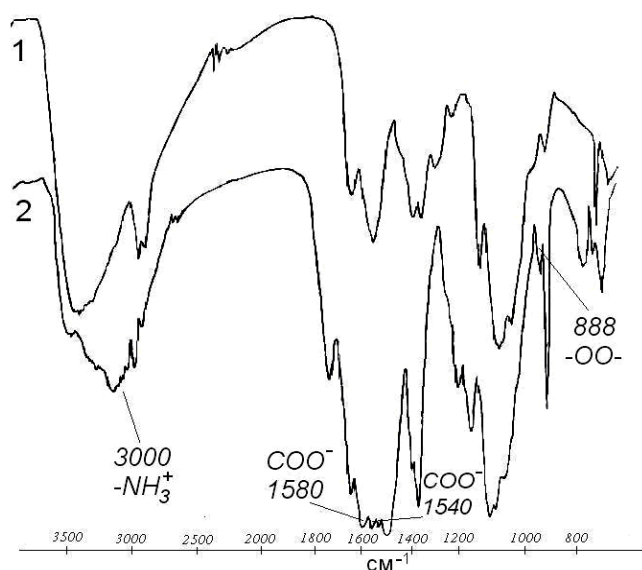


Рис. 1. ІЧ-спектри зразків Хіт (1) і Хіт-ПМ (2)

На ІЧ-спектрі (рис. 1) Хіт-ПМ порівняно із спектром вихідного Хіт спостерігається ряд відмінних смуг, що свідчить про утворення солевих зв'язків при взаємодії Хіт і ПМ. Смуги у спектрі Хіт-ПМ при 1580 та 1540 cm^{-1} характерні для карбоксилатної групи COO^- . В області 3000 cm^{-1} спостерігається розширення, що характерно для $-\text{NH}_3^+$ групи у конденсованому стані. Видно, що у спектрі Хіт-ПМ спостерігається розширення ліворуч і праворуч в області 3100 cm^{-1} , нова смуга поглинання при 3060 cm^{-1} свідчить про наявність групи $\text{C}=\text{C}$ із спряженим зв'язком. Смуга при 864 cm^{-1} , характерна для трет-бутоксильного замісника та смуга при 888 cm^{-1} , віднесена до поглинання $-\text{OO}-$ групи, що підтверджує присутність пероксидного фрагмента.

Аналіз ширококутових рентгенівських дифрактограм показав, що структура прищепленого Хіт-ПВП суттєво відрізняється від структури гомополімерів Хіт та ПВП. На дифрактограмах Хіт спостерігаються дифракційні максимуми, які відповідають кутам $2\theta_m=17,2^\circ, 19,8^\circ, 21,8^\circ$ та $9,5^\circ$ (рис. 2); при цьому ступень кристалічності Хіт становить 67 %, а розмір кристалітів $L=5,5$ нм. Гомополімер ПВП є аморфним, про що свідчать дифракційні максимуми дифузійного характеру при $2\theta_m=10,6^\circ$ та $20,9^\circ$.

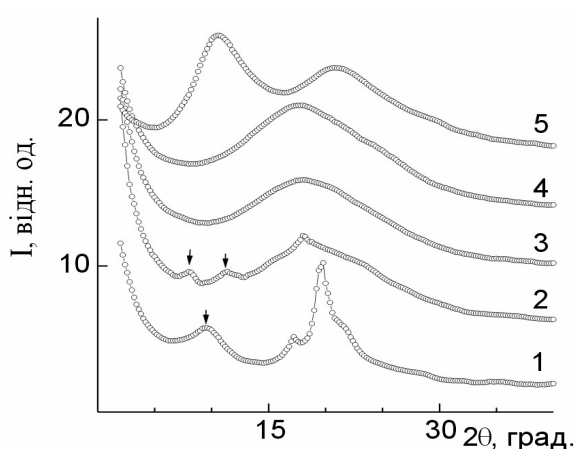


Рис. 2. Ширококутові рентгенівські дифрактограми Хіт (1), ПВП (5) та кополімерів Хіт-ПВП (50/50) (2), Хіт-ПВП (25/75) (3), Хіт-ПВП (7/93) (4)

Зменшення частки Хіт у складі Хіт-ПВП сприяє зменшенню кристалічності, про що свідчить наявність одного дифракційного максимуму дифузійного типу. Разом з тим, дифрактограми свідчать про наявність ближнього трансляційного порядку в Хіт-ПВП порівняно з ПВП, який, очевидно, зумовлений міжмолекулярною взаємодією за рахунок водневих зв'язків і формуванням абсолютно нового за природою полімеру.

