

ОТРИМАННЯ БІОСУМІСНИХ ПОЛІМЕРНИХ ПЛІВОК НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХНІХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Розроблено методику отримання біосумісних полімерних плівок на основі хітозану та його комплексів із колагеном з метою використання їх як матриць-носіїв для лікарських препаратів. Наявність комплексоутворення в системах хітозан-колаген підтверджено методами ІЧ-спектроскопії та віскозиметрії. Полімерні плівки формували сухим методом з 2,5 % розчинів хітозану з молекулярними масами 150, 400, 750 кДа та з хітозан-колагенових комплексів масового складу 1:1;2:1;3:1 відповідно. Досліджено кінетику вивільнення лікарських препаратів (ацетилсаліцилової та налідіксової кислоти) із хітозановмісних плівок. Встановлено, що одержані полімерні плівки є біосумісними і можуть використовуватися як матеріали медичного призначення.

Ключові слова: полімерні плівки, біосумісність, матриця-носіїв, лікарські препарати.

Вступ

Отримання біосумісних матеріалів, які можна застосувати як матриці-носії для лікарських препаратів та основи-підкладки для культивування стовбурових клітин, є надзвичайно актуальним напрямком у сучасній науці. За останні роки у медицині та фармації дедалі частіше застосовують медичні препарати на основі полімерних комплексів «носіїв – діюча речовина», що, як правило, забезпечує контрольовану кінетику вивільнення препарату в організмі. Разом з тим з'являється необхідність не тільки контрольованої кінетики розпаду вказаних комплексів, а й контрольованої доставки таких препаратів та ініціювання їх розпаду під впливом факторів захворювання (зміна рН-середовища, підвищення температури, наявність токсинів, ферментів, антигенів тощо) [1]. Системи доставки ліків мають бути стабільними та зберігати хімічну структуру протягом певного періоду і водночас бути придатними до біодеградації [2]. Основними природними полімерами у системах доставки ліків є колаген, желатин, фібрин, хітозан, альгінат тощо [3].

Метою нашого дослідження є отримання хітозановмісних плівок та дослідження їх властивостей залежно від складу і характеристик, навколишнього середовища. Вибір хітозану (полі-β-(1,4)-D-глюкозаміну) для формування полімерних біосумісних плівок зумовлений тим, що він має плівкоутворювальні, мукоадгезивні, протизапальні властивості; є біосумісним з тканинами людини, нетоксичний, здатний до біодеструкції та посилення регенеративних процесів тощо [4]. Такі полімери, як хітозан та його похідні, завдяки наявності певних функціональних груп забезпечують можливість утворення зв'язків різної міцності між полімером-носієм і лі-

карським препаратом, що дає можливість регулювати активність і стабільність зв'язаної речовини та швидкість її дифузії [5, 6]. Крім того, хітозан має комплексоутворювальні та хелатоутворювальні властивості, що дозволяє використовувати його для утворення комплексів, зокрема з лікарськими препаратами. Колаген належить до одного з основних структурних білків організму і відомий своїми мукоадгезивними властивостями [7]. Отже, припускають, що комплекс на основі цих полімерів характеризуватиметься низкою цінних властивостей і слугуватиме полімерним субстратом для культивування клітин, полімерною композицією для створення гемостатичних, антибактеріальних матеріалів тощо.

Експериментальна частина

Для формування біосумісних плівок використовували хітозан із молекулярними масами 150, 400, 750 кДа (*Fluka*) та колаген із молекулярною масою 300 кДа (Санлайт Кемікалз) (рис. 1):

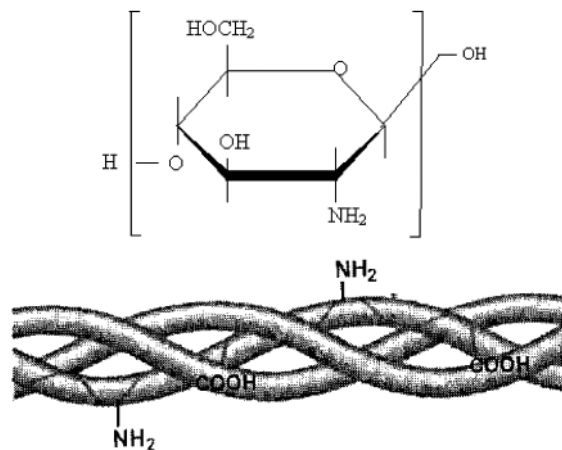


Рис. 1. Структури хітозану та колагену

Як лікарські препарати використовували налідіксову та ацетилсаліцилову кислоти. Налідіксова кислота (НК) – синтетичний антибактеріальний препарат ефективний щодо грамнегативних мікроорганізмів (рис. 2). Вважається, що налідіксова кислота діє шляхом пригнічення синтезу бактеріальної ДНК, перешкоджаючи її полімеризації. Діюча доза налідіксової кислоти в лікарському препараті становить 0,5 г.

