УДК 678.65:661.78:577.164.1

Л. В. Макеєва, І. І. Гладир, Р. А. Рожнова, Н. А. Галатенко, Т. Ю. Закашун, В. П. Гриценко

Біологічно активні поліуретансечовини з фізично іммобілізованим фолат-кон'югованим фероценом

(Представлено академіком НАН України Є. В. Лебедевим)

Синтезовано нові поліуретансечовини на основі поліоксипропіленгліколю та 2,4-,2,6-толуїлендіізоціанату з використанням діамінів (1,6-гексаметилендіамін або 4,4'-діамінодифенілметан) як подовжувачів макроланцюга з фізично іммобілізованим фолат-кон'югованим фероценом. Проведено ІЧ спектроскопічні та фізико-механічні дослідження отриманих полімерних матеріалів. Дослідження фармакокінетики пролонгованої форми фолат-кон'югованого фероцену в складі поліуретансечовин свідчать про біологічну активність синтезованих полімерів.

Сучасний розвиток хімії високомолекулярних сполук потребує нових полімерних матеріалів із заданими властивостями для потреб хірургії. Значна увага приділяється розробці плівкових покриттів із власною біологічною активністю, полімерних систем з адресним терапевтичним впливом та біологічно ативних імплантаційних матеріалів [1, 2].

Одним із шляхів надання біологічної активності є фізична іммобілізація на обраному полімерному носії лікарських речовин, вітамінів, металоорганічних сполук тощо. Як результат, отримані матеріали володіють здатністю пролонговано вивільняти біологічно активну речовину безпосередньо в місце використання, тим самим проявляючи свою лікувальну дію.

Поліуретансечовини (ПУС) є перспективними матеріалами, які можуть бути використані при створенні плівкових матеріалів, здатних стимулювати регенеративні процеси. Відомо [3, 4], що на основі ПУС отримано полімерні плівкові матеріали з власною біологічною активністю. Раніше [5] нами був синтезований фолат-кон'югований фероцен (ФКФ), який стимулює ріст фібробластичних і гістіоцитарних елементів в умовах тканинної культури. Введення ФКФ до складу ПУС дозволить отримати нові плівкові матеріали, які здатні проявляти біологічну активність у місці використання.

Мета нашого дослідження — синтез біологічної активності нових плівкових матеріалів, отриманих на основі ПУС шляхом фізичної іммобілізації ФКФ.

Експериментальна частина. *Матеріали.* Фолат-кон'югований фероцен синтезували, згідно з методом, описаним у роботі [6]. Поліоксипропіленгліколь (ПОПГ) з ММ 1000 сушили при залишковому тиску 3 мм рт. ст. при температурі (80 ± 5) °С у течії сухого аргону впродовж 8 год безпосередньо перед синтезом. 2,4-,2,6-Толуїлендіізоціанат (ТДІ) ("Merck") — суміш ізомерів з масовим співвідношенням 80/20%, очищали перегонкою у вакуумі при залишковому тиску 3 мм рт. ст. при температурі кипіння 78–80 °С; використовували свіжоперегнаним. 1,6-Гексаметилендіамін (ГМДА) ("Merck") та 4,4′-діамінодифенілметан (ДАДФ) ("Fluka") застосовували без додаткового очищення. N,N-диметилацетамід (ДМАА) ("Merck") переганяли з сумішшю бензен–вода у вакуумі при температурі кипіння (52 ± 1) °С при тиску 14 мм рт. ст.

© Л. В. Макеєва, І. І. Гладир, Р. А. Рожнова, Н. А. Галатенко, Т. Ю. Закашун, В. П. Гриценко, 2014

Синтез поліуретансечовин з фізично іммобілізованим фолат-кон'югованим фероценом. Полімерні матеріали з фізично іммобілізованним ФКФ отримували у дві стадії. На першій — синтезували діізоціанатний форполімер (ДФП) на основі ПОПГ і ТДІ при мольному співвідношенні 1 : 2 з використанням діамінів як подовжувачів макроланцюга, а саме, ГМДА та ДАДФ. Плівковий матеріал формували з 20%-го розчину полімеру в ДМАА з подальшим висушуванням у сушильній шафі при (70 ± 5) °С впродовж 72 год. На другій — здійснювали фізичну іммобілізацію ФКФ, синтезованого раніше [6]. Наважки кон'югата в кількості 0,5% маси полімеру розчиняли у ДМАА, додавали до 20%-го розчину полімеру, виливали на тефлонові підкладинки та висушували в сушильній шафі при (70 ± 5) °С впродовж 72 год. Таким чином, було отримано полімерні матеріали у вигляді прозорих плівок жовтого кольору, розчинних у полярних розчинниках.