Характеристики одержаних пероксиднохітозанів з первинно-третинними пероксидними фрагментами наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика пероксидованого хітозану Хіт-ПМ

Зразок	Склад Хіт-ПМ		Вміст N, мас. %		Вміст $-\text{OO}-$, мас. %		Мол. маса
	Хіт, мас. %	ПМ, мас. %	Обчислено	Знайдено	Обчислено	Знайдено	
Хіт	100	–	8,19	7,4	–	–	32300
Хіт-ПМ-2	80,2	19,8	6,36	5,9	1,45	1,3	40300
Хіт-ПМ-1	67	33	5,32	5,0	2,41	2,2	48200

Дослідження продуктів термічного розкладу ПМ за допомогою хроматографічного аналізу, ІЧ-спектроскопії та функціонального аналізу дозволило запропонувати схему розкладу ПМ за схемою 3.

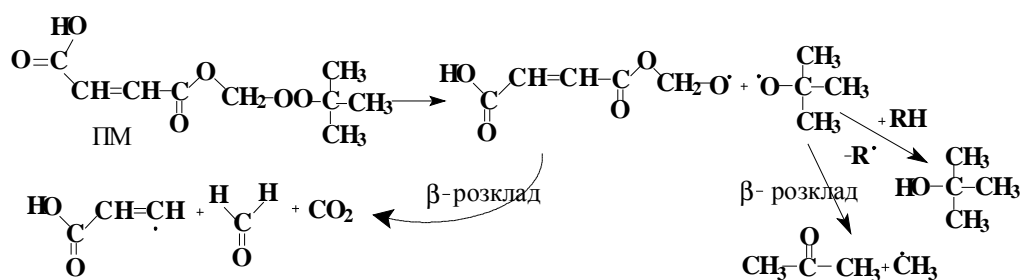


Схема 3. Схема розкладу ПМ

Отже, вперше одержані пероксихітозани з первинно-третинними пероксидним групами, які можуть бути використанні як прекурсори при створенні гідрогелів та як модифікатори полімерних поверхонь.

Введення до структури Хіт пероксидних груп дало змогу одержати водорозчинні реакційно-здатні похідні з властивостями ініціатора, що надає можливість конструювати ковалентнозшиті полімерні каркаси гідрогелів. Пероксидний реагент ПМ використаний як модифікатор, який надає Хіт водорозчинності і властивостей ініціатора, а також може виступати як зшиваючий агент. При цьому, для ковалентного зшивання каркаса геля не використовували зшиваючі агенти, які можуть викликати токсичну та алергічну дію на людський організм, що обмежує використання таких гідрогелів у медицині [14].

Пероксихітозани з первинно-третинними пероксидними групами як макроініціатори для одержання рН-залежних гідрогелів. Прищепленою кополімеризацією ВП та пероксидованого Хіт отримані прищеплені блок-кополімери, які здатні формувати рН-залежні гідрогелі. Процес синтезу прищеплених кополімерів Хіт-ПВП і формування полімерного каркаса гідрогелів ініціюють радикали, що утворюються в результаті термічного розпаду первинно-третинних пероксидних груп у складі Хіт-ПМ. При цьому не відбувається деструкція макромолекул Хіт на відміну від дії пероксодисульфатів лужних металів [15, 16]. Для прищеплених кополімерів Хіт-ПВП характерне обмежене набухання у водних розчинах. Очевидно, що структура полімерної матриці гідрогелів Хіт-ПВП представляє собою полімерну сітку, ланцюги якої зшиті ковалентними зв'язками.

Кополімери Хіт-ПВП, одержані у вигляді плівки висушуванням кінцевої реакційної суміші утворюють гідрогелі при набуханні у водних розчинах. Очевидно, що вміст основних аміногруп у ланцюгах Хіт і кількість прищеплених ланцюгів ПВП визначатиме конформацію макроланцюгів кополімеру у розчині та здатність його до іонізації. Кількість ініціюючих фрагментів ПМ впливатиме на структуру полімерної сітки, ступінь прищеплення ланцюгів ПВП, що визначає її здатність до набухання. Тому було досліджено вплив співвідношення ВП, Хіт та ПМ на здатність до набухання одержаних кополімерів Хіт-ПВП.

Здатність до набухання характеризується ступенем набухання α , який визначали за рівнянням (1). Кінетичні криві набухання зразків кополімерів Хіт-ПВП мають типовий характер з високою швидкістю набухання на початковій стадії та наступним повільним набуханням до значення рівноважного ступеня набухання (рис. 3). При цьому швидкість набухання і величина рівноважного набухання α_p Хіт-ПВП, розрахована за рівнянням (2), зростає при зменшенні рН, що характерно для гідрогелів з основними функціональними групами.

