

СИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ПОЛІУРЕТАНСЕЧОВИН ІЗ ФОЛІЄВОЮ КИСЛОТОЮ

Синтезовано біологічно активні поліуретансечовини на основі макродіізоціанату, 1,6-гексаметилендіаміну та фолієвої кислоти. Встановлено, що біологічна активність поліуретанів з іммобілізованою ФК проявлялась в їх здатності стимулювати зростання та диференціювання клітинних елементів в умовах культивування.

Ключові слова: поліуретансечовина, фолієва кислота, біологічна активність, синтез.

Вступ

Біологічно активні полімерні матеріали, в яких іммобілізація лікарської речовини здійснюється за рахунок ковалентного зв'язку з полімерним носієм [3, 5, 10] привертають велику увагу дослідників як імплантаційні матеріали з власною біологічною активністю. Фолієва кислота (N-птероіл-L-глутамінова кислота, ФК) відома як вітамін, здатний стимулювати регенераційні процеси [7]. Авторами [11] ФК була використана для того, щоб покращити внутріклітинне групування при лікуванні онкологічних захворювань. Відомо використання сполук ФК як афінних носіїв для виділення різноманітних ферментів [3].

Оскільки ФК в організмі проявляє свою біологічну активність за рахунок наявності птеридинового циклу шляхом приєднання атомів водню до атомів вуглецю й азоту в положеннях С-6, С-7 та N-5, N-8 з утворенням тетрагідрофолієвої кислоти, яка виконує біохімічну функцію кофериенту в міжмолекулярному транспортуванні одновуглецевих груп різного ступеня окиснення [2], то введення ФК в структуру поліуретансечовин дозволить отримати матеріал з власною біологічною активністю.

Мета нашої роботи полягала в синтезі біологічно активних поліуретансечовин (ПУС) на основі макродіізоціанату, 1,6-гексаметилендіаміну (ГМДА) та фолієвої кислоти, дослідженні біологічної активності синтезованих ПУС методом культури тканин.

Матеріали і методи досліджень

Поліоксипропіленгліколь (ПОПГ) (Rokopol, Польща) ММ 1052 висушували при залишковому тиску $13 \cdot 10^{-4}$ – $39 \cdot 10^{-4}$ атм за температури $(80 \pm 5)^\circ\text{C}$ у потоці сухого аргону протягом 8 год безпосередньо перед синтезом. Вміст вологи, за Фішером, не перевищував 0,01–0,02 %; 2,4;

2,6-толуїлендіізоціанат (ТДІ, 80/20) (BAYER, Німеччина) очищували перегонкою у вакуумі ($T = 78 - 80^\circ\text{C} / 3,9 \cdot 10^{-4}$ атм., $n_D^{20} = 1,5678$). Використовували свіжоперегнаний.

1,6-гексаметилендіамін (ГМДА) (Fluka, 99,9 %) застосовували без додаткового очищення.

N,N'-диметилацетамід (ДМАА) (Швейцарія, 99,7 %) переганяли із сумішшю бензол-вода у вакуумі ($T_{\text{кип.}} = (52 \pm 1)^\circ\text{C} / 18 \cdot 10^{-3}$ атм).

Лікарська речовина: фолієва кислота (ФК) (фарм., Fluka) – N-птероіл-L-глутамінова кислота. Емпірична формула: $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$. $T_{\text{розкл.}} = 250^\circ\text{C}$. Перед синтезом висушували при 120°C до постійної маси.

Характеристичну в'язкість синтезованих полімерів розраховували за методом [6] з використанням вискозиметра Уббелодє за температури $(25 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Показники міцності при розриві та відносного подовження синтезованих ПУС визначали за методикою [8] на розривній машині FU-1000 при швидкості руху затискання 70 мм/хв. Дослідження молекулярних характеристик ПУС проводили методом універсальної колибровки [9] на комплекті обладнання для рідинної хроматографії фірми 8800 SLC «Du Pont» США (температура 50°C , тиск в системі 58 бар, елюент – ДМАА).

Хімічну будову синтезованих полімерів досліджували методом ІЧ-спектроскопії. ІЧ-спектри записували на ІЧ-спектрометрі з Фур'є перетворенням «Tensor-37» в ділянці 650 – 4000 cm^{-1} методом багаторазового порушеного повного внутрішнього відображення з використанням призми-трапеції з KRS-5 (число відображень $N = 4$), таблетованим з KBr. Віднесення смуг поглинання зроблено відповідно до [1].