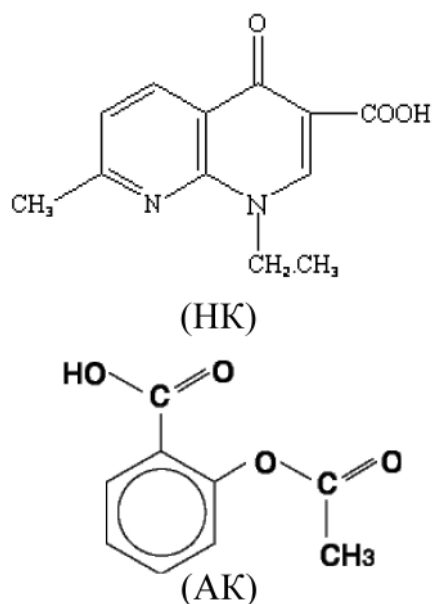


Рис. 2. Структури налідіксової (НК) та ацетилсаліцилової (АК) кислот

Ацетилсаліцилова кислота (АК) – нестероїдний протизапальний засіб, має знеболювальні, протизапальні та антиагрегаційні властивості. Діюча доза становить від 0,1 до 0,5 г (рис. 2).

Полімерні гідрогелеві плівки формували сухим методом шляхом лиття формувального розчину на поліпропіленову поверхню та висушуванні плівки при 40 °С протягом 24 год. Як формувальний розчин використовували 2,5 % (мас.) оцтовокислий розчин хітозану або хітозан-колагеновий розчин зі співвідношеннями компонентів 1:1; 2:1; 3:1 відповідно.

Завершальною стадією отримання водонерозчинних хітозановмісних плівок є їх зшивання. Як зшивальний агент використовували еквімолярний розчин епіхлоргідрину і NaOH (0,25 М). Тривалість зшивання – 5, 10, 12, 15 хв за кімнатної температури. Зшивання припиняли шляхом промивання плівок у дистильованій воді. Далі висушували при 40 °С протягом 24 год. У результаті зшивання хітозан-колагенових плівок епіхлоргідрином вони набувають більшої механічної міцності та стійкості у фізіологічному середовищі і придатні для їхнього подальшого використання. Товщина плівок 0,24 мм (рис. 3).

Метод віскозиметрії застосовували для дослідження процесів утворення та структури комплексів хітозан-колаген. Віскозиметричні дослідження розчинів полімерів та полімер-полімерного комплексу на їх основі проводили на віскозиметрі ВПЖ-2 з діаметром капіляра 0,82 у широкому концентраційному інтервалі при температурі 298 К.

