

І. Б. Демченко, Т. О. Кісельова, Л. Ф. Наражайко, Н. А. Галатенко

Розробка та дослідження біологічно активного полімерного матеріалу з іммобілізованим вінкристином

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Ю. Ю. Керчею)

Розроблено нові композиційні матеріали на основі розгалужених поліетерглікольуретанів (ПЕГУ) з фізично іммобілізованим протипухлинним препаратом вінкристином (ВН), досліджена їх ефективність. Методом ІЧ спектроскопії встановлено вплив ВН на структуру отриманих композитів. За результатами фізико-механічних випробувань введення ВН до складу ПЕГУ не приводить до погіршення його фізико-механічних показників, зберігаються висока еластичність та міцність при розриві. Отриманий плівковий матеріал може бути рекомендований для подальших медико-біологічних випробувань як матеріал для виготовлення оболонок гідрофільних імплантатів.

Сучасна полімерна хімія має великий асортимент полімерних матеріалів для використання як носіїв лікарських речовин (ЛР) при створенні біологічно активних полімерних матеріалів (БАПМ) з пролонгованою лікувальною дією.

Як показав аналіз наукових публікацій, існує цілий ряд систем контрольованого вивільнення лікарських препаратів різних за своєю будовою, хімічною природою, способом застосування та механізмом дії у вигляді гелів [1, 2], емульсій, капсул [3], мікросфер [4], трансдермальних терапевтичних систем [5], міцел, кон'югантів, поліелектролітних комплексів як носіїв фармацевтичних препаратів [6, 7] та протипухлинних агентів [8]. Вони широко застосовуються в медичній практиці для терапії патологій.

Одне з перших місць у світовій медичній практиці займає реконструктивно-відновлювальна хірургія, що розвивається в тісному контакті з полімерною хімією. Пластика молочної залози є окремим напрямом реконструктивної хірургії. До недавнього часу в цій сфері використовувалися в основному силіконові ендопротези. Однак ускладнення й небажані побічні ефекти при їхньому застосуванні [9, 10] (розвиток капсулярних контрактур, фіброзів, гематом, кальцифікація) дали поштовх розвитку нового напрямку — створення ендопротезів молочних залоз з поліуретановим покриттям [11].

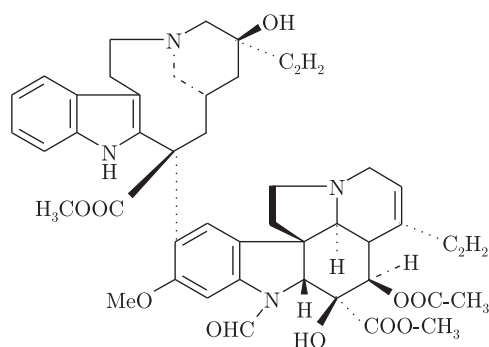
У реконструктивно-пластичній хірургії після мастектомії широке використання імплантатів молочних залоз з поліуретановим покриттям дають гарні естетичні результати та низький ступінь ускладнень [11]. Надання поліуретановому імплантату лікувальних властивостей, зокрема можливості місцево інгібувати розмноження пухлинних клітин, забезпечить підвищення ефективності лікування цього небезпечного захворювання.

Враховуючи високу біосумісність та експлуатаційні характеристики, різноманітність структури та її можливість модифікації, поліуретани є тим класом полімерів як полімерної основи при створенні матеріалів з пролонгованим вивільненням ЛР, який має всі необхідні показники для використання. Було розроблено імплантаційні полімерні матеріали з біологічною активністю на основі біосумісних поліуретанів для лікування патологічних процесів,

а саме пухлин сполучнотканинного походження [12, 13]. Однак залишається ряд невирішених проблем, одна з яких полягає в інгібуванні процесів поділу клітин при солідних пухлинах, меланомі, гемангіомі, канцері молочної залози. Відомо, що одним із важливих прогностичних показників цього захворювання є ангиогенез або судиноутворення. Для росту пухлини необхідне постійне утворення судин, яке забезпечує живлення та виділення продуктів життєдіяльності.

