

АКТИВНІ ГІДРОГЕЛІ НА ОСНОВІ ДЕКСТРАНМЕТАКРИЛАТІВ

О Дончак В.А., Юр'єв Р.С., Гаргай Х.І., Ріпак Л.М., 2008

Отримано гідрогелі на основі метакрилату декстрану, а також його комплексу з хлоридом піридинію шляхом структурування у водному розчині в присутності редокс-системи $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8 - \text{Et}_3\text{N}$. Водорозчинні високозаміщені комплексні декстранметакрилати дають змогу отримувати активні гідрогелі з залишковими подвійними зв'язками. Одержано гідрогелі з іммобілізованими в їх об'ємі клітинами дріжджів та показано їх зимазну активність.

The hydro gels on the base of both dextran methacrylate and its complex with pyridinium chloride were obtained by the method of curing at the aqueous solution at the presence of red-ox system $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8 - \text{Et}_3\text{N}$. Water soluble high substituted complexes of dextran methacrylates are able to form an active hydro gels, which have residual double bonds. The hydro gels with immobilized yeast cells were obtained and their zymotic activity has been shown.

Постановка проблеми. Створення штучних і синтетичних гідрогелів як полімерних матеріалів з унікальними властивостями (біосумісністю, біодеградабельністю, еластичністю, програмованою зміною характеристик під дією умов навколишнього середовища) стимулювало науковий і технічний прогрес в області високих технологій (біо- та нанотехнологій, біоелектроніці, фармацевтиці тощо). Застосування гідрогелів уможливило розроблення систем цілеспрямованої та контрольованої доставки ліків, ефективних біокаталізаторів на основі іммобілізованих клітин мікроорганізмів та ферментів, біосенсорів, а також біоматеріалів нового покоління. Крім того, дослідження властивостей гідрогелів створили фундамент для появи нового класу полімерних матеріалів, так званих "розумних" матеріалів (smart або intelligent materials), які здатні реагувати наперед заданим способом на зміни параметрів зовнішнього середовища [1–4].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Декстранові гідрогелі завдяки своїй біосумісності і високій біоактивності їх прекурсорів є об'єктом численних досліджень. Синтез таких гідрогелів на основі нових похідних декстрану дає можливість отримувати системи із новими та покращеними властивостями, що розсуває межі їх практичного застосування у різних галузях науки і техніки.

Гідрогелі на основі метакрилату декстрану стали об'єктом різноманітних досліджень, більшість із яких була проведена групою вчених Утрехтського університету (Нідерланди) під керівництвом проф. W.E. Hennink. Ними було вперше отримано гідрогель структуруванням водного розчину метакрилату декстрану [5], запропоновано спосіб отримання гідрогельних мікросфер шляхом полімеризації метакрилату декстрану у водній двофазній системі [6], досліджено кінетику цього процесу [7], а також запропоновано метод визначення вмісту води у таких мікросферах [8]. У роботі [9] було досліджено реологічну поведінку гідрогелів на основі метакрилату декстрану і процес їх набрякання. На основі експериментальних даних був розрахований параметр взаємодії полімер-розчинник, значення якого становило 0,51–0,55 залежно від ступеня заміщення вихідного метакрилату декстрану та вмісту золь-фракції. Порівняльне застосування динамічного механічного аналізу та частотної деформаційної реометрії для характеристики декстранових гідрогелів наведено в роботі [10].

Вивчалась також можливість використання гідрогелів на основі метакрилату декстрану як полімерного носія біологічно-активних речовин. Зокрема, досліджувались біосумісність таких гідрогелів [11], їх цитотоксичність [12], деградація під дією фізіологічних розчинів [13], а також вивільнення із гідрогелів ліпосом [14, 15], модельних протеїнів [16, 17], зокрема рекомбінантного людського інтерлейкіну-2 [18].

Мета роботи. Створення біосумісних гідрогелів з новими та покращеними властивостями на основі нових метакрилатних похідних декстрану для їх перспективного застосування як полімерних біоматеріалів.

Експериментальна частина. Декстранметакрилати одержували ацилюванням декстрану метакрилоїлхлоридом за методикою [19].

Гідрогелі на основі декстранметакрилатів. Наважку декстранметакрилату (25–50 мг) розчиняли в 300–400 мкл води, до утвореного розчину додавали водні розчини амоній персульфату (50 мг персульфату на 1000 мкл води) та триетиламін (61,12 мкл на 1000 мкл води) у кількості 45–91 мкл. Кінцева концентрація декстранметакрилату становила 50–100 г/л, амоній персульфату – 20–40 ммоль/л, а триетиламіну – 40–80 ммоль/л. Отриманий розчин поміщали у поліпропіленовий циліндр із внутрішнім діаметром 10 мм. Висота стовпа суміші у циліндрі становила 8–9 мм. Систему термостатували при 50 °С протягом 1 год. Сформовані гідрогелі виштовхували із циліндра і поміщали у дистильовану воду, де їх витримували протягом 24 год.