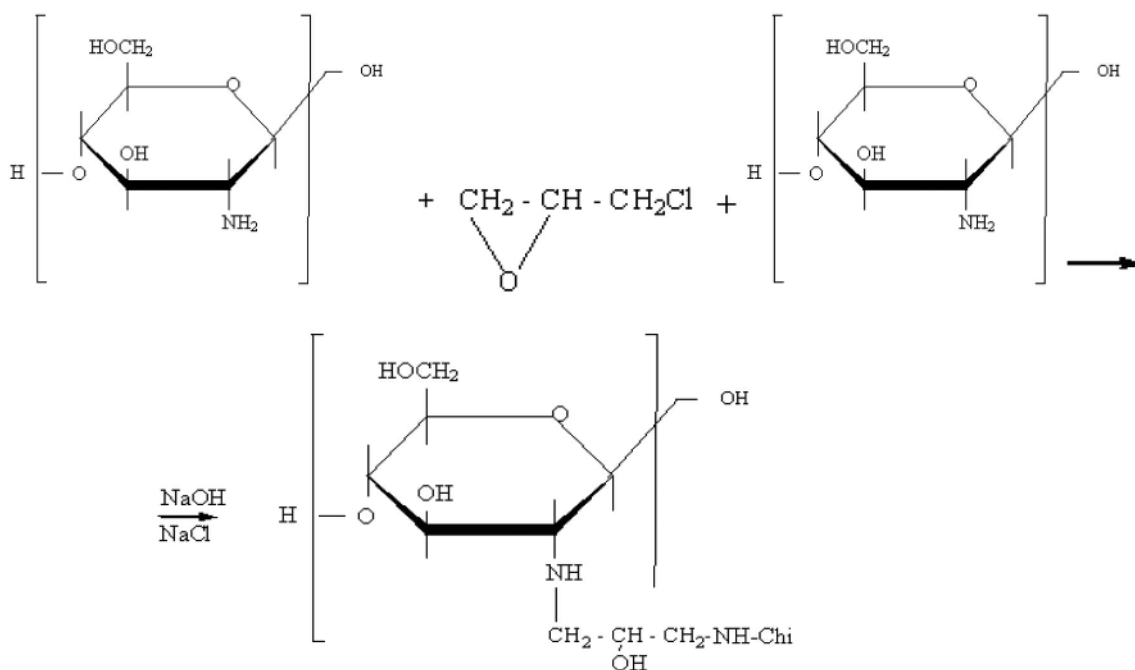


Рис. 3. Зшивання полімерних плівок хітозану епіхлоргідрином

ІЧ-спектроскопію використовували для проведення якісного аналізу хітозанових та хітозан-колагенових гідрогелевих плівок. Дослідження поверхневих шарів зразків плівок проводили з використанням спектрометра Tensor 37 BRUKER методом багаторазового порушеного повного відбиття.

Ступінь набрякання одержаних полімерних плівок досліджували ваговим методом на торсійних вагах у буферних розчинах з рН: 1,68; 3,56; 4,01; 5,5; 6,86; 9,18 за кімнатної температури до постійних значень. Ступінь набрякання зразків розраховували за формулою:

$$\alpha = (m - m_0)/m_0,$$

де m_0 – маса зразка до набрякання, m – маса набряклого зразка.

Дослідження біологічної сумісності зразків проводили, використовуючи первинну культуру стромальних клітин аорто-гонадо-мезонефроса ембріона щура у фазі експоненціального росту. Для цього плівки попередньо стерилізували: витримували у фізрозчині та автоклаували при 121 °С. Клітини підтримувалися у живильному середовищі RPMI 1640. Токсичність плівок визначали візуально за зміною морфологічних характеристик клітин та морфологією, характерною для апоптозу або некрозу, івертованим мікроскопом.

Для дослідження кінетики вивільнення лікарських препаратів із хітозановмісних плівок їх витримували в розчині НК з концентрацією 0,01 мг/мл та у 0,001 М розчині АК протягом 24 год за кімнатної температури. Насичені лікарськими препаратами плівки поміщали у дистильовану воду за кімнатної температури та постійному перемішуванні. Концентрацію наліткової кислоти у розчині визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 290$ нм. Методика визначення вмісту НК у воді за допомогою спектрофотометра ґрунтується на визначенні різниці оптичної густини розчину НК, який утворюється в досліджуваній воді, та контрольного розчину. Кількість лікарського препарату, що вивільнився за час t , визначали за допомогою заздалегідь побудованої калібрувальної прямої. Концентрацію ацетилсаліцилової кислоти у розчині визначали титриметричним методом шляхом титрування досліджуваного розчину 0,001 М NaOH.

Аналіз та узагальнення результатів дослідження

Комплексоутворення між хітозаном та колагеном вивчали за допомогою методу капілярної вискозиметрії.

Як видно з рис. 4, для всіх систем спостерігається від'ємне відхилення відношення питомої в'язкості суміші до суми питомих в'язкостей компонентів від адитивної прямої. Цей ефект дозволяє судити про наявність у розчині полікомплексів та вказує на те, що частинки полікомплексу хітозан-колаген мають щільну упаковку.

