



УДК 678.06:615.4

Н. А. Галатенко, Р. А. Рожнова, Д. В. Кулеш, О. С. Андрюшина,
І. Б. Демченко

Новий полімерний матеріал пролонгованої дії для лікування ран та опіків

(Представлено членом-кореспондентом НАН України А. І. Вовком)

Отримано новий полімерний матеріал пролонгованої дії. Вивчено фармакокінетику і динаміку вивільнення фолієвої кислоти з фолатовмісних поліуретансечовин різного хімічного складу. Встановлено, що ефективна дія фолатовмісних полімерних матеріалів полягає в зменшенні запальних реакцій при імплантації в організм експериментальних тварин і в утворенні зрілої та тонкої сполучнотканинної капсули, що дає можливість використовувати отримані матеріали як біологічно активні плівкові покриття в медичній практиці.

Одним з найперспективніших підходів для оптимізації перебігу репаративної регенерації в ранах будь-якої етіології є використання ранових покриттів (РП). РП є своєрідною лікарською формою і виявляють комплексну дію на рану — захищають від механічного ушкодження, створюють оптимальне мікросередовище для загоєння, запобігають проникненню мікроорганізмів тощо. Введення до складу покриттів різних лікарських препаратів забезпечує додаткові можливості як для прискорення загоєння ран (за рахунок стимуляції зростання сполучної, дозрівання грануляційної тканини і епітелізації), так і для максимальної нормалізації перебігу різних фаз ранового процесу.

Нині широке застосування отримали плівкові покриття з лікувальним ефектом на основі полімерних матеріалів. Найчастіше лікарська речовина в пропонованих плівкових матеріалах знаходиться як наповнювач, який дуже швидко дифундує в оточуючі тканини. Це не дозволяє застосовувати плівкові покриття як універсальні при різних патологічних ушкодженнях шкірних покривів. Тому актуальним є створення полімерного матеріалу з власною прорегенераторною активністю, з якого можна надалі отримувати універсальні плівкові покриття та імплантати для лікування різних патологічних процесів. Одним з шляхів отримання полімерних матеріалів з власною біологічною активністю є ковалентне зв'язування лікарської речовини з полімерним носієм [1–3].

© Н. А. Галатенко, Р. А. Рожнова, Д. В. Кулеш, О. С. Андрюшина, І. Б. Демченко, 2013

Як лікарська речовина, що має виражену прорегенераторну дію, привертає до себе увагу фолієва кислота (ФК, N-птероїл-L-глутамінова кислота), яка у складі полімерного носія сприятиме стимуляції регенераторних процесів [4].

ФК виявляє свою біологічну активність за рахунок наявності птерединового циклу шляхом приєднання атомів водню до атомів вуглецю і азоту в положеннях С-6, С-7 і N-5, N-8 з утворенням тетрагідрофолієвої кислоти, яка виконує біохімічну функцію коферменту в міжмолекулярному транспорті одновуглецевих груп різної міри окислення [5], що є дуже важливим для подальшого синтезу нуклеїнових кислот (РНК і ДНК). Введення до складу полімерного носія ФК дозволить отримати полімерний матеріал з прорегенераторними властивостями.

Розробка нових біологічно активних полімерних матеріалів або матеріалів з власною біологічною активністю вимагає насамперед підтвердження ефективності при їх використанні, тому дуже важливим є створення моделі операції та визначення показників, за допомогою яких можна буде повною мірою оцінити біологічну активність цього матеріалу.

Ми ставили за мету вивчення ефективності розроблених плівкових матеріалів на основі фолатовмісних поліуретансечовин (ПУС) для їх подальшого використання як нових біологічно активних плівкових покриттів з регенераторними властивостями.

Матеріали і методи. Був синтезований ряд плівкотвірних ПУС на основі МДІ, діамінів (ДА) ГМДА, ДАДФ і ФК при різному молярному співвідношенні ДА : ФК — 1 : 1, 3 : 1, 10 : 1 відповідно [8]. Введення до складу полімерного носія ФК дало можливість отримати матеріали, що мають власну біологічну активність.