Для роз'язання проблем, пов'язаних з можливістю повторного утворення пухлин з клітин навколишньої тканини, нами було поставлено завдання розробити плівковий матеріал для оболонок гідрофільних імплантатів молочної залози, який має цитостатичний ефект у місці використання.

Перспективним фармакологічним препаратом для цілей іммобілізації на полімерному носії є вінкрисдин (*Vincristine*) — 22-Оксовінкалейкобластин (у вигляді сульфату 1 : 1), $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$:

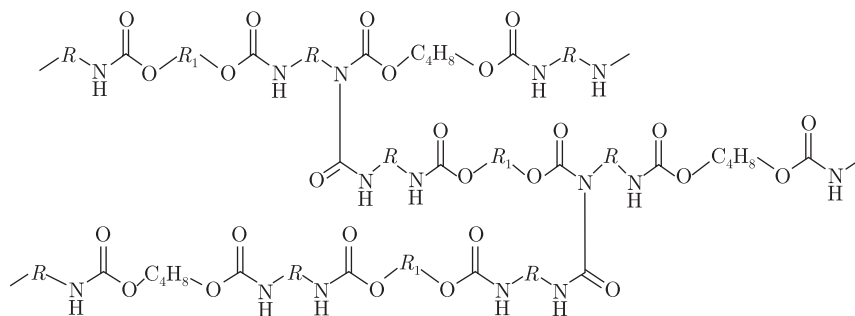


Вінкрисдин (ВН) — виявляє цитотоксичну дію, оскільки вибірково пригнічує синтез РНК і ДНК. При введення 0,001 г/мл препарату гнітється множення клітин. Цитотоксичний ефект виявляється в основному на гранулопоезі, меншою мірою — на мегакарію й еритропоезі. В малих дозах він впливає на М-фазу, у більших — на всі фази мітотичного циклу. Застосовується при канцері молочної залози й інших пухлинах (лімфомах, меланомах тощо).

Залежно від області застосування кожний імплантаційний матеріал повинен мати певні фізико-механічні властивості. Поліуретановий матеріал, придатний для ендопротезування м'яких тканин, поряд з достатньою міцністю при розриві повинен мати високу еластичність. Ми вважаємо, що розгалужені поліетерглікольуретани (ПЕГУ) підходять за своїми показниками для цих цілей. Розгалужені ПЕГУ були синтезовані на основі поліоксипропіленгліколю (ПОПГ 1000), 2,4-; 2,6-толуїлендіізоціанату (ТДІ 80/20), 1,4-бутандіолу (БД) як подовжувача макроланцюга. Реакцію проводили при варіюванні кількості вільних ізоціанатних груп ізоціанатного форполімеру від 6,99 до 9,50% [14].

Відомо [15], що залежно від умов синтезу поліуретанів (ПУ) крім основних реакцій уретаноутворення можливе проходження побічних, що супроводжуються виникненням вторинних зв'язків — алофанатних і біуретових, які й визначають просторову будову полімеру. Розгалуження лінійних ПУ, отриманих з діолу і діізоціанату (у нашому випадку — з ізоціанатних форполімерів з надлишком вільних NCO-груп), може відбуватися внаслідок формування алофанатів. Розгалужена будова синтезованих ПЕГУ доведена методом ІЧ спектроскопії шляхом якісного визначення вторинних зв'язків по ІЧ-спектрах їх амінолізу діетиламіном [14].

Структурну формулу ПЕГУ представлено таким чином:



де R — залишок ТДІ 80/20; R_1 — залишок ПОПГ 1000.

У результаті вивчення властивостей синтезованих ПЕГУ залежно від вмісту вільних ізоціанатних груп МДІ встановлено, що ПЕГУ на основі ПОПГ, ТДІ й БД із надлишком 7,5% вільних ізоціанатних груп ізоціанатного форполімеру має оптимальні фізико-механічні властивості, характеризується високим вологопоглинанням, повільним перебігом біодеградації зі збереженням високої еластичності [13]. Це дає змогу використовувати його як перспективний матеріал для подальшої модифікації ЛР для отримання імплантаційних біологічно активних імплантаційних матеріалів (БАІМ) з пролонгованою лікувальною дією.