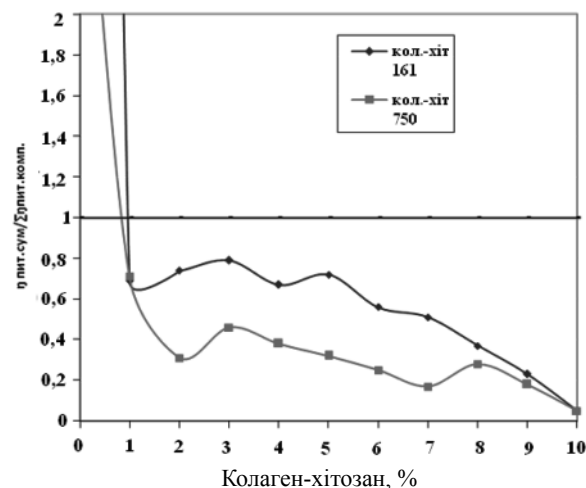


Рис. 4. Залежність відношення питомої в'язкості суміші до суми питомих в'язкостей компонентів від складу суміші

Отримані полімерні плівки на основі хітозану та його полікомплексів з колагеном досліджували методом ІЧ-спектроскопії. Як видно з рис. 5, спектри майже ідентичні, оскільки зшивання ЕХГ не призводить до появи нових функціональних груп, а смуги поглинання спектру колагену перекриваються хітозановими. Однак при введенні в хітозановий гідрогель колагену (рис. 5, крива 3) дещо розширюється смуга поглинання при 3200–3500 см^{-1} , що характерно для валентних коливань міжмолекулярних водневих зв'язків NH та OH груп; зростає інтенсивність смуги амід II при 1578 см^{-1} , характерної для колагену. В спектрах зшитих ЕХГ хітозанових гідрогелів збільшується інтенсивність смуги поглинання при 1578 см^{-1} , яка характерна для деформаційних коливань вторинних аміногруп, що підтверджує проходження зшивання по первинних аміногрупах; збільшення інтенсивності піка при 1148 см^{-1} , що відповідає валентним коливанням C-O груп.

Досліджено, що кінетика і ступінь набрякання одержаних полімерних плівок залежать від значень рН розчину. Набрякання визначається переважно впливом йонних взаємодій між хітозановими ланцюгами та залежить від ступеня зшивання, який встановлюється протягом формування полімерної плівки.