Встановлено також, що рівноважний ступінь набухання α_p Хіт-ПВП зростає симбатно концентрації ініціатора (фрагмента ПМ) у реакційній суміші під час прищепленої кополімеризації, що пов'язано із зростанням ступеня прищеплення гідрофільних ланцюгів ПВП (табл. 2).

Ступінь іонізації основних аміногруп у складі ланок Хіт залежить від рН середовища. При зростанні іонізації (рН<5,5–6) відбувається набухання внаслідок електростатичного відштовхування однойменно заряджених ланок Хіт і “розпираючого” осмотичного тиску протиіонів. У неіонізованому стані або за невисокого ступеня іонізації кополімер Хіт-ПВП знаходиться у стані колапсу.

При зростанні рН водного середовища (рис. 4) до значень 5,5–6 рівноважне набування різко зменшується, при цьому гідрогелі близькі до стану “колапсу”. рН колапсу залежить від складу кополімеру. Збільшення вмісту Хіт призводить до зміщення рН колапсу в бік менших значень рН, що зумовлено більшим вмістом основних аміногруп у кополімері.

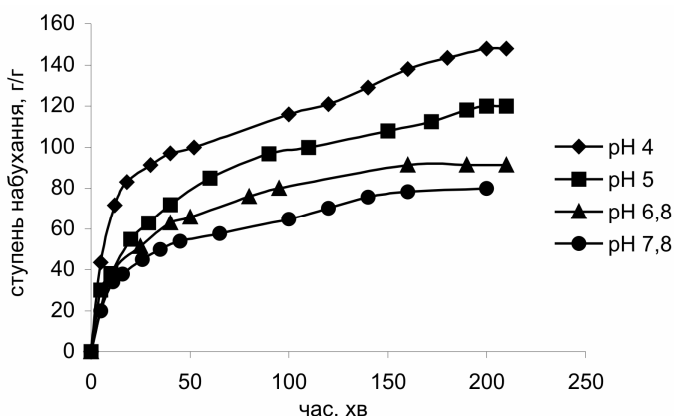


Рис. 3. Типові кінетичні криві набування кополімерів Хіт-ПВП у водному розчині при різних рН. Склад кополімеру: ПВП – 91 %, Хіт – 9%. Умови кополімеризації: Хіт – $6,2 \cdot 10^{-2}$ кмоль/м³, ВП – $11,9 \cdot 10^{-1}$ кмоль/м³, при ініціюванні ПМ – $30,0 \cdot 10^{-4}$ кмоль/м³

Таблиця 2

Залежність рівноважного ступеня набування від рН середовища та складу кополімеру Хіт-ПВП, одержаного прищепленою кополімеризацією Хіт ($0,062$ кмоль/м³) та ВП при ініціюванні ПМ

Концентрація кмоль/м ³		Склад кополімеру, % мольн		Рівноважний ступінь набування			
ВП·10 ⁻¹	ПМ·10 ⁻⁴	Хіт	ПВП	рН 4,0	рН 5,5	рН 7,0	рН 8,0
11,9	3,3	17	83	105	38	16	8
11,9	10,0	16	84	110	50	21	16
11,9	20,0	10	90	115	70	36	35
11,9	30,0	9	91	148	123	90	80
6,0	30,0	24	76	115	–	84	–
2,5	30,0	52	48	111	–	–	–

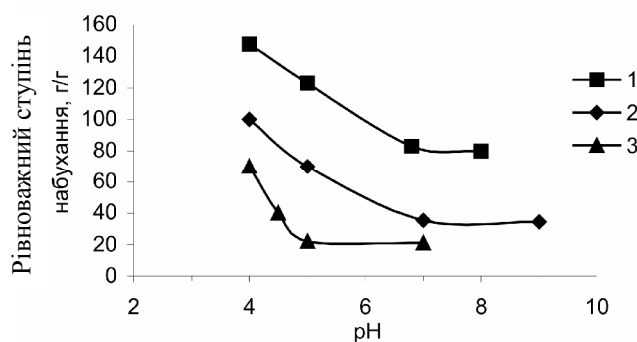


Рис. 4. Залежність рівноважних значень ступеня набування кополімерів Хіт-ПВП від рН середовища:
 1 – вміст ПВП – 91 %, Хіт – 9 %, ПМ під час синтезу $30,0 \cdot 10^{-4}$ кмоль/м³;
 2 – вміст ПВП – 89 %, Хіт – 11 %, ПМ під час синтезу $20,0 \cdot 10^{-4}$ кмоль/м³;
 3 – вміст ПВП – 85%, Хіт – 15%, ПМ під час синтезу $10,0 \cdot 10^{-4}$ кмоль/м³

Мікробіологічні дослідження антибактеріальних властивостей гідрогелів на основі Хіт-ПВП показали, що вони пригнічують ріст клітин бактеріальної культури *Sarcina flava* та бациллярної культури *Bacillus cereus*.

