

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОДЕГРАДАЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО БЛОК-КОПОЛІУРЕТАНУ З АМІЗОНОМ *IN VITRO*

Проведені фізико-механічні та ІЧ-спектроскопічні дослідження показали, що для блок-кополіуретану з фрагментами кополімеру ВП-ВС та іммобілізованим лікарським препаратом амізоном характерний повільний перебіг біодеградації в буферних розчинах протеолітичних ферментів і біологічному середовищі 199 протягом одного року експозиції. Зазначені полімери можуть бути характеризовані як біостабільні.

Ключові слова: біодеградація, блок-кополіуретани, амізон, кополімер N-вінілпіролідону, іммобілізація.

Вступ

Здатність до біодеградації – одна з найважливіших характеристик полімерів медичного призначення. Особливої важливості дослідження цього процесу набуває при створенні біологічно активних полімерних матеріалів для використання як імплантатів. Вивчення перебігу біодеградації в умовах, які імітують середовище організму, – один із необхідних етапів при розробці імплантаційних матеріалів [1], адже інтенсивність процесу може залежати не тільки від будови полімерного носія, наявності біологічно активних речовин в його складі, а й від впливу біологічних систем організму. Отримані результати *in vitro* в комбінації з результатами дослідів на експериментальних тваринах дадуть змогу спрогнозувати поведінку полімерних матеріалів при їх подальшому застосуванні як імплантатів.

Отже, мета представленої роботи полягала в дослідженні перебігу процесу біодеградації біологічно активного блок-кополіуретану, що містить в своєму складі кополімер N-вінілпіролідону з вініловим спиртом (ВП-ВС) та лікарський препарат амізон, іммобілізований за рахунок фізичних та хімічної взаємодій.

Експериментальна частина

Матеріали

Макродіізоціанат (МДІ), блок-кополіуретани з фрагментами кополімеру N-вінілпіролідону з вініловим спиртом (ВПУ) та біологічно активний полімерний матеріал на їх основі з амізоном (ВПУ-АМ), синтезовано відповідно з [2–4].

Об'єкти дослідження – зразки у МДІ, ВПУ, ВПУ-АМ у вигляді плівок.

Як модельні середовища застосовано біологічне середовище 199 (БС 199) і буферний

0,01 %-й розчин хімотрипсину в 0,1 М розчині Na_2HPO_4 та KH_2PO_4 (рН = 8,1).

Біологічне середовище 199 імітує плазму крові, яка являє собою складну суміш білків, амінокислот, вуглеводів, жирів, солей, гормонів, ферментів антитіл і розчинних газів (рН = 7,4). Основними компонентами плазми є вода (90–92 %) та білки (7–8 %), концентрація глюкози становить 0,1 % і солі 0,9 % [5].

Методи

Біодеградацію зразків блок-кополіуретанів із фрагментами кополімеру N-вінілпіролідону й вінілового спирту та іммобілізованим амізоном оцінювали за зміною фізико-механічних показників та з використанням ІЧ-спектроскопічних досліджень. Фізико-механічні випробування проводили за ГОСТ 14236 на модернізованій машині 2166 Р-5 зі швидкістю розширення захватів 50 ± 10 мм/с і швидкістю фіксації результатів 0,01 с.

Результати фізико-механічних випробувань після перебування в модельних середовищах протягом різних термінів інкубації (7, 14, 30, 90 та 80 діб) наведені на рис. 1, 2.

ІЧ-спектри записували на ІЧ-спектрометрі з Фур'є перетворенням «Tensor-37» в ділянці $650\text{--}4000$ cm^{-1} методом багаторазового порушеного повного внутрішнього відображення із використанням призми-трапеції з KRS-5, число відображень $N = 4$, кут падіння $\varphi = 45^\circ$ на просвіт тонких плівок і таблеток порошків з КВг. Віднесення смуг поглинання зроблено відповідно до [6–11].

Результати та обговорення

Установлено, що зразок ВПУ (без амізону) біодеградує після 7 діб перебування в БС 199. Спостерігається збільшення міцності при розри-

ві в 3 рази ($\sigma = 6,27$ МПа) і зменшення відносно-го подовження в 19 разів ($\varepsilon = 8$ %).