Для вивчення фармакокінетики пролонгованої форми ФК була розроблена модель ураження печінки (жирова дистрофія) у білих щурів шляхом алкоголізації 15% розчином етанолу у воді протягом 1 міс. В експерименті використовували білих щурів-самців масою 150–200 г, які були розділені на дві групи. Тваринам першої групи імплантували плівки ПУС без вмісту ФК (контроль), тваринам другої групи — плівки з ФК. Щурів виводили з експерименту на 7-му, 14-ту та 30-ту добу шляхом декапітації. Сироватку крові отримували інкубацією крові в термостаті протягом 30 хв при 37 °С з подальшим центрифугуванням при 3000 об./хв. В отриманій сироватці визначали активність глутаматдегідрогенази (ГлД) методом спектрофотометрії за зміною оптичної щільності НАД-Н₂ при 340 нм за одиницю часу. Як субстрат використовували α-кетоглутарат і солі амонію [6, 7].

Для визначення динаміки вивільнення ФК використовували зразки у вигляді прозорих жовтих плівок розміром 10 × 10 мм² складу макродіізоціанат (МДІ)–фолієва кислота (ФК); МДІ–1,6-гексаметилендіамін (ГМДА)–ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1); МДІ–4,4'-діамінодифенілметан (ДАДФ)–ФК (ДАДФ : ФК = 1 : 1); МДІ–3ГМДА–ФК (ГМДА : ФК = 3 : 1); МДІ–3ДАДФ–ФК (ДАДФ : ФК = 3 : 1) (дослід) та МДІ–ГМДА, МДІ–ДАДФ (контроль). Зразки субкутально імплантували експериментальним тваринам (білим щурам-самцям) на термін 3, 7, 14 і 30 діб. Тварин виводили з експерименту передозуванням ефіром, зразки діставали, промивали дистильованою водою та сушили до постійної маси.

Гістологічні дослідження проведені на 30 білих лабораторних щурах, яким в умовах асептики субкутально імплантували дослідні зразки МДІ–ГМДА і МДІ–ГМДА–ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1). Тварин виводили з експерименту передозуванням ефіром на 14, 30, 60-ту добу після операції. Для морфологічного аналізу після стандартної гістологічної обробки (фіксація в 10% розчині формаліну, дегідратація в зростаючих концентраціях етанолу, заливка в парафін) сполучнотканинної капсули, яка формувалася навколо імпланто-

ваного матеріалу, були виготовлені зрізи завтовшки 10–15 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Результати та обговорення. Проведені фізико-хімічні та фізико-механічні дослідження показали, що у ряді синтезованих ПУС зі збільшенням вмісту ФК зменшувалися значення характеристичної в'язкості, фізико-механічних показників і молекулярної маси (табл. 1). За результатами ексклюзивної хроматографії синтезовані ПУС охарактеризовані як індивідуальні полімери без низькомолекулярних домішок. Свідченням цього є той факт, що синтез відбувався без утворення побічних речовин з витратою всіх вихідних компонентів. Враховуючи можливе подальше використання синтезованих ПУС як імплантаційних матеріалів, оптимальні фізико-механічні властивості має полімер ПУС-4, в якому співвідношення ГМДА : ФК становить 10 : 1.

Відомо, що ФК в організмі впливає насамперед на ферменти — амінотрансферази, що каталізують міжмолекулярне перенесення аміногруп між амінокислотами і кетокислотами. Переамінування відбувається в присутності коферменту — фосфопіридоксалу, який є похідним вітаміну В₆ [6].

Найбільше клініко-діагностичне значення мають дві амінотрансферази — аспартатамінотрансфераза (АСТ) та аланінамінотрансфераза (АМТ). Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові відмічене при цілому ряді захворювань, у тому числі при захворюваннях печінки. При захворюваннях печінки може спостерігатися незначне або сильне підвищення активності ферменту ГлД, залежно від міри залучення паренхіматозних клітин у патологічний процес.

Вивчена фармакокінетика ФК при імплантації фолатовмісних ПУС, синтезованих при молярному співвідношенні ГМДА : ФК як 3 : 1. Під впливом пролонгованої форми ФК через 1 міс. після імплантації активність ГлД в крові алкоголізованих тварин нормалізувалася в порівнянні з активністю цього ферменту в крові тварин контрольної групи (табл. 2).