Висновки. Синтезовано гідрогелі на основі Хіт та ВП, які можуть бути використані для контрольованого транспорту ЛП за механізмом зворотного зв'язку. Показано можливість регулювання швидкості набухання, рівноважного ступеня набухання і рН колапсу варіюванням природи кополімеру Хіт-ПВП, а саме співвідношення полімеру Хіт, мономеру ВП та пероксидного реагенту ПМ. Крім цього, створені гідрогелі – рН-залежні, що розширює можливість контролювання швидкості вивільнення попередньо іміобілізованих БАР за допомогою зміни величин рН зовнішнього середовища. Отримані гідрогелі можуть бути використані для лікування ран та патологій, що супроводжуються зміною рН.

1. Пат. (19)RU(11)2254145(13)C1. Раневое покрытие на основе коллаген-хитозанового комплекса / И.Н. Большаков, Н.С. Горбунов, Е.С. Шамова (RU): ГОУ ВПО КРАСГМА МИНЗДРАВА РОССИИ. – № 2003130390/15; Заявл. 14.10.2003; Опубликовано. 20.06.2005. – 8 с. 2. Rohindra D.R., Nand A.V., Khurta J.R. Swelling properties of chitosan hydrogels // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2003. – Vol. 10. – P. 153–157. 3. Mincheva R., Manolova N., Sabov R., Kjurchiev G., Rashkov I. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethylene glycol) diacid as bone regeneration materials // *e-Polymers.* – 2004. – № 058. – P. 1–11. 4. Лопатин В.В., Аскадский А.А. Полиакриламидные гидрогели в медицине. – М.: Науч. мир, 2004. – 264 с. 5. Shantha KL, Harding DR. Preparation and in-vitro evaluation of poly [N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymers pH-responsive hydrogels for oral drug delivery // *Int J Pharm.* – 2000. Oct 10. – Vol. 207. № 1–2. – P. 65–70. 6. Конкурс Русских Инноваций. Сертификация и организация производства имплантатов на основе природных биополимеров (офтальмология и стоматология). – 2001 – 2006. 7. Сидельковская Ф.П.. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. – М.: Наука. – 1970. – 150 с. 8. Пат. (19)RU(11)2207882(13). Измельченные полимерные гидрогели для исключения образования спаек и способы их получения / Уоллэйс Д.Г., Рейч К.Дж. (US): Фьюжен Медикал Текнолоджиз, ИНК. (US). – № 99106523/14; Заявл. 14.08.1997; Опубликовано. 10.07.2003; НКИ 08/903,674. – 26 с. 9. Лаврова И.С. Практикум по коллоидной химии. – М.: Высшая школа. – 1983. – 216 с. 10. Gupta K.C., Ravi Kumar M.N.V. Drug release behavior of beads and microgranules of chitosan // *Biomaterials.* – 2000. – Vol. 21. – P. 1115–1119. 11. Казыцына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК, ЯМР-спектроскопии в органической химии. – М.: Высш. шк., 1971. – 264 с. 12. Микушиа О. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. – М.: Мир, 1982. – 381 с. 13. Kratky O., Pilz I., Schmitz P.J. Absolute intensity measurement of small-angle x-ray scattering by means of a standard sample // *J. Colloid Interface Sci.* – 1966. – Vol. 21. – N 1. – P. 24–34. 14. Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A., Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 2004. – Vol. 57. – P. 19–34. 15. Chih-Chang Hsu, Trong-Ming Don, Wen-Yen Chin. Synthesis of Chitosan-Modified Poly(methyl methacrylate) by Emulsion Polymerization // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2002. – Vol. 86. – P. 3047–3056. 16. Sangamesh G. Kumbar, Kumaresh S. Soppimath, Tejjaj M. Aminabhavi. Synthesis and Characterization of Polyacrylamide-Grafted Chitosan Hydrogel Microspheres for the Controlled Release of Indomethacin // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2003. – Vol. 87. – P. 1525–1536.