Біологічну активність та біосумісність синтезованих полімерів досліджували методом культури тканин згідно з [4]. Об'єкти дослідження – зразки поліуретансечовини без ФК (ПУС) та поліуретансечовини з ФК (ПУС-ФК) у вигляді

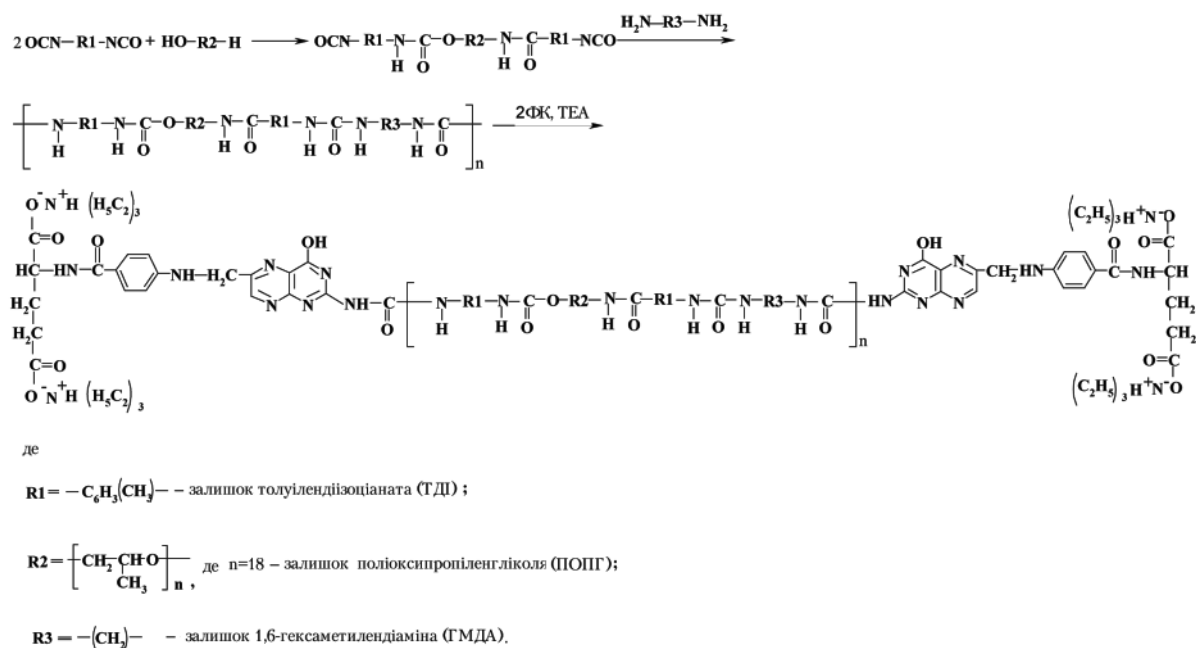


Рис. 1. Схема синтезу ПУС

плівок. Як контроль – ФК. Клітинний матеріал одержували з підшкірно-жирової клітковини білих безпородних шурів, що в умовах культивування дає ріст фібробластів і фібробластоподібних елементів. Заміна живильного середовища в рідкій фазі проводилася на 3, 7, 10 й 14-ту добу культивування.

Результати та їх обговорення

Синтез ПУС проводили у дві стадії за різним мольним співвідношенням ГМДА:ФК, як 1:1, 3:1, 10:1 відповідно. На першій стадії синтезували макродізоціанат (МДІ) на основі поліоксіпропіленгліколю (ПОПГ) та 2,4; 2,6-толуїлендіізоціанату (ТДІ 80/20, $\text{NCO}_{\text{вільн.}} = 6,0\%$). На другій стадії проводили реакцію між вільними ізоціанатними групами МДІ та аміними групами ГМДА в середовищі N,N-диметилацетаміду (ДМАА) (рис. 1).

Окремо готували розчин ФК у ДМАА. Для блокування кислотних груп ФК додавали триетиламін (ТЕА) при мольному співвідношенні ФК/ТЕА = 1/2. Потім розчин ФК вводили до реакційної маси (ДМАА, $T = 60^\circ\text{C}$, $\tau = 1$ год). Хід реакції контролювали методом ІЧ-спектроскопії ($\nu_{\text{NCO}} = 2250 \text{ см}^{-1}$). Розчини полімерів виливали на тефлонові підкладки та висушували за температури $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$ до постійної маси. Полімери одержували у вигляді жовтих прозорих плівок.