Імобілізація дріжджів у гідрогелі. 200 Мг декстранметакрилату розчинили в 4 мл дистильованої води. В утвореному розчині суспендували 500 мг пресованих дріжджів. До суспензії додавали 500 мкл розчинів амоній персульфату та триетиламіну, які містили 16 мг амоній персульфату та 9,6 мкл триетиламіну, відповідно. Систему термостатували при 40 °С протягом 2 год, час від часу струшуючи для запобігання осідання суспензії клітин.

Обговорення результатів. Структурування декстранметакрилату ініціювалось ред-окс системою $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8 - \text{Et}_3\text{N}$. У роботі [7] запропоновано механізм ініціювання такою системою, в якій триетиламін прискорює гомолітичний розпад персульфату із утворенням бісульфатного вільного радикалу. Додатково утворюються вільні радикали триетиламіну (схема 1). Генеровані радикали ініціюють процес структурування ДМА за метакрилатними фрагментами (схема 2).

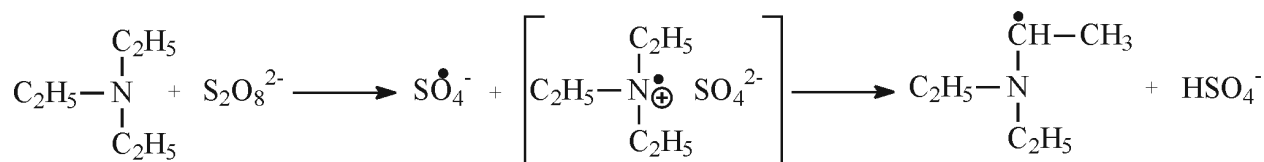


Схема 1

За допомогою такої ред-окс системи були отримані гідрогелі на основі як метакрилату декстрану, так і його комплексу із хлоридом піридинію, причому водорозчинність комплексних декстранметакрилатів дала змогу використовувати для синтезу гідрогелів як низько-, так і високозаміщені зразки.

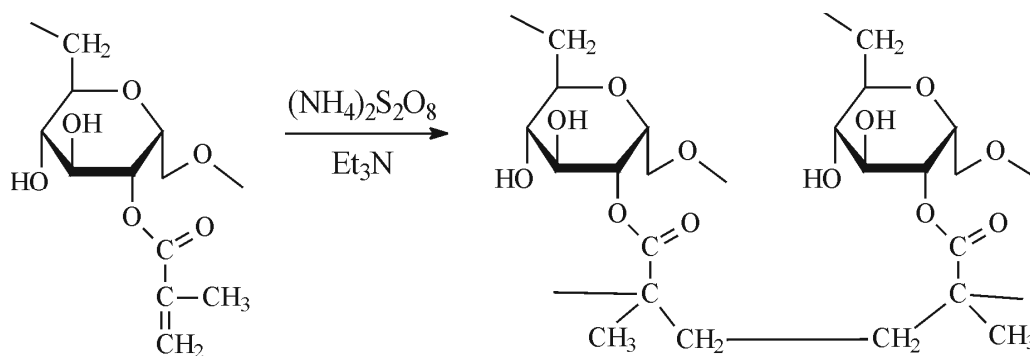
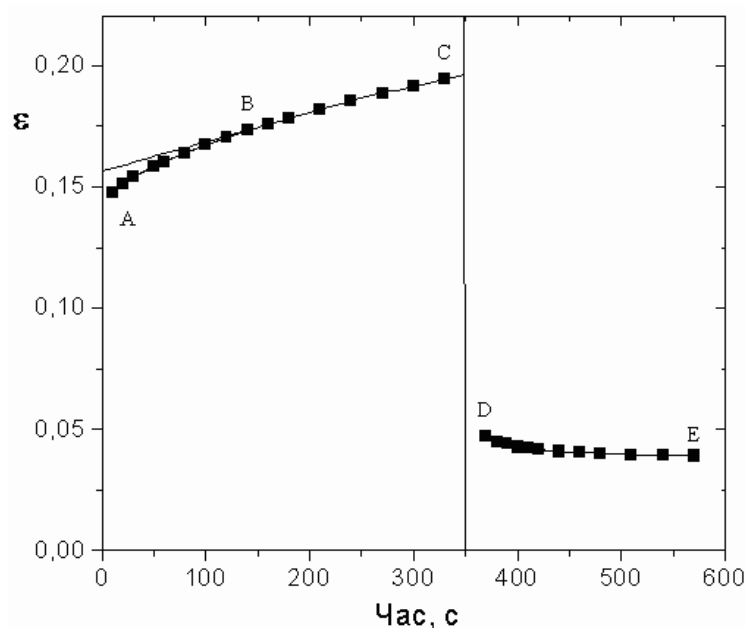


Схема 2

Формування гідрогелів із комплексних декстранметакрилатів є підтвердженням того, що метакрилатні фрагменти в комплексі із хлоридом піридинію зберігають здатність до реакції полімеризації.