Методи досліджень. Хімічну будову синтезованих речовин досліджували методом ІЧ спектроскопії. Спектри поглинання реєстрували на ІЧ спектрометрі "Bruker" з перетворенням Фур'є "Tensor-37" в області 600–4000 $см^{-1}$. Зразки полімерних плівок знімали методом ППВВ на відбиття. Віднесення смуг поглинання здійснено, згідно з даними роботи [7].

Показники міцності на розрив (σ) та відносного подовження (ε) синтезованих полімерних плівок визначали за допомогою розривної машини FU-1000 при швидкості руху зажиму 70 мм/хв, згідно з вимогами ГОСТу 25.601 [8].

Для вивчення фармакокінетики ПУС з фізично іммобілізованим ФКФ було розроблено модель ураження печінки (жирова дистрофія) шляхом алкогольної інтоксикації [4]. Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 150–200 г. Дослідних тварин розділили на чотири групи:

першій — імплантували плівки на основі ДФП і ГМДА, які не містять ФКФ (контроль 1);

другій — імплантували зразки ПУС на основі ДФП і ГМДА, що містять 0,5% ФКФ (дослід 1);

третій — імплантували плівки на основі ДФП і ДАДФ, які не містять ФКФ (контроль 2);

четвертій — імплантували зразки ПУС на основі ДФП і ДАДФ, що містять 0,5% ФКФ (дослід 2).

Тварин виводили з експерименту на 7, 14 та 30 добу методом декапітації. Сироватку крові отримували шляхом інкубування крові в термостаті впродовж 30 хв при температурі 37 °С з подальшим центрифугуванням при 3000 об/хв; використовували для визначення активності глутаматдегідрогенази (ГлДГ) спектрофотометричним методом [9].

Активність ферменту визначали за зміною оптичної густини (ΔE) НАД-$Н_2$ при 340 нм за одиницю часу. Як субстрат використовували α-кетоглутарат та солі амонію.

Результати та їх обговорення. Проведеними фізико-механічними дослідженнями встановлено таке: високу міцність на розрив і відносне подовженя мають зразки полімерів з фізично іммобілізованим ФКФ, в яких як подовжувач макроланцюга було використано 1,6-ГМДА (табл. 1).

Таблиця 1. Міцнісні характеристики синтезованих полімерів

Номер зразка	Склад композиції	σ, МПа	ε, %
1	ДФП + ГМДА	$4{,}69 \pm 0{,}08$	$139 \pm 3{,}5$
2	ДФП + ГМДА + 0,5% ФКФ	$4{,}80 \pm 0{,}11$	219 ± 17
3	ДФП + ДАДФ	$2{,}74 \pm 0{,}05$	$44 \pm 8{,}2$
4	ДФП + ДАДФ + 0,5% ФКФ	$2{,}50 \pm 0{,}04$	$53 \pm 0{,}8$