Проведені фізико-хімічні та фізико-механічні дослідження показали (табл. 1), що в ряду синтезованих ПУС зі збільшенням вмісту ФК спостерігається зменшення значень характеристичної в'язкості, фізико-механічних показників та

молекулярної маси. За результатами ексклюзійної хроматографії синтезовані ПУС характеризувались як індивідуальні полімери без низькомолекулярних продуктів, що свідчить про те, що синтез відбувся без утворення побічних речовин до вичерпання всіх вихідних компонентів. Тобто іммобілізація ФК за вторинним аміном птеридину призводила до обриву макромолекулярних ланцюгів у процесі синтезу. Враховуючи можливе подальше використання синтезованих ПУС як імплантаційних матеріалів, оптимальні фізико-механічні властивості має полімер ПУС-4, в якому співвідношення ГМДА:ФК = 10:1.

Таблиця 1. Фізико-хімічні та фізико-механічні властивості ПУС із фолієвою кислотою

ПУС	Співвідношення компонентів	$[\eta]$, эл/г	σ , МПа	ε , %	M_w
ПУС-1	ГМДА:ФК=0:1	0,03	0,11	16	68000
ПУС-2	ГМДА:ФК=1:1	0,10	0,18	28	216000
ПУС-3	ГМДА:ФК=3:1	0,28	0,20	568	253000
ПУС-4	ГМДА:ФК=10:1	0,60	2,2	993	338000

На рис. 2 наведено фрагменти ІЧ-спектрів ФК (крива 1), ГМДА (крива 2), МДІ (крива 3), МДІ+ФК (крива 4), МДІ+ГМДА (крива 5), ПУС з мольним співвідношенням ГМДА:ФК як 1:1 (крива 6), 3:1 (крива 7) та 10:1 (крива 8) відповідно. ІЧ-спектри (криві 4–8) свідчать про утворення поліуретансечовин за наявності в структурі всіх полімерів сечовинних груп. На кривій 4 наявні смуги коливальних, які можна класифікувати як валентні та деформаційні коливання карбонілу сечовинної групи $\nu_{\text{C=O}} = 1695 \text{ см}^{-1}$ (амід I),

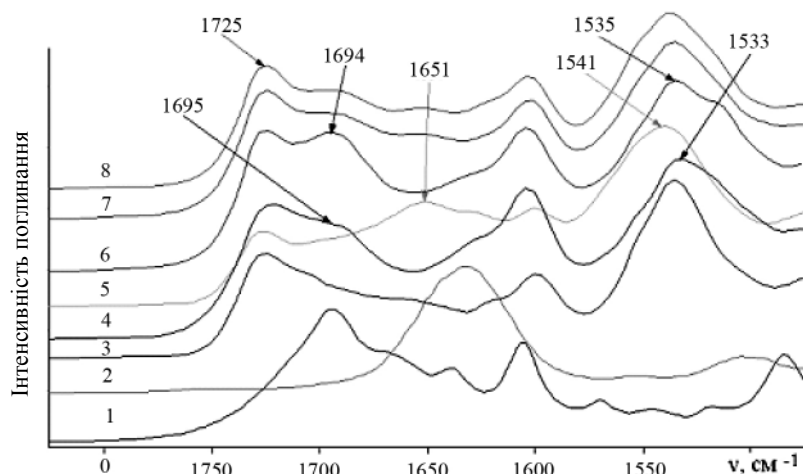
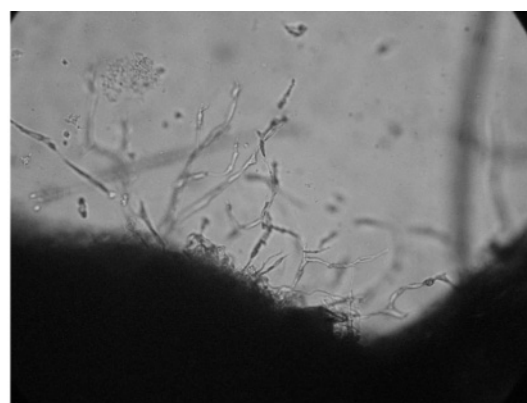


Рис. 2. Фрагменти ІЧ-спектрів: 1 – ФК; 2 – ГМДА; 3 – МДІ; 4 – МДІ+ФК; 5 – МДІ+ГМДА; 6 – МДІ+ГМДА+ФК (ГМДА:ФК=1:1); 7 – МДІ+ГМДА+ФК (ГМДА:ФК=3:1); 8 – МДІ+ГМДА+ФК (ГМДА:ФК=10:1)