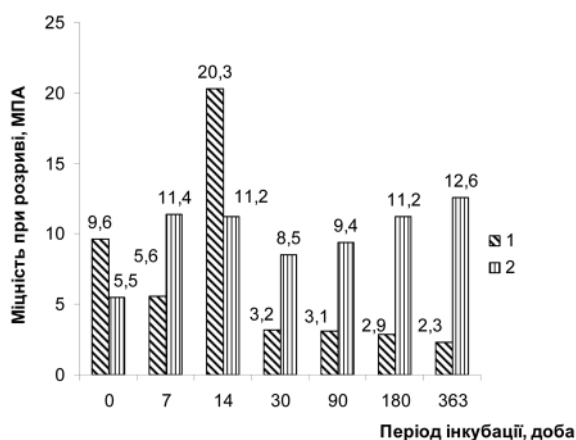


Рис. 1. Біодеградація БПУ з іммобілізованим амізоном в БС 199: 1 – МДІ, 2 – БПУ-АМ

Порівнюючи результати фізико-механічних досліджень (рис. 1), можна зазначити, що найсильнішу гідролітичну дію щодо МДІ чинить біологічне середовище 199, при інкубації в якому протягом 1 місяця показник міцності при розриві зменшується в 3 рази, а після інкубації протягом року показник міцності при розриві зменшився в 4,2 рази (рис. 1).

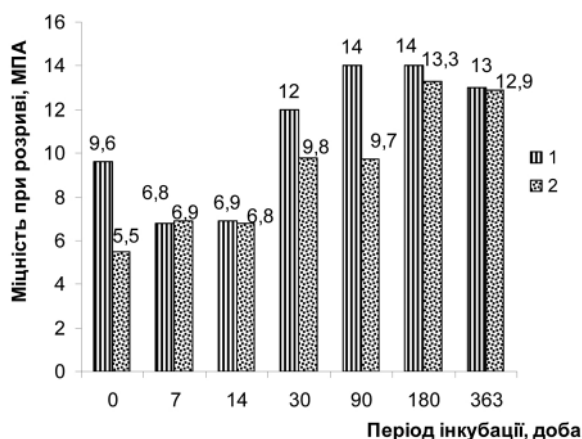


Рис. 2. Біодеградація БПУ з іммобілізованим амізоном під впливом буферного розчину хімотрипсину: 1 – МДІ, 2 – БПУ-АМ

Причому, на 14 добу дослідження спостерігається збільшення міцності МДІ при розриві майже в 2,1 рази. Експозиція зразка МДІ в хімотрипсині протягом року призводить до збільшення показника міцності при розриві в 1,3 рази, а показник відносного подовження зменшився в 1,3 рази (рис. 2). Отримані результати знаходять своє підтвердження у праці Т. Е. Ліпатової та

Г. О. Пхакадзе [1], де показано, що розчини протеолітичних ферментів мають деякий інгібувальний вплив на руйнування полімеру (КЛ-3), що пов'язане зі специфічною взаємодією молекули ферменту з уретановою групою, яка за будовою схожа з пептидною групою білкової молекули. Тобто, внаслідок високої субстратної специфічності ферменту така взаємодія призводить до екранування уретанової групи.

Враховуючи те, що БС 199 є складною багатоконпонентною біологічною системою, збільшення міцності МДІ при розриві на 14 добу також можна пояснити специфічною взаємодією молекули ферменту з уретановою групою макродізоціанату.

У полімерного матеріалу на основі блок-кополіуретану, який містить фрагменти ВП-ВС з іммобілізованим амізоном (БПУ-АМ) спостерігається збільшення показників міцності при розриві в 2 рази (14 днів інкубації) після експозиції у БС, у 1,8 разів (30 днів інкубації) та 2,4 рази (180 днів інкубації) у буферному розчині хімотрипсину. Після перебування БПУ-АМ як у буферному розчині хімотрипсину, так і в БС 199 протягом року показник його міцності при розриві збільшився в 2 рази.