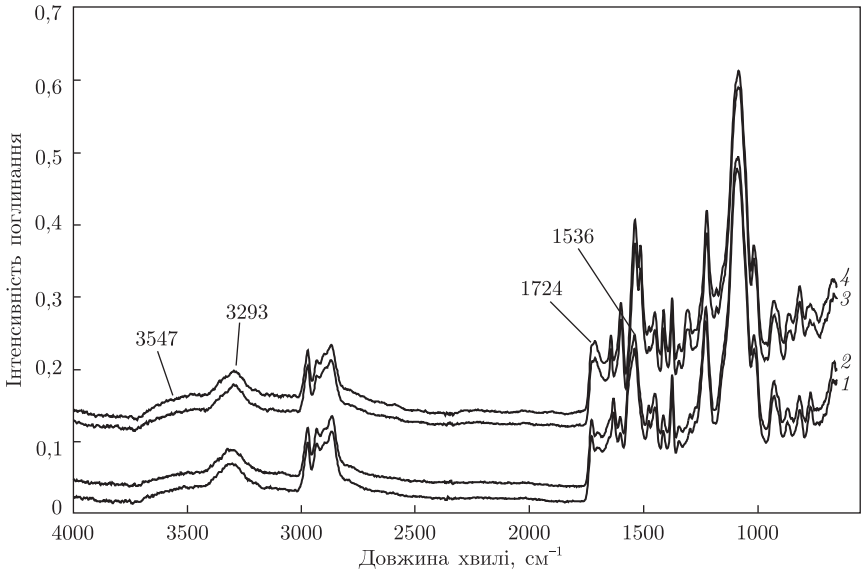

Рис. 1. ІЧ-спектри: *1* — ДФП + ГМДА; *2* — ДФП + ГМДА + 0,5% ФКФ; *3* — ДФП + ДАДФ; *4* — ДФП + + ДАДФ + 0,5% ФКФ

ІЧ-спектри синтезованих полімерів ілюструє рис. 1. Наявність смуг коливань ν_{NH} при 3293 см$^{-1}$, $\nu_{C=O}$ при 1724 см$^{-1}$ і δ_{NH} при 1536 см$^{-1}$ свідчить про те, що отримані полімерні матеріали є ПУС. На ІЧ-спектрах спостерігається поява широкої смуги в інтервалі від 3400 до 3700 см$^{-1}$ з приблизним максимумом при 3547 см$^{-1}$, що свідчить про утворення водневих зв'язків NH-групами.

Дослідження біологічної активності ФКФ методом культури тканин [5] дозволили встановити, що кон'югат, внесений до тканинної культури, стимулює ріст фібробластичних і гістіоцитарних елементів на всіх етапах культивування. З метою вивчення біологічної активності розроблених матеріалів були проведені дослідження фармакокінетики пролонгованої форми ФКФ.

Активність ГлДГ ($\overline{A}$) у сироватці крові визначається з метою діагностики захворювань печінки. При захворюваннях печінки може спостерігатися незначне або сильне підвищення активності ферменту ГлДГ залежно від ступеня залучення паренхіматозних клітин до патологічного процесу.

Активність ферменту $\overline{A}$ визначається у наномолях субстрату (α-кетаглутарової кислоти), перетвореного за 1 хв 1 см^3 сироватки крові. Розрахунки проводили за формулою:

$$\overline{A} = \frac{(E_1 - E_2) \cdot 1000}{5 \cdot 1{,}95},$$

де E_1 і E_2 — екстинції при першому і другому вимірюваннях; 1000 — коефіцієнт перерахунку в нмоль; 5 — коефіцієнт перерахунку на 1 хв інкубації; 1,95 — коефіцієнт екстинції 1 мкмоль НАД-H_2, розчиненого в інкубаційній суміші.

Результати проведених досліджень демонструють табл. 2 і 3, згідно з якими активність ГлДГ у сироватці крові дослідних тварин, яким імплантували поліуретанові композиції з ФКФ, значно нижча, ніж у крові дослідних тварин, яким імплантували контрольну плівку. Отже, $\overline{A}$ ГлДГ у сироватці крові дослідних тварин, яким імплантували ПУС, що наповнені ФКФ, зменшується, наближається до контролю і на 30 добу імплантації становить 0,51 та

Таблиця 2. Активність глутаматдегідрогенази у сироватці крові дослідних тварин, яким імплантували плівки з ДФП + ГМДА і ДФП + ГМДА + 0,5% ФКФ, нмоль/(см^3 · хв)