З метою розробки БАІМ на основі розгалужених ПУ, здатних інгібувати ріст пухлини молочної залози, проведена іммобілізація ВН на ПЕГУ. Кількість іммобілізованого препарату на полімерному носії не перевищувала його фармакологічної дози й становила 0,01 й 0,02% за масою. Іммобілізацію ВН здійснювали шляхом його введення в 20% розчин ПЕГУ в N,N' -диметилацетаміді в кількості 0,01 й 0,02 мг на 100 мл розчину, з подальшим перемішуванням впродовж 20 хв при температурі 50 °С. Зразки полімеру з іммобілізованим ВН у вигляді прозорих плівок отримували шляхом поливу композиції на тефлонове коло та сушінням до постійної маси протягом 10 діб при 70 °С.

Отриманий плівковий матеріал був випробований на механічні властивості. Встановлено, що в порівнянні з контролем значних змін у фізико-механічних показниках введення ЛР не чинило. Незначно змінювалася міцність при розриві при введенні 0,02% за масою ВН у полімерну композицію, а введення 0,01% за масою приводило до незначного збільшення відносного подовження (табл. 1).

Таким чином, введення ВН до складу поліуретанового носія істотно не змінює механічні показники полімерного плівкового матеріалу і ВН може бути використаний для виготовлення оболонки молочної залози.

Методом ІЧ спектроскопії були зняті спектри лікарського препарату ВН, полімерного носія ПЕГУ, а також полімеру з фізично іммобілізованим ВН в кількості 0,01, 0,02 й 5,0% за масою. ІЧ-спектр вінкристину характерний для комплексної (координаційної) сполуки.

Таблиця 1. Фізико-механічні властивості біологічно активного полімерного матеріалу з вінкристином

Зразок	Міцність при розриві, МПа	Відносне подовження при розриві, %
ПЕГУ	0,009±0,0009	397
ПЕГУ — 0,01% ВН	0,01±0,001	450
ПЕГУ — 0,02% ВН	0,03±0,003	345