Отже, синтезований біологічно активний полімерний матеріал з амізоном можна схарактеризувати як біостабільний, свідченням чого є збереження високих фізико-механічних показників і деяке їх підвищення протягом 1 року експозиції.

На зміни механічних показників отриманого полімерного матеріалу з амізоном після перебування в модельних середовищах, на наш погляд, впливають багато чинників: наявність в структурі полімеру третинного азоту N-вінілпіролідону, який бере участь у комплексоутворенні [12], іонних центрів молекул амізону (піридиній йодид), а також наявність протеолітичних ферментів, здатних брати участь в утворенні субстратноспецифічного комплексу. Молекула хімотрипсину складається з трьох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних між собою двома міжланцюговими дисульфідними містками. Між поліпептидними ланцюгами утворюються чисельні водневі зв'язки. Активність хімотрипсину визначається високою реакційною здатністю $-\text{CH}_2-\text{OH}$ -групи серину-195, карбоксильної групи бічного ланцюга аспартату-102 та імідазольної групи гістидину-57 [13]. Зазначені активні групи можуть відігравати значну роль в утворенні просторової сітки міжмолекулярних водневих зв'язків. Доказом утворення в системі катіонних груп [14] є зміни в ділянці $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$ валентних ν_{CH} (рис. 3, 5).

ІЧ-спектроскопічні дослідження зразків БПУ з іммобілізованим амізоном до та після експози-

ції в модельних середовищах показали відсутність істотних змін хімічної структури. Спостерігаються зміни в ділянках валентних коливань, чутливих до водневих зв'язків (ВЗ) (рис. 3–6).

Враховуючи те, що макромолекули полімерного матеріалу з амізоном містять різні групи акцепторів протонів, такі як кисень етерного та естерного зв'язку, карбонільні групи і бензолні кільця, то можна говорити про утворення водневих зв'язків (ВЗ) різних типів і різної енергії. В ІЧ-спектрах (крива 1, рис. 4, 5) це супроводжується розширенням контуру смуги поглинання в ділянці $3200\text{--}3500\text{ см}^{-1}$, яка характеризує валентні коливання зв'язаних і вільних NH-груп. Після перебування зразків БПУ-АМ у модельних середовищах на високочастотному боці смуги валентних коливань NH-груп, зв'язаних ВЗ (3290 см^{-1}), з'являється плече 3450 см^{-1} валентних коливань, вільних від ВЗ аміногруп (криві 3, 4, рис. 3, 5), а на низькочастотній стороні – плече при 3180 см^{-1} , яке характеризує валентні коливання аміногруп в асоціатах. При цьому смуга валентних коливань NH-груп має чіткий максимум при 3290 см^{-1} (крива 4, рис. 3) і 3284 см^{-1} (крива 4, рис. 5) і меншу півширину, ніж у контрольного зразка (крива 1) – $\Delta_{1/2} = 130, 150$ і 180 см^{-1} відповідно, що вказує на перерозподіл ВЗ та утворення досконалішої сітки фізичних взаємодій.

Зі збільшенням часу перебування БПУ-АМ як в БС 199, так і в розчині хімотрипсину спостерігається підвищення інтенсивності плеча 1710 см^{-1} , яке відповідає валентним коливанням самоасоційованих карбонілів ($\nu_{\text{C=O ac}}$) (рис. 4, 6), що свідчить про збільшення концентрації уретанових груп, зв'язаних в асоціати, зі збільшенням періоду інкубації. Такий перерозподіл системи

водневих зв'язків може відбуватись через вивільнення амізону та появу вільних від водневих зв'язків акцепторів і донорів протонів уретанових фрагментів, здатних утворювати асоціати. При цьому чітко видно звуження смуги коливань NH-груп та зміщення смуги 3290 см^{-1} до 3283 см^{-1} ($\nu_{\text{NH-зв'яз.}}$) (криві 3, 4, рис. 3) та 3284 см^{-1} (криві 3, 4, рис. 5), що також вказує на перерозподіл ВЗ та утворення досконалішої фізичної сітки в доменах.