Таблиця 1. Фізико-хімічні та фізико-механічні властивості ПУС з ФК

Зразок	Співвідношення компонентів	$[\eta]$, 1/1	σ , МПа	ϵ , %	M_n
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

Таблиця 2. Активність ГлД в сироватці крові щурів, яким імплантували плівки ПУС з ФК (нмоль/(см³·хв))

Норма	7 діб		14 діб		1 міс.	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
0,51	1,54	1,02	1,64	1,23	1,23	0,41
0,77	1,64	0,92	1,64	0,80	1,44	0,82
0,62	1,59	1,13	1,60	0,72	1,34	0,62
\bar{A}						
0,63 ± 0,08	1,59 ± 0,029	1,02 ± 0,06	1,63 ± 0,014	0,92 ± 0,16	1,34 ± 0,06	0,62 ± 0,12
t коефіцієнт Стьюдента						
		8,6	4,4		5,5	

Примітка. Норма — активність ГлДГ в сироватці нормальних щурів, контроль — в сироватці алкоголізованих щурів, яким імплантували плівку ПУС, дослід — в сироватці алкоголізованих щурів, яким імплантували ПУС плівку з ФК.

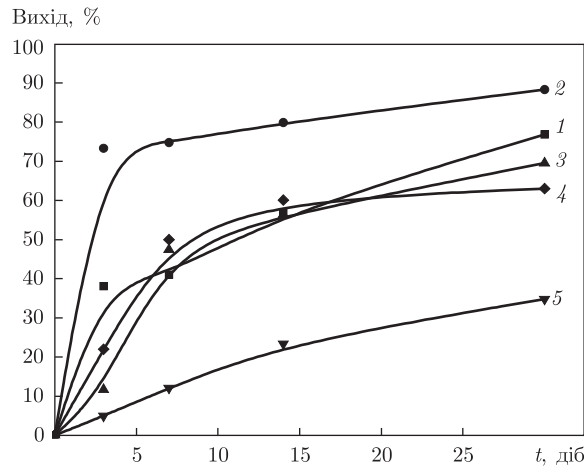


Рис. 1. Динаміка вивільнення ФК з полімерних лікарських форм *in vivo*:
 1 — МДІ-ФК; 2 — МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1); 3 — МДІ-ДАДФ-ФК (ДАДФ : ФК = 1 : 1); 4 — МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 3 : 1); 5 — МДІ-ЗДАДФ-ФК (ДАДФ : ФК = 3 : 1)

При розробці нових імплантаційних матеріалів з біологічною активністю одним з найважливіших етапів роботи є вивчення динаміки вивільнення біологічно активної речовини в оточуючі тканини. Динаміку вивільнення водорозчинних лікарських препаратів з полімерних носіїв *in vitro*, як правило, вивчають в модельних середовищах (дистильована вода або фізіологічний розчин) [9]. У зв'язку зі слабкою розчинністю ФК у воді [10] вивчення динаміки вивільнення проводили шляхом спектрофотометричного визначення залишкової кількості ФК в дослідних ПУС після їх імплантації в організм експериментальних тварин. Кількість ФК, яка вивільнялася в оточуючі імплантат тканини, розраховували за різницею між відомою кількістю ФК, введеної в полімер до імплантації, та кількістю ФК, знайденої за калібрувальним графіком після імплантації [7].

Як показали проведені дослідження (рис. 1, а), для зразків усіх досліджуваних ПУС характерне поступове вивільнення ФК. Сумарна кількість вивільненої ФК зі зразків ПУС в організм експериментальних тварин становила 34,8–88,3% загальної кількості іммобілізованого препарату. Найінтенсивніше ФК вивільнялася зі зразків ПУС, де як подовжувач макроланцюга був використаний ГМДА, що можна пояснити наявністю більш гнучких сегментів макромолекули. Можна припустити, що в зразках ПУС, де подовжувачем макроланцюга є ДАДФ, інтенсивному вивільненню ФК перешкоджають жорсткі сегменти ароматичних кілець діаміну.

З метою вивчення клітинних реакцій на імплантацію дослідних зразків були проведені гістологічні дослідження.