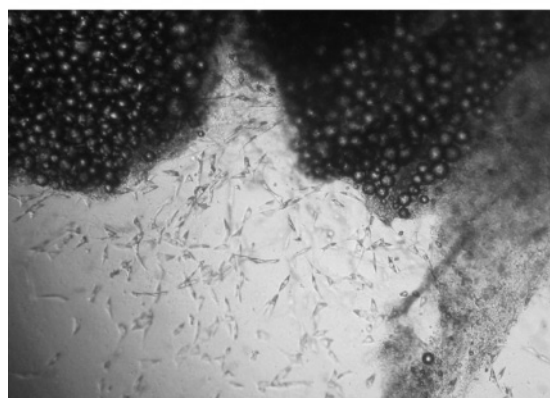
δ_{NH} – 1533 cm^{-1} (амід II), утвореної взаємодією NH_2 -групи ФК з NCO – групою МДІ. Наявність смуги поглинання $\nu_{\text{C=O}}$ – 1651 cm^{-1} (амід I) та δ_{NH} – 1540 cm^{-1} (амід II) у спектрі полімеру ПУС-5 (крива 5) є свідченням утворення поліуретансечовин взаємодією NH_2 -групи ГМДА з NCO – групою МДІ. На ІЧ-спектрах ПУС-6 – ПУС-8 (криві 6–8) спостерігаються смуги поглинання $\nu_{\text{C=O}}$ – 1694 cm^{-1} (амід I) та δ_{NH} – 1535 cm^{-1} (амід II), які можна зарахувати до сечовинних груп, утворених внаслідок взаємодії вторинних аміногруп ГМДА та ФК з вільними ізоціанатними групами макродіізоціанату. Кількісне зростання вмісту сечовинних зв'язків у ряду полімерів (криві 6–8) підтверджується різною інтенсивністю смуг валентних коливань карбонілу уретанових та сечовинних груп $\nu_{\text{C=O}}$ – 1725 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=O}}$ – 1694 cm^{-1} відповідно. У полімері ПУС-6 (крива 6) смуги поглинання однакові за інтенсивністю, тоді як у полімері ПУС-7 (крива 7) інтенсивність смуги сечовинної групи зменшилась у 2 рази, а в ПУС-8 (крива 8) стала плечем смуги $\nu_{\text{C=O}}$ – 1725 cm^{-1} . Таким чином, ІЧ-спектроскопічні дослідження підтвердили проходження хімічної іммобілізації ФК з утворенням сечовинних зв'язків на полімерному носії.

Дослідження впливу фолієвої кислоти в складі ПУС на ріст фібробластичних елементів (ФЕ) методом культури тканин показали, що на 3-ю добу культивування у контрольних флаконах та у флаконах зі зразками ПУС (рис. 3, а) спостерігалася міграція одиничних ФЕ. У флаконах з ПУС-ФК ріст клітин був значно більший, ніж у контрольних флаконах. Також були наявні одиничні ФЕ, значно віддалені від експлантата (рис. 3, б).

На 5–7 добу у флаконах із ПУС-ФК спостерігалось формування трьох зон росту – компактної, сіткоподібної та зони мігруючих ФЕ, також



а



б

Рис. 3. Зона мігруючих ФЕ на 3 добу культивування: а – основа ПУС; б – основа ПУС+ФК

було помічено, що ріст клітин проходив під поверхнею полімеру. У флаконах із ПУС та контрольних флаконах сформувалася сіткоподібна зона з елементами компактної, збільшилася зона мігруючих ФЕ. На 10-ту добу культиву-

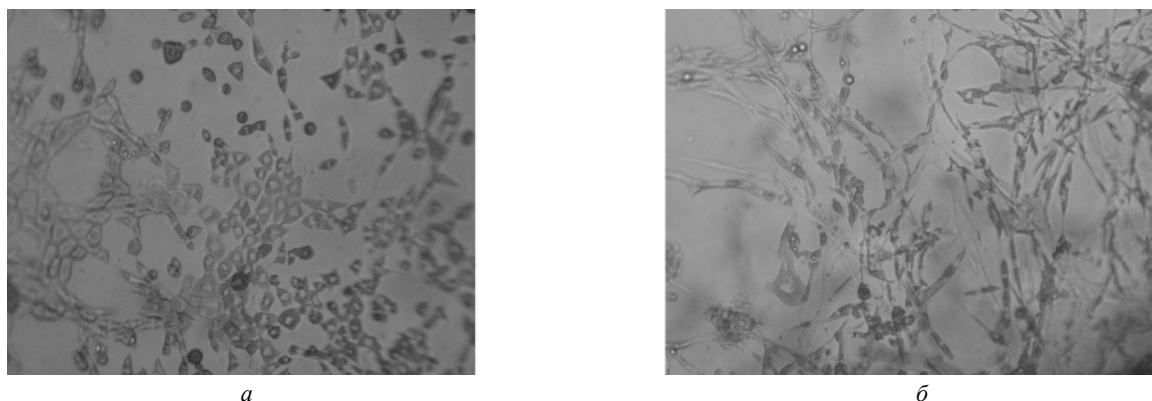


Рис. 4. Культура ФЕ на 21 добу культивування: *а* – дегенеративні зміни – основа ПУС; *б* – активний ріст – основа ПУС+ФК