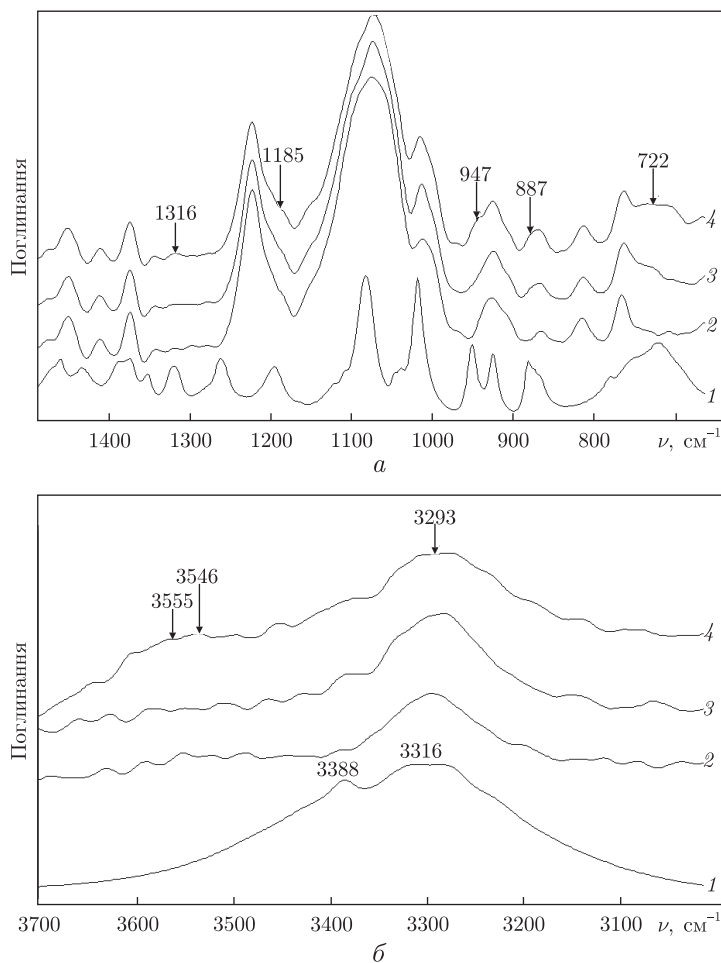


Рис. 1. Фрагмент ІЧ-спектрів (а і б): 1 — вінкристин; 2 — ПЕГУ; 3 — ПЕГУ–0,01% ВН; 4 — ПЕГУ–0,05% ВН

Молекула ВН є складною органічною сполукою в сольовій формі, що пояснює відсутність в її спектрі смуг поглинання естерної групи (COO) карбоксилу, які присутні у вигляді іонної форми (COO⁻). На ІЧ-спектрі ВН (крива 1 на рис. 1, а) основними смугами є смуги валентних і деформаційних коливань СН-зв'язку груп СН, СН₂, СН₃, циклічних і ароматичних кілець, а також смуги валентних коливань третинної ОН-групи. Структура молекули ВН припускає наявність сильних внутрішньо молекулярних зв'язків ОН-груп, а також міжмолекулярних зв'язків, які не руйнуються навіть у водних розчинах. Смуги валентних коливань ОН-груп визначаються піками — 3388 і 3316 см⁻¹ (див. криву 1 на рис. 1, б), а смуги валентних коливань С–О проявляються в області 1000–1200 см⁻¹ (див. криву 1 на рис. 1, а).

При введенні до складу ПЕГУ вінкристину в кількості 0,01 й 0,02% за масою змін на ІЧ-спектрі практично не спостерігається (див. криві 2 і 3 на рис. 1). Деякі зміни відзначаються для ПЕГУ, який містить 5,0% за масою ВН (див. криву 4 на рис. 1, а); кількість препарату було збільшено з метою його кращої ідентифікації на полімерному носії. Спостерігається збільшення інтенсивності та незначне зміщення положень смуг валентних і деформаційних коливань 1316, 1185, 947, 887 і 722 см⁻¹ ПЕГУ внаслідок накладання ана-

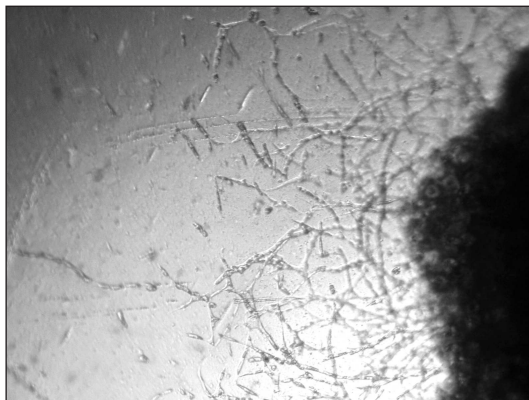


Рис. 2. Формування компактної, сіткоподібної зони, зони мігруючих фібробластичних елементів на 5 добу культивування. Мікрофотографія. Зб. 100

логічних смуг поглинання ВН. Інтенсивна подвійна смуга валентних коливань NH-груп ВН в області $3000\text{--}3700\text{ см}^{-1}$ (див. криву 1 на рис. 1, б), накладається на аналогічну смугу валентних коливань NH-груп ПЕГУ (див. криву 2 на рис. 1, б), але її положення на спектрі ПЕГУ-0,5% ВН залишається без зміни (див. криву 4 на рис. 1, б), тобто ЛР у складі ПЕГУ не змінює своєї структури.

Присутність ВН у більших кількостях (5% за масою) приводить до появи на ІЧ-спектрі ПУ слабкої широкої смуги з максимумом 3555 см^{-1} слабозв'язаних й вільних NH-груп ПУ (див. криву 4 на рис. 1, б), які з'являються в результаті проникнення молекул ВН між молекулами ПУ — фізична іммобілізація. Аналогічні висновки можна зробити і для малих концентрацій ВН.