Отже, результати фізико-механічних і фізико-хімічних досліджень біологічно активного матеріалу на основі блок-кополіуретану з фрагментами ВП-ВС в умовах *in vitro* показали, що при експозиції досліджуваного матеріалу в модельних середовищах має місце руйнування сітки йон-молекулярних зв'язків переважно між NH-групою уретанового фрагмента поліуретану та аніоном йоду амізону з утворенням більш досконалої сітки ВЗ за рахунок самоасоціації уретанових груп поліуретану.

Також можливе комплексоутворення між третинним атомом азоту вінілпіролідону та активними центрами ферментативних систем і частковим перерозподілом водневих зв'язків, що призводить до розриву міжланцюгових зв'язків і збільшення впорядкованості в жорстких доменах, зменшення їх дефектності.

Таким чином, проведені ІЧ-спектроскопічні дослідження показали, що зростання фізико-механічних показників для блок-кополіуретанів з іммобілізованим амізоном при їх інкубації в БС 199 і буферному розчині хімотрипсину відбувається за рахунок реорганізації сітки існуючих водневих зв'язків і виникнення нової сітки міжмолекулярних водневих взаємодій, зумовлених йон-йонними та йон-молекулярними

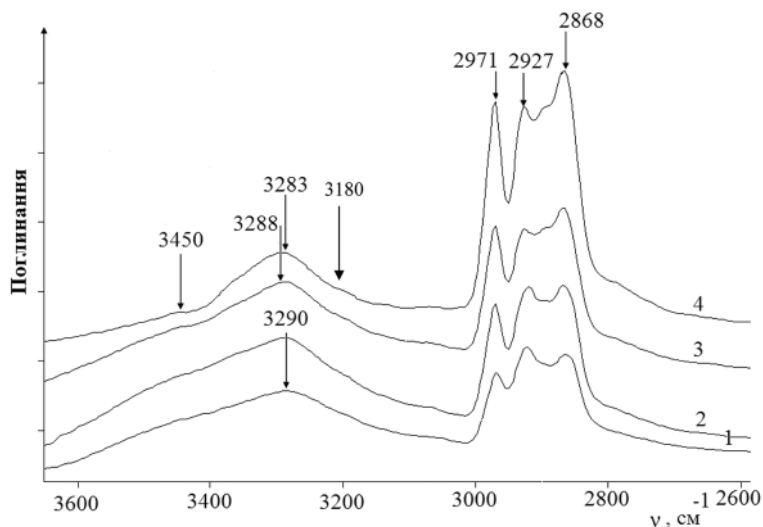


Рис. 3. Фрагменти ІЧ-спектрів полімерного матеріалу з амізоном після перебування в середовищі 199: 1 – контроль, 2 – 2 тижні, 3 – 1 місяць, 4 – 6 місяців

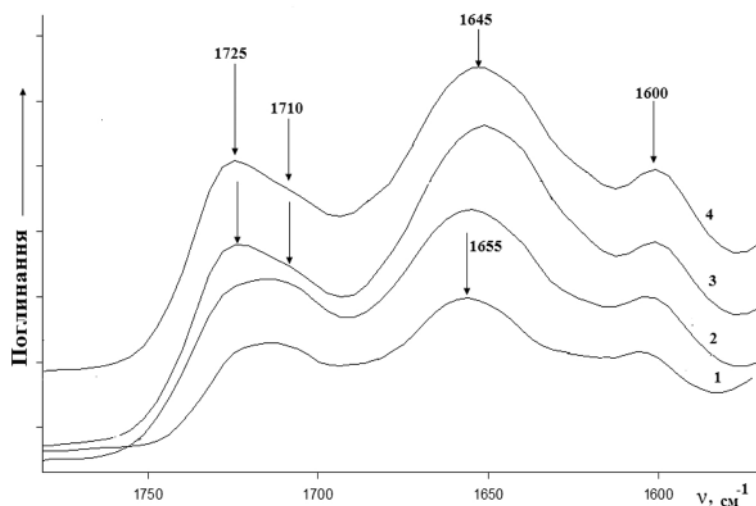


Рис. 4. Фрагменти ІЧ-спектрів полімерного матеріалу з амізеном після перебування в середовищі 199: 1 – контроль, 2 – 2 тижні, 3 – 1 місяць, 4 – 6 місяців