вання як у контрольних флаконах, так і у флаконах із ПУС були сформовані компактна та сіткоподібна зони росту. З'явилися ознаки дегенеративних змін, що проявлялися у ваколізації клітин. У флаконах із ПУС-ФК спостерігався тканеподібний ріст та збільшення зони мігруючих ФЕ. На 14-ту добу популяція клітин перебувала в стадії дегенерації як у контрольних флаконах, так і у флаконах з ПУС. У флаконах із ПУС-ФК збільшувалась кількість мігруючих ФЕ та з'являлися клітини полігональної форми. На 21-шу добу у контрольних флаконах та флаконах із ПУС (рис. 4, *а*) спостерігалась повна дегенерація клітин, в той час як для ПУС-ФК продовжувався ріст ФЕ (рис. 4, *б*).

Таким чином, введення до складу ПУС фолієвої кислоти призводить до подовження періоду росту клітинних елементів, стимуляції їх диференцировки.

Висновки

У результаті дослідження синтезовано низку поліуретансечовин, модифікованих фолієвою кислотою, за різного мольного співвідношення ГМДА:ФК, як 1:1, 3:1, 10:1 відповідно. Дослідження методом культури тканин показали, що біологічна активність ПУС із хімічно іммобілізованою ФК проявлялась в їхній здатності стимулювати зростання та диференціювання клітинних елементів в умовах культивування.

- [1] Беллами Л. Инфракрасные спектры молекул / Л. Беллами. – М., 1957. – 444 с.
- [2] Губський Ю. І. Біологічна хімія / Ю. І. Губський. – К.–Вінниця : НОВА КНИГА, 2009. – 664 с.
- [3] Коршак В. В. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений / В. В. Коршак, М. И. Штильман. – М. : Наука, 1984. – 261 с.
- [4] Лаппо В. Г. Некоторые результаты и перспективы использования метода тканевых культур в токсикологии медицинских полимеров / В. Г. Лаппо, В. И. Тимохина, В. П. Яценко, Н. А. Галатенко // Гигиена и санитария. – 1981. – № 10. – С. 54–56.
- [5] Лившиц В. С. Полимерные покрытия на раны и ожоги / В. С. Лившиц // Химико-фармац. журн. – 1988. – Т. 22, № 7. – С. 790–795.
- [6] Малкин А. Я. Диффузия и вязкость полимеров. Методы измерения / А. Я. Малкин, А. Е. Чалых. – М. : Химия, 1970. – 370 с.
- [7] Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М. : Медицина, 1998. – Ч. 1. – 736 с.
- [8] Нильсен Л. Механические свойства полимеров и полимерных композиций / Л. Нильсен. – М. : Химия, 1978. – С. 162–168.
- [9] Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / [О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров и др.] – Воронеж : Водолей, 2004. – 528 с.
- [10] Фельдштейн М. М. Полимерные покрытия для лечения ран и ожогов / М. М. Фельдштейн, В. С. Якубович, Л. П. Раскина, Т. Т. Даурова // Химия и технология медико-биологических полимеров. Сер. химия и технология высокомолекулярных соединений. – М. : ВИНТИ. – 1981. – Т. 16. – С. 120–167.
- [11] Min-Hua C. Folic Acid Immobilized Ferrimagnetic DP-Bioglass to Tanger Tumor Cell for Cancer Hyperthermia Treatment / Chen Min-Hua, Hsu Chung-King, Lin Feng-Huei, Leszek Stobinski, Jerzy Peszke. // Advances in Science and Technology. – 2006. – Vol. 53. – P. 50–57.

O. Andrushina, R. Rozhnova, N. Galatenko, L. Narozhnaiko

SYNTHESIS AND PROPERTIES BIOLOGICALLY ACTIVE POLYURETHANEUREAS WITH A FOLIC ACID

Are synthesized biologically active polyurethaneureas on the basis of macrodiisocyanate, 1,6-hexamethylenediamine and a folic acid. The it was determined biological activity of polyurethane with immobilized folic acid appeared in their abilities to stimulate the growth and differentiation of cells' elements in the conditions of cultivation.

Keywords: polyurethaneureas, folic acid, biologically active.