Макроскопічно навколо імплантованих зразків на всіх термінах дослідження спостерігалася сполучнотканинна капсула, яка була щільно з'єднана з поверхнею зразків, за кольором та структурою не відрізнялася від оточуючих тканин.

Через 14 діб після операції навколо імплантованих зразків МДІ-ГМДА спостерігалася тонка, повністю сформована та зріла сполучнотканинна капсула, що містила в своєму складі пучки колагенових волокон і веретеноподібні фібробластичні елементи між ними. На окремих ділянках відмічалися залишкові явища круглоклітинної інфільтрації, основними елементами якої були лімфоцити і макрофаги (див. рис. 2, а). На цьому терміні дослідження виявлялися поодинокі кровоносні судини з нормальною мікроциркуляцією.

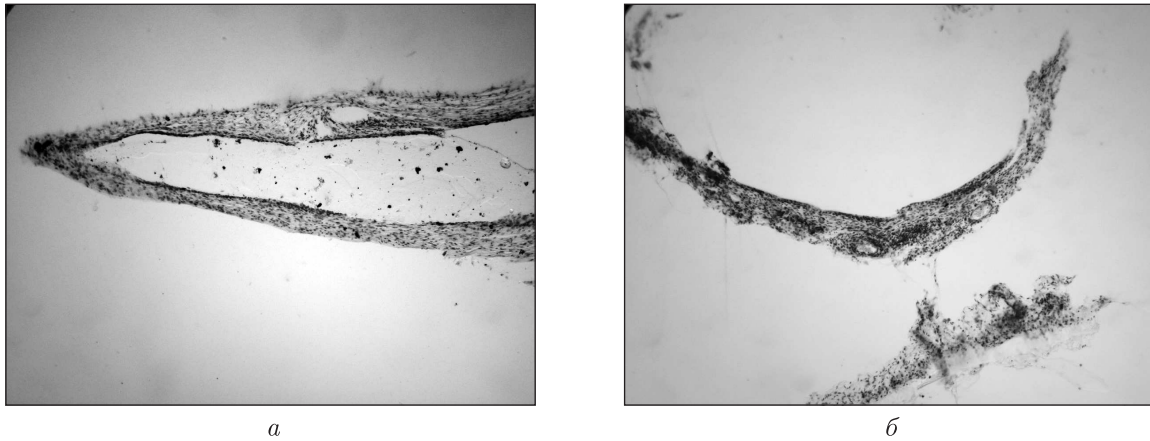


Рис. 2. Сполучнотканинна капсула навколо імплантованого зразка МДІ-ГМДА на 14-ту добу (а) та фрагмент сполучнотканинної капсули з яскраво вираженою круглоклітинною інфільтрацією і повнокровними кровоносними судинами через 1 міс. після імплантації (б). Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 100$

Через 1 міс. після операції навколо імплантованих зразків серії МДІ-ГМДА спостерігалася зріла сполучнотканинна капсула. На окремих ділянках внутрішній шар капсули характеризувався наявністю яскраво вираженої круглоклітинної реакції (див. рис. 2, б). Товщина капсули збільшувалася за рахунок проліферації фібробластичних елементів і активного синтезу ними колагенових волокон. При цьому в кровоносних судинах відзначено погіршення мікроциркуляторних процесів — виявлялося багато повнокровних і розширених судин.

Через 3 міс. після операції навколо імплантованого зразка МДІ-ГМДА сполучнотканинна капсула мала різний ступінь зрілості по всій своїй довжині. На одних ділянках спостерігалися пучки колагенових волокон з веретеноподібними фібробластами між ними, на інших характерною була яскраво виражена круглоклітинна реакція, переважаючими клітинними елементами якої були макрофаги. Потрібно відзначити, що на цьому терміні дослідження виявлено багато новоутворених кровоносних судин невеликого розміру з нормальною мікроциркуляцією.

Таким чином, клітинні реакції на імплантацію зразків МДІ-ГМДА на ранніх термінах дослідження (до 14 доби) були типовими для асептичного запалення. На більш пізніх термінах дослідження (1 та 3 міс.) ступінь зрілості сполучнотканинної капсули був різним і носив подвійний характер: на деяких ділянках спостерігалися пучки густорозташованих колагенових волокон і веретеноподібних фібробластів між ними, на інших — була наявна яскраво виражена круглоклітинна реакція, в основному макрофагальна. Фактичне зростання кількості макрофагів може свідчити про збільшення фагоцитарної активності та, як наслідок, про можливий процес деструкції полімерного зразка під дією внутрішнього середовища організму експериментальних тварин.