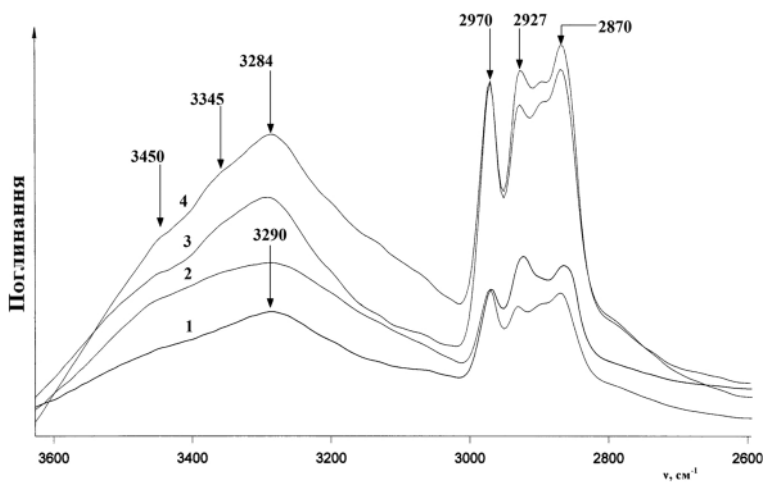


Рис. 5. Фрагменти ІЧ-спектрів полімерного матеріалу з амізеном після перебування в буферному розчині хімотрипсину: 1 – контроль, 2 – 2 тижні, 3 – 1 місяць, 4 – 6 місяців

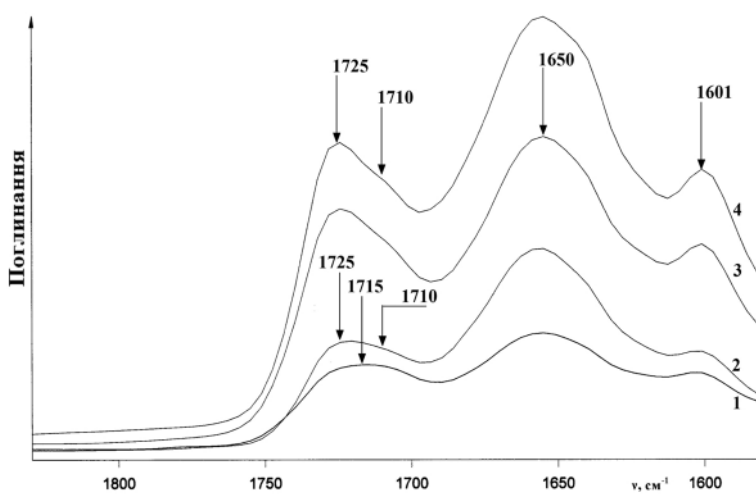


Рис. 6. Фрагменти ІЧ-спектрів полімерного матеріалу з амізеном після перебування в буферному розчині хімотрипсину: 1 – контроль, 2 – 2 тижні, 3 – 1 місяць, 4 – 6 місяців

взаємодіями [15] за участю галоїд аніону йоду амізону (I⁻) та протонами уретанової групи [16]. Для досліджуваного біологічно активного блок-кополіуретану з амізоном характерний по-

вільний перебіг біодеградації в модельних середовищах протягом одного року експозиції. Зазначений полімерний матеріал може бути схарактеризований як біостабільний.