Норма*	7 діб		14 діб		1 місяць	
	Контроль**	Дослід***	Контроль**	Дослід***	Контроль**	Дослід***
0,41	1,23	0,62	1,44	0,62	1,03	0,51
0,51	1,23	0,41	1,12	0,72	1,44	0,41
0,51	0,92	0,72	1,23	0,92	1,95	0,41
0,41	1,33	0,82	1,23	0,82	1,23	0,72
$\bar{A} = 0{,}43\pm$ $\pm 0{,}06$	$\bar{A} = 1{,}18\pm$ $\pm 0{,}089$	$\bar{A} = 0{,}64\pm$ $\pm 0{,}099$	$\bar{A} = 1{,}26\pm$ $\pm 0{,}014$	$\bar{A} = 0{,}77\pm$ $\pm 0{,}065$	$\bar{A} = 1{,}41\pm$ $\pm 0{,}198$	$\bar{A} = 0{,}51\pm$ $\pm 0{,}073$
	Коефіцієнт Стьюдента					
	$t_{\text{табл}} = 3{,}75$	$t = 4{,}06$		$t = 5{,}25$		$t = 4{,}26$

Тут і в табл. 3: * — активність ГлДГ у сироватці крові здорових щурів; ** — активність ГлДГ у сироватці крові дослідних тварин, яким імплантували плівку без ФКФ (контроль); *** — активність ГлДГ у сироватці крові дослідних тварин, яким імплантували дослідну плівку.

Таблиця 3. Активність глутаматдегідрогенази у сироватці крові дослідних тварин, яким імплантували плівки з ДФП+ДАДФ і ДФП+ДАДФ+0,5% ФКФ, нмоль/(см^3 · хв)

Норма*	7 діб		14 діб		1 місяць	
	Контроль**	Дослід***	Контроль**	Дослід***	Контроль**	Дослід***
0,41	1,74	0,92	1,44	0,72	1,65	0,41
0,51	2,05	0,41	1,44	0,51	1,74	0,62
0,51	1,65	0,41	1,03	0,62	2,26	0,41
0,41	1,74	0,41		0,62	1,23	0,41
$\bar{A} = 0{,}43\pm$ $\pm 0{,}06$	$\bar{A} = 1{,}80\pm$ $\pm 0{,}088$	$\bar{A} = 0{,}54\pm$ $\pm 0{,}099$	$\bar{A} = 1{,}30\pm$ $\pm 0{,}137$	$\bar{A} = 0{,}62\pm$ $\pm 0{,}043$	$\bar{A} = 1{,}85\pm$ $\pm 0{,}139$	$\bar{A} = 0{,}46\pm$ $\pm 0{,}053$
	Коефіцієнт Стьюдента					
	$t_{\text{табл}} = 5{,}84$	$t = 8{,}03$	$t_{\text{табл}} = 4{,}26$	$t = 4{,}70$	$t_{\text{табл}} = 5{,}84$	$t = 9{,}36$

0,46 нмоль/(см^3 · хв) при нормі активності даного ферменту в крові тварин контрольної групи — 0,43 нмоль/(см^3 · хв). Різниця статистично достовірна при р-0,98; Р-0,02; $t_{\text{табл}} < t_{\text{експ}}$ (3,75 < 4,06; 3,75 < 5,25; 3,75 < 4,26; 3,75 < 4,70), при р-0,99; Р-0,1; $t_{\text{табл}} < t_{\text{експ}}$ (5,84 < 8,03; 5,84 < 9,36) [10]. Тобто пролонгована форма ФКФ в складі ПУС проявляє біологічну активність.

Таким чином, синтезовано нові поліуретансечовини на основі діізоціанатного форполімеру та діамінів різної будови, які містять 0,5% за масою фолат-кон'югованого фероцену. Результати фізико-механічних досліджень свідчать, що високу міцність на розрив і відносне подовження мають зразки полімерів з фізично іммобілізованим ФКФ, у яких як подовжувач макроланцюга було використано 1,6-ГМДА. Проведені дослідження по вивченню фармакокінетики ФКФ, іммобілізованого на ПУС, свідчать про біологічну активність синтезованих полімерних матеріалів.

Розроблені плівкотвірні ПУС можуть бути запропоновані як біологічно активні покриття для лікування ран та опіків.