На 14-ту добу після операції навколо імплантованих зразків МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1) формувалася досить тонка і зріла сполучнотканинна капсула, яка була представлена колагеновими волокнами і веретеноподібними фібробластичними елементами між ними. На окремих ділянках сполучнотканинної капсули відмічалася скупчення лейкоцитів і макрофагів, а також кровоносних судин невеликого діаметра.

Через 1 міс. після операції навколо імплантованих зразків МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1) спостерігалася досить тонка сполучнотканинна капсула (рис. 3, а). На

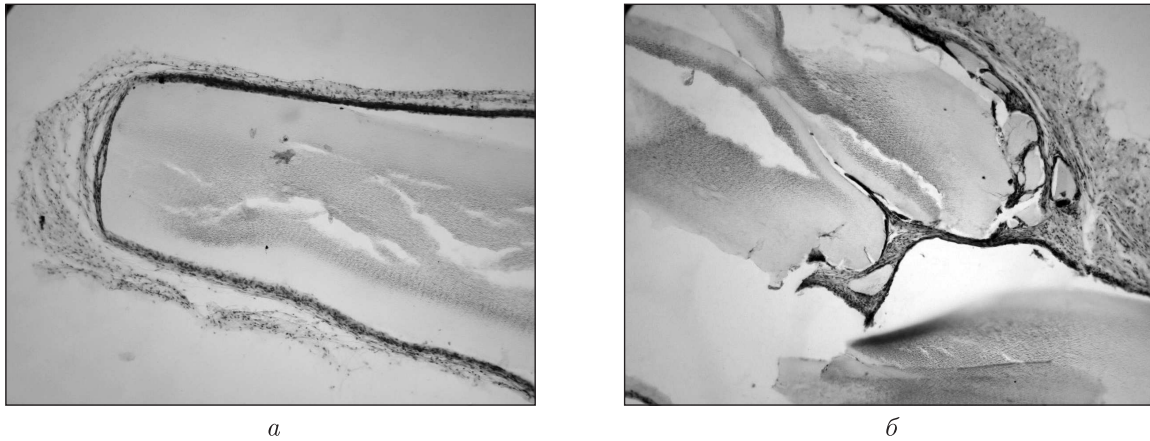


Рис. 3. Сполучнотканинна капсула навколо імпантованих зразків: *а* — МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1) через 1 міс. після імпантації; *б* — МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1) через 3 міс. після імпантації. Забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 100$

окремих ділянках капсули мала місце яскраво виражена круглоклітинна інфільтрація, яка посилювалася порівняно з попереднім терміном дослідження. Кількість кровоносних судин була незначною. Треба відзначити, що на цьому терміні дослідження починалася часткова деструкція імпантованого матеріалу, що виражалось у фрагментації полімерного зразка і проростанні молодій сполучної тканини вглиб полімеру.

Через 3 міс. після операції навколо імпантованого зразка МДІ-ГМДА-ФК (ГМДА : ФК = 1 : 1) гістологічна картина навколо полімерних зразків не відрізнялася від попереднього терміну спостереження. Проте відмічалось посилення процесу біодеструкції полімерного імпантату (рис. 3, *б*).

Таким чином, клітинні реакції на імпантацію полімерного зразка з ФК були характерними для фізіологічної відповіді живого організму на присутність чужорідного тіла. Встановлено, що ФК у складі полімерного матеріалу виявляла стимулюючу дію на клітинні реакції в місці розміщення імпантату, що призводило до утворення тонкої і зрілої сполучнотканинної капсули вже на ранніх термінах дослідження. При цьому значно зменшувалася інтенсивність інфільтрації лейкоцитарними і лімфоцитарними елементами. Макрофаги характеризувалися яскраво вираженою фагоцитарною активністю, що виявлялося в збільшенні їх кількості та частковій біодеструкції матеріалу вже через 1 міс. після імпантації.