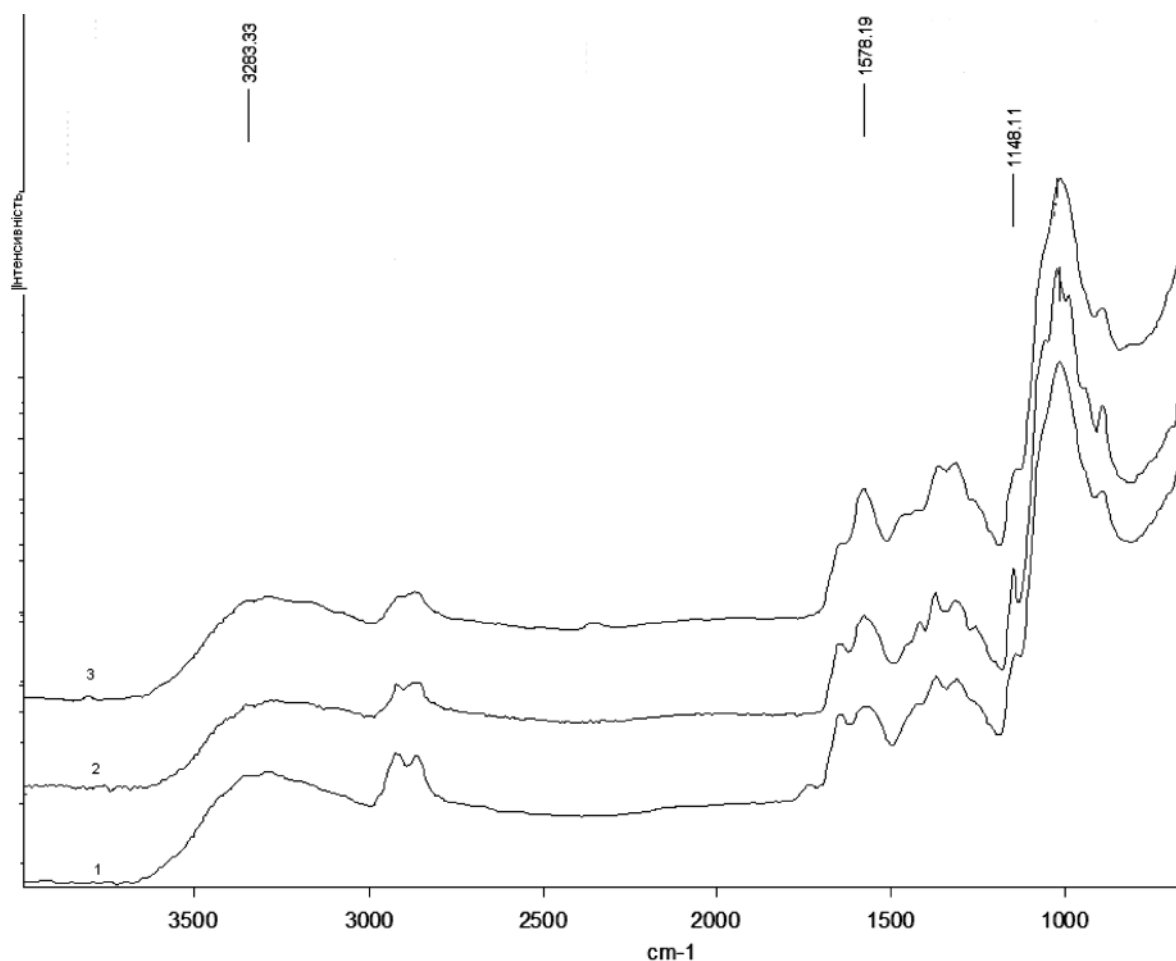


Рис. 5. ІЧ-спектри хітозановмісних гідрогелевих плівок: 1 – хітозанова плівка; 2 – хітозанова плівка, зшита епіхлоргідрином; 3 – полімерна плівка на основі комплексу хітозану і колагену складу 2:1

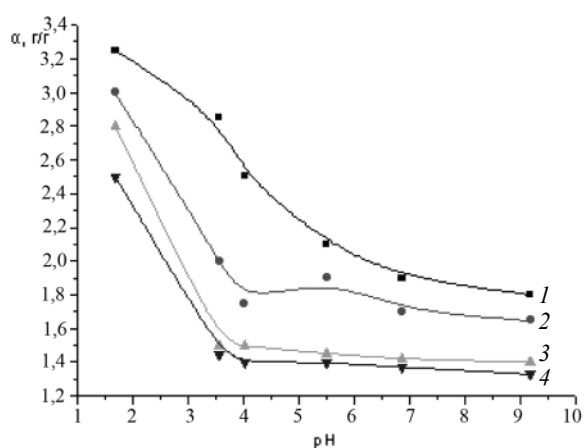


Рис. 6. Залежність ступеня набрякання полімерної плівки хітозану (ММ 400 кДа) від рН та тривалості зшивання: 1 – 5 хв; 2 – 10 хв; 3 – 12 хв; 4 – 15 хв

Як видно з рис. 6, при зменшенні значень рН спостерігається збільшення ступеня набрякання, що ймовірно пояснюється іонізацією аміногруп хітозану в кислому середовищі, яке призводить до розгортання його макроланцюгів через від-

штовхування між однойменно зарядженими сегментами. У лужному ж середовищі ланцюги хітозану, навпаки, набувають компактної конфорації, що відображається у зменшенні ступеня набрякання. Так, для полімерної плівки з часом зшивання 10 хв ступінь набрякання зменшується від 3 при рН 1,68 до 1,65 при рН 9,18. А при рН 4,01 ступінь набрякання зменшується від 2,5 для плівки з часом зшивання 5 хв до 1,4 – для плівки з часом зшивання 15 хв.

Крім того встановлено, що із збільшенням тривалості зшивання гідрогелів ступінь їх набрякання зменшується, що можна пояснити зростанням густини зшивання із збільшенням часу зшивання.

Установлено, що гідрогелеві плівки на основі хітозан-колагенового комплексу характеризуються більшими ступенями набрякання порівняно з хітозановими плівками. Причому, як видно з рис. 7, ступінь їх набрякання зростає зі збільшенням вмісту колагену та при зменшенні значень рН. Подібний ефект пов'язаний зі зміною білкової структури колагену, а отже, і ступенем його набрякання, залежно від рН [8]. Збільшен-