1. *Мазур Л. М., Рожнова Р. А., Дроздова В. І., Галатенко Н. А.* Синтез нової лікарської форми з амізоном на основі гідрофільного блок-кополіуретану, який містить кополімер N-вінілпіролідону з вініловим спиртом // Полімер. журн. – 2007. – **29**, № 1. – С. 58–66.
2. *Жернова Л. М., Луговська Г. Г., Починок О. В., Галатенко Н. А.* Поліуретанові плівкові матеріали зі стійкою антибактеріальною активністю, що містять декаметоксин // Композиц. полімер. матеріали. – 2001. – № 10. – С. 139–143.

3. *Андрюшина О. С., Рожнова Р. А., Галатенко Н. А., Наражайко Л. Ф.* Синтез та властивості біологічно активних поліуретансечовин із фолієвою кислотою // Наук. зап. НаУКМА. Сер. Хім. науки і технології. – 2010. – **105**. – С. 47–50.
4. *Галатенко Н. А., Рожнова Р. А., Андрюшина Е. С. и др.* Новые биологически активные пленочные покрытия // Пласт. та реконструкт. хірургія. – 2013. – № 1. – С. 45–54.
5. *Демченко И. Б., Галатенко Н. А., Макеева Л. В. и др.* Биологическая активность фолат-конъюгированного ферроцена // Доп. НАН України. – 2013. – № 3. – С. 143–148.
6. *Макеєва Л. В., Гладир І. І., Рожнова Р. А., Демченко І. Б.* Розробка методу синтезу фолат-кон'югованого фероцену // Там само. – 2013. – № 1. – С. 132–137.
7. *Органикум.* Практикум по органической химии. В 2 т. / Г. Беккер, В. Бергер, Г. Домшке, Э. Фангхенель, Ю. Фауст, М. Фишер, Ф. Гентц, К. Говальд, Р. Глух, Р. Майер, К. Мюллер, Д. Павель, Г. Щмидт, К. Шольберг, К. Шветлик, Э. Зейлер, Г. Цеппенфельд. – Москва: Мир, 1979. – Т. 1. – 456 с.
8. *ГОСТ* 25.601–80. Методы механических испытаний композиционных материалов с полимерной матрицей (композитов). Метод испытания плоских образцов на растяжение при нормальной, повышенной и пониженной температурах. – Введ. 01.07.81. – Москва: Изд-во стандартов, 1980. – 22 с.: ил.
9. *Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В.* Биохимические исследования в клинике. – Ленинград: Медицина, 1976. – 383 с.
10. *Кокунин В. А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – **47**, № 6. – С. 776–790.

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, Київ

Надійшло до редакції 10.04.2014

Л. В. Макеева, И. И. Гладырь, Р. А. Рожнова, Н. А. Галатенко, Т. Е. Закашун, В. П. Гриценко

Биологически активные полиуретанмочевины с физически иммобилизированным фолат-конъюгированным ферроценом

Синтезированы новые полиуретанмочевины на основе полиоксипропиленгликоля и 2,4-,2,6-толуилендиизоцианата с использыванием диаминов (1,6-гексаметилендиамин или 4,4′-диаминодифенилметан) как удлинителей макроцепи с физически иммобилизованным фолат-конъюгированным ферроценом. Проведены ИК спектроскопические и физико-механические исследования полученных полимерных материалов. Исследования фармакокинетики пролонгированной формы фолат-конъюгированного ферроцена в составе полиуретанмочевин свидетельствуют о биологической активности синтезированных полимеров.

L. V. Makeieva, I. I. Gladyr, R. A. Roznova, N. A. Galatenko, T. U. Zakashun, V. P. Gryzenko

Bioactive polyurethane ureas with physically immobilized folate-ferrocene conjugate

New polyurethane ureas based on polyoxypropylene glycol and 2,4-,2,6-toluene diisocyanate, using diamines (1,6-hexamethylenediamine or 4,4′-diaminodiphenylmethane) as chain extenders and physically immobilized folate-ferrocene conjugate, are synthesized. IR-spectroscopic, physical, and mechanical investigations are carried out. Pharmacokinetic studies of the prolonged form of folate-ferrocene conjugate, contained in polyurethane ureas, testify to the bioactivity of the obtained polymeric materials.