- [1] Липатова Т. Э. Полимеры в эндопротезировании / Т. Липатова, Г. Пхакадзе – К. : Наук. думка, 1983. – 160, [11– 12] с.
- [2] Мазур Л. М. Синтез гідрофільних поліуретанів, які містять фрагменти кополімеру N-вінілпіролідону з вініловим спиртом / Л. М. Мазур, Р. А. Рожнова, В. І. Дроздова, Н. А. Галатенко // Доповіді НАНУ. – 2005. – № 10. – С. 138–141.
- [3] Мазур Л. М. Синтез нової полімерної лікарської форми / Л. М. Мазур, Р. А. Рожнова, В. І. Дроздова, Н. А. Галатенко // Доповіді НАНУ. – 2006. – № 7. – С. 152–156.
- [4] Мазур Л. М. Синтез нової лікарської форми з амізоном на основі гідрофільного блок-кополіуретану, який містить кополімер N-вінілпіролідону з вініловим спиртом / Л. М. Мазур, Р. А. Рожнова, В. І. Дроздова, Н. А. Галатенко // Полімерний журнал. – 2007. – Т. 29. – № 1. – С. 58–66.
- [5] Вилли К. Биология / К. Вилли – М. : Мир, 1962 – 685, [266] с.
- [6] Тарутин Л. И. Спектральный анализ полимеров / Л. И. Тарутин, Ф. О. Позднякова. – Л. : Химия, 1986. – 248 с. [6– 10] с.
- [7] Купцов А. Х. Фурье – КР и Фурье – ИК спектры полимеров / А. Х. Купцов, Г. Н. Жижин. – М. : Физматлит, 2001. – 656 с.
- [8] Семенович Г. М. Справочник по физической химии полимеров. ИК и ЯМР спектроскопия полимеров. В 3-х томах / Г. М. Семенович, Т. С. Храмова. – К. : Наукова думка, 1985. – Т. 3. – 588, [210] с.
- [9] Збинден Р. Инфракрасная спектроскопия высокополимеров / Р. Збинден. – М. : Химия, 1977. – 150 с.
- [10] Преч Э. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных / Э. Преч, Ф. Бюльманн, К. Аффельтер ; пер. с англ. – М. : Мир, 2006. – 438 с.
- [11] Brosse C. Synthèse de polyurethanes utilisables pour des techniques de microencapsulation – I. Modification chimique d'alcool polyvinylique par des isocyanates d'alkyle / C. Brosse, El. Hamdaour, J.-C. Soutif [et al.] // Europerean Polymer Journal. – 1995. – Vol. 31, № 5. – P. 425–429.
- [12] Суберляк О. В. Гідрогелі на основі структурованих кополімерів полівінілпіролідону як носії пролонгованого вивільнення лікарських засобів / О. В. Суберляк, Т. А. Грошовой, В. Й. Скорохода [та ін.] // Вісник Фармації. – 2001. – № 3. – С. 71–71.
- [13] Кретович В. Л. Введение в энзимологию / В. Л. Кретович. – М. : Наука, 1986. – 336, [158–159] с.
- [14] Храновский В. А. Межмолекулярные взаимодействия в олигоуретанах с ионогенными группами различной химической природы аниона / В. А. Храновский, Ю. С. Липатов, А. Ф. Маслюк // Доклады АН СССР. – 1985. – Т. 285, № 2. – С. 406–410.
- [15] Вагулев В. Н. Инфракрасные спектры и структура полиуретанов / В. Н. Вагулев, С. В. Лаптий, Ю. Ю. Керча. – К. : Наукова думка, 1987. – 187, [167] с.
- [16] Рожнова Р. А. Синтез та властивості нових біоактивних матеріалів пролонгованої дії на основі біодеградабельних поліуретанів : автореф. дис. на здоб. наук. ступеня доктора . хім. наук : спец. 02.00.10 «Біоорганічна хімія» – К., 2008. – 38 с.

R. Rozhnova, S. Ostapenko, N. Galatenko

INVESTIGATION OF BIODEGRADATION OF BIOLOGICAL ACTIVE BLOCK-COPOLYURETHANE WITH AMISON IN VITRO

Conducted physical-mechanical and IR-spectroscopy investigations are shown, that for block-copolyurethane with VP-VS copolymer fragments and immobilized drug amison it is typical slow the passing of biodegradation in buffer solutions proteolytic enzymes and biological medium 199 during one year exposition. These polymers should be characterized as biostable.

Keywords: biodegradation, block-copolyurethan, amison, copolymer N-vinylpyrrolidone, immobilization.