Отримані результати досліджень свідчать про біологічну активність розроблених полімерних матеріалів, а так само про можливість регулювання вивільнення ФК з ПУС шляхом варіювання молярного співвідношення ДА до іммобілізованої лікарської речовини.

Гістологічні дослідження при субкутальній імпантації зразків фолатовмісних ПУС в організм експериментальних тварин показали, що досліджувані полімери є біосумісними. Встановлено, що ФК у складі полімерного матеріалу сприяла інгібуванню запальних процесів у місці імпантації, що приводило до утворення тонкої та зрілої сполучнотканинної капсули вже на ранніх термінах дослідження.

В результаті проведеного дослідження були розроблені нові плівкотвірні фолатовмісні ПУС з власною біологічною активністю, які з успіхом можуть використовуватися як біологічно активні полімерні покриття медичного призначення.

1. *Лившиц В. С.* Полимерные покрытия на раны и ожоги // Хим.-фармацевт. журн. – 1988. – **22**, № 7. – С. 790–795.
2. *Жернова Л. М., Луговська Г. Г., Починюк О. В., Галатенко Н. А.* Поліуретанові плівкові матеріали зі стійкою антибактеріальною активністю, що містять декаметоксин // Композиційні полімерні матеріали. – 2001. – № 10. – С. 139–143.
3. *Коршак В. В., Штильман М. И.* Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. – Москва: Наука, 1984. – 261 с.
4. *Галатенко Н. А., Рожнова Р. А., Андрушина О. С.* Діаміновмісні поліуретансечовини з фолієвою кислотою як полімерні плівкотвірні біологічно активні матеріали медичного призначення // Пат. України на корисну модель. – Заявл. 30.06.10; Опубл. 27.12.10, Бюл. № 24.
5. *Губський Ю. І.* Біологічна хімія. – Київ; Вінниця: Нова книга, 2009. – 664 с.
6. *Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В.* Биохимические исследования в клинике. – Ленинград: Медицина, 1976. – С. 41.
7. *Иванов И. И., Коровкин Б. Ф., Маркелов И. М.* Введение в клиническую энзимологию. – Ленинград: Медицина, 1974. – 277 с.
8. *Андрушина О. С., Рожнова Р. А., Галатенко Н. А., Наражайко Л. Ф.* Синтез та властивості біологічно активних поліуретансечовин з фолієвою кислотою // Наук. зап. НаУКМА. Хім. науки і технології. – 2010. – **105**. – С. 47–50.
9. *Рожнова Р. А., Галатенко Н. А., Савицька О. С. та ін.* Дослідження ефективності полімерних лікарських форм НПЗП на основі сегментованих поліуретанових еластомерів *in vivo* // Полімер. журн. – 2008. – **30**, № 3. – С. 256–261.
10. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. – Москва: Медицина, 1998. – Ч. 1. – 736 с.

*Институт хімії високомолекулярних сполук
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 21.11.2012

**Н. А. Галатенко, Р. А. Рожнова, Д. В. Кулеш, Е. С. Андрушина,
И. Б. Демченко**

Новый полимерный материал пролонгированного действия для лечения ран и ожогов

Получен новый полимерный материал пролонгированного действия. Изучена фармакокинетика и динамика высвобождения фолевой кислоты из фолатсодержащих полиуретанмочевин разного химического состава. Установлено, что эффективное действие фолатсодержащих полимерных материалов заключается в уменьшении воспалительных реакций при имплантации в организм экспериментальных животных и в образовании зрелой и тонкой соединительнотканной капсулы, что позволяет использовать полученные материалы как биологически активные пленочные покрытия в медицинской практике.

**N. A. Galatenko, R. A. Rozhnova, D. V. Kulyesh, O. S. Andrushina,
I. B. Demchenko**

A new polymeric material with prolonged action for treatment of wounds and burns

A new polymeric material with prolonged action is obtained. The pharmacokinetics and the drug release of folic acid from polyurethane ureas with various chemical compounds are studied. It is established that the effective action of folate-containing polymeric materials consists in the inhibition of inflammatory reactions at the implantation and in the formation of mature and thin connective-tissue capsules that allows one to use the obtained materials as biologically active film coverings in medical practice.