З метою з'ясування ефективності розробленого біологічно активного плівкового матеріалу нами були проведені дослідження на тканинній культурі підшкірної клітковини білих щурів, що дає в умовах культивування ріст фібробластичних елементів. Досліджувалися такі матеріали: ПЕГУ; ПЕГУ — 0,2% ВН (див. табл. 1).

Полімерний плівковий матеріал з іммобілізованим ВН (ПЕГУ — 0,2% ВН) поміщали у флакони Карелля. Площа плівки у флаконі 1 см^2 . Культивування здійснювали шляхом експлантації матеріалу в згусток плазми. Модельним середовищем слугувало біологічне середовище 199, за контроль брали культивовану підшкірну жирову тканину білих щурів. Для стандартизації характеру росту культур зони класифікували на компактну, сіткоподібну і зону мігруючих клітин, критерієм для виділення яких було розташування зростаючих фібробластичних елементів. Внесення плівкового матеріалу проводили на 3 добу культивування, коли починалася міграція фібробластичних елементів у флаконах. Дослідження росту і розвитку клітинних елементів підшкірної клітковини білих щурів проводили на 5, 7, 10 й 14 добу культивування.

Згідно з проведеними дослідженнями, на 5 добу спостереження в контролі відбувалося формування сіткоподібної зони, зони мігруючих фібробластичних елементів і початок утворення компактної зони (рис. 2)

Внесення в контрольні флакони плівкового матеріалу без ВН (ПЕГУ) на 3 добу не приводить до істотних змін у динаміці росту та розвитку тканинної культури на 5 й 7 добу. Продовжується активне ділення фібробластичних та фібробластоподібних елементів з формуванням третьої компактної зони росту фібробластичних елементів.

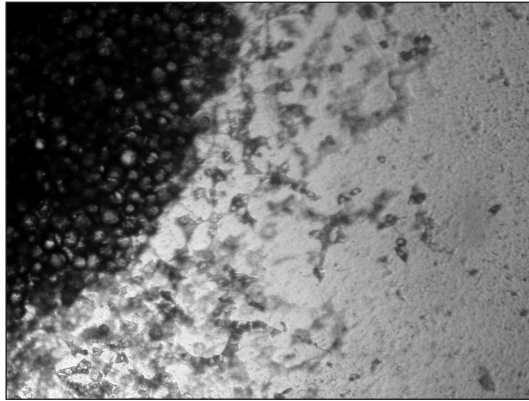


Рис. 3. Дегенеративні зміни фібробластичних елементів на 5 добу культивування. Мікрофотографія. Зб. 100

При внесенні до флаконів плівкового матеріалу ПЕГУ–0,02% ВН на 5 добу спостерігаються дегенеративні зміни фібробластичних елементів, які виражаються у вакуолізації та зернистому переродженні клітин із разом об'єднаними зонами росту (рис. 3). На 7 добу настає повна дегенерація клітин, а клітин, які діляться, не відзначається.

Таким чином, можна зробити висновок, що на основі ПЕГУ з іммобілізованим ВН отриманий плівковий матеріал, який має достатні фізико-механічні показники, проявляє цитотоксичний ефект та може бути рекомендований до подальших медико-біологічних випробувань як матеріал оболонок імплантатів молочної залози, застосовуваних при пухлинах та мастектомії.