Водорозчинні комплекси високозаміщених декстранметакрилатів становлять інтерес для синтезу активних гідрогелів, які містять у своїй структурі залишкові подвійні зв'язки, а також полярні фрагменти хлориду піридинію. Їхня кількість може визначатись ступенем заміщення вихідного декстранметакрилату та ступенем конверсії метакрилатних фрагментів у процесі гелеутворення. При структуруванні декстранметакрилату зі ступенем заміщення 0,41 через 20 год конверсія подвійних зв'язків в отриманому гідрогелі становила 89 %. Високі ступені конверсії подвійних зв'язків спостерігались також авторами роботи [5] при структуруванні декстранметакрилатів, які містили незначну кількість метакрилатних фрагментів. При структуруванні декстранметакрилату зі ступенем заміщення 1,22 гідрогель формувався вже при 10 %-ній конверсії. Залишкові 90 % метакрилатних фрагментів можуть брати участь в інших типах реакцій, наприклад, приєднувати низькомолекулярні реагенти, лікарські препарати, бути центрами графт-кополімеризації тощо.

Графік залежності відносної деформації отриманих гідрогелів від часу прикладення статичного навантаження зображений на рисунку, який також є характерним і для інших реальних еластомерних систем [20].



Залежність між відотною деформацією гідрогелів (ϵ) і часом прикладення статичного навантаження

На кривій, представленій на рисунку, ділянка ABC відповідає зміні відносної деформації при навантаженні, а ділянка DE – при розвантаженні гідрогелю. З рисунка видно, що після прикладення навантаження деформація розвивається миттєво до деякої величини, а далі розвиток деформації в часі описується випуклою кривою AB, яка переходить у пряму BC. Ділянка AB є суперпозицією еластичної деформації і незворотної деформації текучості, тоді як на ділянці BC відбувається процес течії, який є причиною появи у гідрогелю залишкової деформації при розвантаженні (ділянка DE) [20]. Текучість синтезованих гідрогелів, очевидно, свідчить про те, що вони не є суцільно зшитими структурами, а складаються із макромолекулярних конгломератів, які можуть порівняно вільно переміщуватись один відносно одного при прикладеному навантаженні.

Проведення процесу структурування декстранметакрилату в присутності суспензії дріждів дало можливість отримати гідрогель із іммобілізованими в його об'ємі клітинами. Як ініціатор також було використано ред-окс систему $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8 - \text{Et}_3\text{N}$. Процес проводили при 40°C для запобігання термічної інактивації клітин дріждів. Присутність дріждів у системі інгібує структурування декстранметакрилату. Так, розчин декстранметакрилату без додавання суспензії досягав точки гелеутворення менше ніж за 1 годину, тоді як після додавання суспензії дріждів розчин декстранметакрилату цієї самої концентрації в присутності такої самої кількості ініціатора сформував гідрогель лише через 1,5 години. Зимазна активність вихідних пресованих дріждів становила 45 хв. Для порівняння активності вихідних та іммобілізованих дріждів був отриманий гідрогель об'ємом 5 мл, який містив 0,5 г дріждів. До цього гідрогеля додавали 5 мл 20 %-ного розчину глюкози у воді, систему термостатували при 35°C і визначали час, за який виділиться 10 мл вуглекислого газу. Цей час дорівнював 310 хв. Незважаючи на збереження зимазної активності іммобілізованих дріждів, її величина є значно меншою, ніж у вихідних пресованих дріждів. Однак зниження зимазної активності може бути пояснене не лише відмиранням клітин в процесі структурування декстранметакрилату, а й появою нового дифузійного бар'єра – об'єму гідрогеля, який необхідно подолати глюкозі та мінеральним солям перед тим як бути включеними в процес метаболізму клітини дріждів. Понизити цей бар'єр можна шляхом зменшення ступеня зшивки гідрогеля.

Висновки. Показано, що високо заміщені комплексні декстранметакрилати є перспективними прекурсорами для синтезу активних гідрогелів. Вперше проведено іммобілізацію клітин дріждів у гідрогелях на основі декстранметакрилатів та виявлено в них наявність зимазної активності.