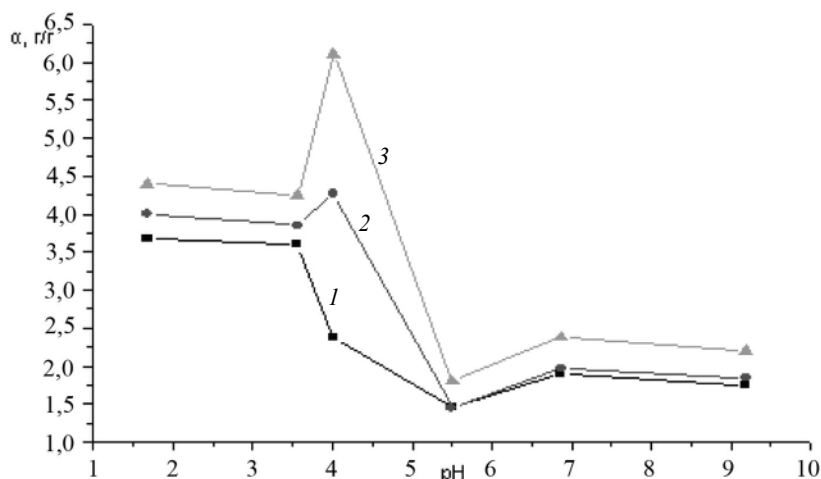


Рис. 7. Залежність ступеня набрякання хітозан-колагенових плівок від рН. Тривалість зшивання 15 хв. Склад плівок: 1 – хітозан:колаген = 3:1; 2 – 2:1; 3 – 1:1

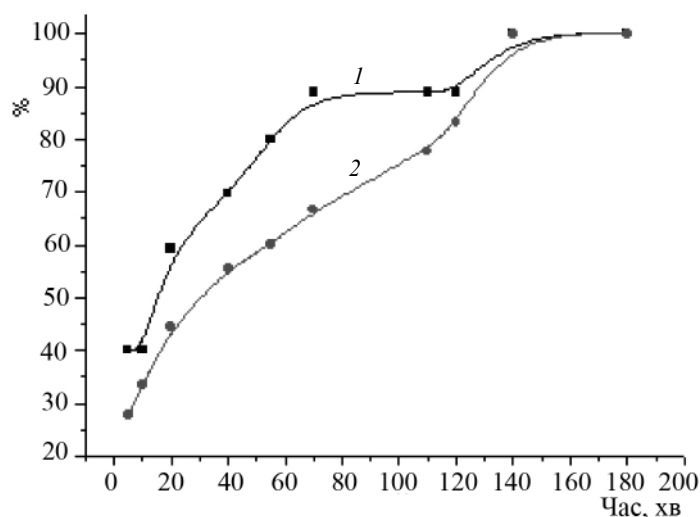


Рис. 8. Кінетика вивільнення ацетилсаліцилової кислоти з полімерних плівок на основі хітозану (1) та на основі формувального розчину зі співвідношенням хітозан-колаген 3:1 (2). Тривалість зшивання 15 хв. ММ хітозану 400 кДа. рН = 5,5

ня тривалості зшивання призводить, як і у випадку хітозанових плівок, до зменшення ступеня їх набрякання.

Відомо [9], що плівки на основі полікомплексів, у нашому випадку полікомплексу хітозан-колаген, характеризуються здатністю довше утримувати лікарський препарат та сповільненою кінетикою вивільнення порівняно з чистими хітозановими плівками, що може бути використано для створення лікарських препаратів пролонгованої дії.

Так, дослідження кінетики вивільнення АК із хітозановмісних плівок показало (рис. 8), що кількість вивільненого препарату становила 82 % за 1 год для плівок, сформованих на основі хітозану, та 63 % для плівок на основі комплексу хітозан-колаген зі співвідношенням 3:1.

Вивчення кінетики вивільнення налідіксової кислоти з хітозановмісних гідрогелевих плівок свідчить, як видно з рис. 9, що НК на 100 % десорбується з хітозанового гідрогелю вже за 120 хв, тоді як з хітозан-колагенового – лише за 180 хв. Співвідношення компонентів полікомплексу суттєво не впливає на кінетику вивільнення НК. Отже, введення колагену, який утворює полікомплекс з хітозаном призводить до пролонгованого вивільнення НК з гідрогелю.

Проведені дослідження на біологічну сумісність хітозановмісних плівок показали, що після 3-денного культивування морфологічних характеристик, асоційованих із токсичністю (зміна морфології клітин, апоптоз, некроз) не виявлено.