1. *Kebuladze I. M.* Application of endoscopic techniques for implantation of PAAG Interfall gel at contour mamma plastic // *Ukr. J. Non-invas. and Endoscop. Surg.* – 2001. – No 4. – P. 7–9.
2. *Patel V., Amiji M.* Preparation and characterization of freeze-dried chitozan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach // *Pharmaceutical Research.* – 1996. – **13**, No 4. – P. 588–593.
3. *Jiang B., Hu L., Gao Ch. et al.* Crosslinked polysaccharide nanocapsules: preparation and drug release properties // *Acta Biomater.* – 2006. – **2**. – P. 9–18.
4. *Marie E., Landfester K., Antonietti M.* Synthesis of chitozan-stabilized polymer dispersions, capsules, and chitosan grafting products via miniemulsion // *Biomacromolecules.* – 2002. – No 3. – P. 475–481.
5. *Markoishvili K., Tsitlanadze G., Katsarava R. et al.* A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds // *Int. J. Dermatol.* – 2002. – **41**. – P. 453–458.
6. *Acosta N., Aranaz I., Peniche C. et al.* Tramadol release from a delivery systems based on alginate-chitosan microcapsules // *Macromolec. Bioscience.* – 2003. – **3**, No 10. – P. 546–551.
7. *Pitarresi G., Cavallaro G., Giammona G. et al.* New hydrogel matrices containing an antiinflammatory agent. Evaluation of in vitro release and photoprotective activity // *Biomaterials.* – 2002. – **23**. – P. 407 – 412.
8. *Park J. H., Kwon S., Lee M. et al.* Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumour activity // *Ibid.* – 2006. – **27**. – P. 119–126.
9. *Collis N., Coleman D., Foo I. T. N. et al.* Ten-year review of prospective randomized controlled trial of textured versus smooth subglandular silicone gel breast implants // *Plastic and Reconstructive Surgery.* – 2000. – **106**. – P. 786–791.
10. *Niessen F. B., Spauwen P. H. M., Robinson P. H. et al.* The use silicone occlusive sheeting (Sil-K) and silicone occlusive gel (epiderm) in the prevention of hypertrophic scar formation // *Ibid.* – 1998. – **6**, No 102. – P. 1962. – 1972.

11. Gasperoni C., Algarello M., Gardani G. Polyurethane coated mammary implants: a 12-year experience // Ann. Plastic Surgery. – 1992. – **29**. – P. 303–308.
12. Галатенко Н. А., Барабой В. А., Толстопятов Б. А. и др. Влияние полимерной композиции с левамизолом на рост саркомы 45 // Эксперимент. онкология. – 1991. – **13**, № 2. – С. 59–62.
13. Рожнова Р. А. Синтез та дослідження розгалужених поліетергліколюретанів в якості імплантацийного матеріалу // Полімер. журн. – 2006. – **28**, № 4. – С. 297–302.
14. Саундерс Дж., Фриш К. Химия полиуретанов. – Москва: Химия, 1968. – 460 с.

Институт хімії високомолекулярних сполук
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 11.11.2013

И. Б. Демченко, Т. А. Киселева, Л. Ф. Наражайко, Н. А. Галатенко

Разработка и исследования биологически активного полимерного материала с иммобилизированным винкристином

Разработаны новые композиционные материалы на основе разветвленных полиэфиргликолюретанов (ПЭГУ) с физически иммобилизированным противоопухолевым препаратом винкристином (ВН), исследована их эффективность. Методом ИК спектроскопии установлено влияние ВН на структуру полученных композитов. По результатам физико-механических испытаний введение ВН в состав ПЭГУ не приводит к ухудшению его физико-механических показателей, сохраняются высокая эластичность и прочность при разрыве. Полученный пленочный материал может быть рекомендован для дальнейших медико-биологических испытаний в качестве материала для изготовления оболочек гидрофильных имплантатов.

I. B. Demchenko, T. A. Kiseleva, L. Ph. Narazhajko, N. A. Galatenko

Development and researches of a biological active polymeric material with immobilized Vincristine

New composite materials on the basis of branched out polyether glycol urethane (PEGU) with physically immobilized antineoplastic preparation Vincristine are developed, and their efficiencies are investigated. The method of IR-spectroscopy established the influence of Vincristine on the structure of the received composites. By results of physical-mechanical tests, the introduction of Vincristine into the structure of PEGU doesn't lead to a deterioration of its physical-mechanical properties, and its high elasticity and tensile strength are conserved. The obtained film material can be recommended for the passing of further medical-biological tests as a material for the production of covers of hydrophilic implants.