1. *Polymer of Biological and Biomedical Significance* // ACS Symposium Series 540, American Chemical Society, Washington, DC. 1994. 2. Schacht E. *Modification of Dextran and Application in Prodrug Design* // *Ind. Polysaccharides: Genet. Eng. Struct.* 1987. – P. 389–400. 3. US Patent 4808709. *Matrix polymer and its preparation.* 4. Галаев И. “Умные” полимеры в биотехнологии и медицине // *Успехи химии.* – 1995. – 64, (5). – С. 505–524. 5. W.N.E. van Dijk-Wolthuis, O. Franssen, H. Talsma, M.J. Steenbergen, J.J.K. van Bosch, W.E. Hennink. *Synthesis, characterization, and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran* // *Macromolecules.* – 1995. – 28. – P. 6317–6322. 6. Robert J.H. Stenekes, Okke Franssen, Elvira M.G. van Bommel, Daan J.A. Crommelin, Wim E. Hennink. *The Preparation of Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics* // *Pharmaceutical Research.* – 1998. – 15, (4). – P. 557–561. 7. Stenekes R.J.H., Hennink W.E. *Polymerization kinetics of dextran-bound methacrylate in an aqueous two phase system* // *Polymer.* – 2000. – 41, (15). – P. 5563–5569. 8. Stenekes R.J.H., Hennink W.E. *Equilibrium water content of microspheres based on cross-linked dextran* // *International Journal of pharmaceutics.* – 1999. – 189, (2). – P. 131–135. 9. De Smedt S.C., Lauwers A., Demeester J., Van Steenbergen M.J., Hennink W.E., Roefs S.P.F.M. *Characterization of the network structure of dextran glycidyl methacrylate hydrogels by studying the rheological and swelling behavior* // *Macromolecules.* – 1995. – 28. – P. 5082–5088. 10. Tom K.L. Meyvis, Barbara G. Stubbe, Mies J. Van Steenbergen, Wim E. Hennink, Stefaan C. De Smedt, Joseph Demeester. *A comparison between the use of dynamic mechanical analysis and oscillatory shear rheometry for the characterisation of hydrogels* // *International Journal of pharmaceutics.* – 2002. – 244, (1). – P. 163–168. 11. De Groot C.J., Van Luyn M.J.A., Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Cade'e J.A., Plantinga J.A., Otter W.D., Hennink W.E. *In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts* // *Biomaterials.* – 2001. – 22, (11). – P. 1197–1203. 12. Trudel J., Massia S.P. *Assessment of the cytotoxicity of photocrosslinked dextran and hyaluronan-based hydrogels to vascular smooth muscle cells* // *Biomaterials.* – 2002. – 23, (16). – P. 3299–3307. 13. Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Hoogeboom J.A.M., van Steenbergen M.J., Tsang S.K.Y., Hennink W.E. *Degradation and release behavior of dextran-based*

hydrogels // *Macromolecules*. – 1997. – 30. – P. 4639–4645. 14. Robert J.H. Stenekes, Arjen E. Loebis, Catarina M. Fernandes, Daan J.A. Crommelin, Wim E. Hennink. *Controlled Release of Liposomes from Biodegradable Dextran Microspheres: A Novel Delivery Concept* // *Pharmaceutical Research*. – 2000. – 17, (6). – P. 664–669. 15. Stenekes R.J.H., Loebis A.E., Fernandes C.M., Crommelin D.J.A., Hennink W.E. *Degradable dextran microspheres for the controlled release of liposomes* // *International Journal of pharmaceutics*. – 2001. – 214, (12). – P. 17–20. 16. Franssen O., Stenekes R.J.H., Hennink W.E. *Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres* // *J. of controlled release*. – 1999. – 59, (2). – P. 219–228. 17. Meyvis T., De Smedt S., Barbara Stubbe, Wim Hennink, Joseph Demeester. *On the Release of Proteins from Degrading Dextran Methacrylate Hydrogels and the Correlation with the Rheologic Properties of the Hydrogels* // *Pharmaceutical Research*. – 2001. – 18, (11). – P. 1593–1599. 18. Cadée A., de Groot C.J., Jiskoot W., den Otter W., Hennink W.E. *Release of recombinant human interleukin-2 from dextran-based hydrogels* // *Journal of controlled release*. – 2002. – 78, (1). – P. 3–13. 19. Юр'єв Р.С., Дончак В.А. Синтез і характеристики ненасиченого дерівату сульфату декстрану // *Вісник Нац. ун-ту "Львівська політехніка"*. – 2003. – № 488: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – С. 343–346. 20. Тагер А.А. *Физикохимия полимеров*. – М.: Химия. – 1978. – 544 с.