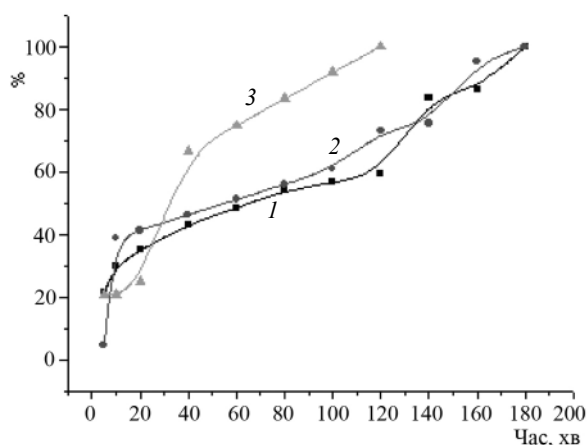


Рис. 9. Кінетика вивільнення налідіксової кислоти з хітозановмісних полімерних плівок на основі хітозану (3), полікомплексу складу хітозан-колаген – 3:1 (1); 2:1 (2). ММ хітозану 400 кДа. Тривалість зшивання 15 хв. рН = 5,5

Висновки

Розроблено методику отримання полімерних плівок-носіїв на основі хітозану, вибрано оптимальні умови їх формування: концентрація розчину хітозану 2,5 % (мас.), зшивальний агент та умови зшивання еквімолярним розчином епіхлоргідрину і NaOH (0,25M).

Досліджено кінетику вивільнення ацетилсаліцилової та налідіксової кислот із полімерних плівок на основі хітозану та його комплексів із колагеном при різних співвідношеннях компонентів.

Встановлено, що за 1 год 82 % ацетилсаліцилової кислоти десорбується з хітозанових плівок, тоді як плівок на основі комплексу хітозан-колаген – 63 %; налідіксова кислота на 100% десорбується з хітозанової гідрогелевої плівки вже за 120 хв, тоді як з хітозан-колагеновою – лише за 180 хв.

Встановлено, що одержані полімерні плівки є біосумісними і можуть надалі використовуватися як матеріали медичного призначення.

- [1] Janes K. A. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems *Macromolecules* / K. A. Janes, P. Calvo, M. J. Alonso // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2001. – V. 47. – P. 83–97.
- [2] Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers / V. Torchilin // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2009. – V. 71. – P. 431–444.
- [3] Malafaya P. B. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications / P. B. Malafaya, G. A. Silva, R. L. Reis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – V. 59. – P. 207–233.
- [4] Pillai C. K. S. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation / C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma // *Progress in Polymer Science*. – 2009. – V.34. – P. 641–678.
- [5] Suh I. K. F. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review / I. K. F. Suh, H. Matthew // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21. – P. 2589–2598.
- [6] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review / B. Krajewska // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – V. 35. – P. 126–139.
- [7] Shoulders M. D. Collagen structure and stability / M. D. Shoulders, R. T. Raines // *Annual Review of Biochemistry*. – 2009. – V. 78. – P. 929–958.
- [8] Bard J. B. Chick corneal development in vitro: diverse effects of pH on collagen assembly / J. B. Bard, D. J. Hulmes, I. F. Purdom, A. S. Ross // *Journal of Cell Science*. – 1993. – V. 105. – P. 1045–1055.
- [9] Moustafin R. I. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® EPO/Eudragit® L100-55 interpolyelectrolyte complexes / R. I. Moustafin, I. M. Zaharov, V. A. Kemenova // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2006. – V. 63. – P. 26–36.

Yu. Dzumedzey, G. Pobigay, V. Konovalova, A. Burban

PRODUCTION OF BIOCOMPATIBLE POLYMER FILMS BASED ON CHITOSAN AND INVESTIGATION OF THEIR PROPERTIES

The production methods of biocompatible polymer films based on chitosan and its complexes with collagen were investigated in order to use them as polymer carriers for medical preparations. Complex formation in chitosan-collagen systems was confirmed by IR-method and viscosimetry. Polymer films were obtained from chitosan 2.5 % solution with molecular weights 150, 400, 750 kDa and its complexes with collagen solutions by dry method with mass compounds ratios of chitosan:collagen: 3:1; 2:1; 1:1. The release kinetics of the medical preparations (acetylsalicylic and nalidixic acid) from chitosan-based polymer films was investigated. It was established that obtained polymer films are biocompatible and can be used further as materials for medical usage.

Keywords: chitosan, collagen, biocompatibility, release kinetics.