Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 636-642.

УДК [577.352+544.725.2]:547.995:61
©Коллектив авторов

IN VITRO ДЕГРАДАЦИЯ ХИТОЗАНОВЫХ МЕМБРАН С РАЗЛИЧНЫМИ УСЛОВИЯМИ СИНТЕЗА

О.В. Калинкевич[1], М.В. Погорелов[2]*, И.М. Бабич[2], В.Н. Дейнека[2], А.Н. Калинкевич[1], С.Н. Данильченко[1], Г.Ф. Ткач[2]

[1]Институт прикладной физики НАН Украины, Сумы, Украина
[2]Сумский государственный университет, Медицинский институт,
ул. Санаторная, 31, Сумы, 40018 Украина; тел./факс +38 (0542) 661-761;
эл. почта: pogorelov_max@mail.ru

Исследована гидролитическая деградация биополимерных плёнок, полученных методом полива на подложку 2% и 3% растворов хитозана, в 1% уксусной кислоте. После удаления растворителя пленки обрабатывали 0,5% раствором NaOH в течение 3 мин или фосфатным буфером pH 8 в течение 10 мин. Степень деградации полученных образцов изучали через 1-96 ч в растворе при pH 5,0, 7,0 и 8,5. Результаты эксперимента свидетельствуют о стойкости полученных материалов в течении первых 6 ч с постепенной их деградацией, скорость которой зависела от pH раствора а также от процентного содержания хитозана и от метода обработки плёнок. Материалы с исходным 3% содержанием хитозана показали более высокую стойкость к гидролитической деградации, при этом снижение pH приводило к ускорению потери массы плёнки в растворе. В тоже время обработка мембран фосфатным буфером приводит к замедлению как скорости, так и степени деградации образцов. Полученные результаты станут основой для дальнейшей разработки биоматериалов для лечения поверхностных дефектов кожи.

Ключевые слова: хитозан, биокомпозиты, гидролитическая деградация.

ВВЕДЕНИЕ

Хитин и его производное – хитозан – нашли широкое применение в различных областях, включая биомедицину, биотехнологии, производство продуктов питания, косметологии и сельском хозяйстве [1]. По данным НБД Scopus с 2000 по 2009 года было опубликовано более 10000 статей и получено около 40000 патентов на применение хитина и хитозана [2]. Наиболее распространенные области применение хитозана в медицине – это создание средств медицинского назначение для лечение глубоких ран, в том числе ожоговых [3-5], дентальных и ортопедических имплантов [6], использование производных хитозана в качестве систем доставки лекарств (drug delivery systems) [7-9], а также как основы для продуктов тканевой инженерии [10-12]. В наших предыдущих работах *in vivo* была изучена возможность применения хитозана и хитозан-аппатитных композитов для лечения ожоговых ран и пластики костных дефектов [13-16]. В данных работах показано положительное влияние на процессы регенерации кожи и костной ткани при применении данных материалов. Одним из необходимых качеств материалов для лечения дефектов кожи является их постепенная деградация, что способствует выделению активных мономеров хитозана, которые способны стимулировать миграцию эффекторных клеток в очаг регенерации, а также усиливать синтез гликозаминогликанов – обязательного компонента межклеточного матрикса кожи.

Несмотря на отсутствие хитина и хитозана в организме млекопитающих, данные макромолекулы способны к биодеградации при помощи таких ферментов как лизоцим, папаин и пепсин с образованием нетоксических олигосахаридов с различной длиной, которые могут быть основой гликозаминогликанов и гликопротеинов [17]. При этом скорость биодеградации является важной величиной

* - адресат для переписки

при производстве материалов для аппликации на поверхность кожи для определения частоты смены повязки и области применения. Скорость деградации продуктов на основе хитозана зависит от многих факторов, одним из которых является степень деацетилирования хитозана. Свойства плёнок в том числе и скорость их деградации в водных средах прежде всего зависят от характеристик полимера (степень дезацетилирования, молекулярная масса, химическая модификация) и растворителя (слабые растворы органических и минеральных кислот) [18], концентрации полимера и растворителя, наличия дополнительных веществ в растворе для формирования плёнки, способа обработки сформованной плёнки. Freier и соавторы показали увеличения скорости и степени энзиматической деградации плёнок на основе хитозана при увеличении степепи деацетиллирования от 37,1% до 46,1%. При этом возрастание степени деацетилирования до 79,5% снижало скорость деградации мембран [19]. Lim и соавторы показали увеличение процента деградации хитозана в растворе лизоцима при возрастании степени деацетиллирования с 10% до 50% [20]. Скорость деградации можно уменьшить при добавлении к хитозану ряда веществ, таких как полипиррол [21] и персульфат аммония [22]. На скорость деградации также может влиять исходная концентрация хитозана в растворе, способ обработки конечного продукта и pH среды. Последнее является важным фактором при применении производных хитозана для лечения ран различной этиологии, в которых pH может меняться в зависимости от стадии процесса, наличия асептического и септического воспаления.

Для определения оптимального способа синтеза хитозановых покрытий для лечения дефектов кожи целью настоящей работы стало определение скорости и степени *in vitro* деградации материалов в зависимости от pH моделирующего раствора и способа обработки плёнок.

МЕТОДИКА

Получение плёнок

Для получения пленок использовали хитозан низкой молекулярной массы (200 кДа), степень дезацетилирования 82% (“Биопрогресс”, Россия). Плёнки получали методом полива на подложку 2% и 3% растворов хитозана в 1% уксусной кислоте с последующим выпариванием растворителя при комнатной температуре [23]. После удаления растворителя плёнки обрабатывали 0,5% раствором NaOH в течение 3 мин или фосфатным буфером pH 8 в течение 10 мин. После этого все плёнки были промыты дистиллированной водой и обработаны смесью глицерин/вода 1:10 в течение получаса. Избыток пластификатора удаляли фильтровальной бумагой.

In vitro деградация

Для изучения скорости и степени деградации хитозановых плёнок использовались образцы диаметром 80 мм которые были высушены при температуре 105°C до постоянной массы. Образцы помещали в чашки Петри с физиологическим раствором с моделированным pH 5,0, 7,0 и 8,5. pH моделировали путём добавления в физиологический раствор азотной кислоты и гидроксида натрия до достижения необходимого значения. Соотношение масса пленки/объём раствора 1:100. В эксперименте использовали плёнки массой 500±50 мг, физиологический раствор, содержащий хлорид натрия 0,9%, ионная сила 0,15, объём раствора 50 мл. Смену растворов в чашках проводили ежедневно. Изъятие образцов из раствора проводили через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 и 96 ч после начала эксперимента. Хитозановые плёнки высушивали при температуре 105°C и взвешивали на аналитических весах ВРЛ-200. Степень деградации пленок из хитозана определяли по проценту потери массы плёнок в сравнении с исходной. Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета MS Excel. Достоверность различий средних величин определяли по критерию-t Стьюдента. Различия считались значимыми при $p \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Так как для получения плёнок использовали низкомолекулярный хитозан с достаточно высокой степенью дезацетилирования, а в качестве растворителя – уксусную кислоту, сформированные плёнки отличаются однородностью, аморфностью, достаточно высокой степенью прочности и эластичностью. Для перевода аминогрупп хитозана из солевой в основную форму плёнки обрабатывали раствором гидроксида натрия или фосфатным буфером (pH 8,0), при этом происходит удаление остатков уксусной кислоты из плёнки. Для пластификации пленок использовали глицерин. Фото сформированной и обработанной плёнки представлено на рисунке 1.

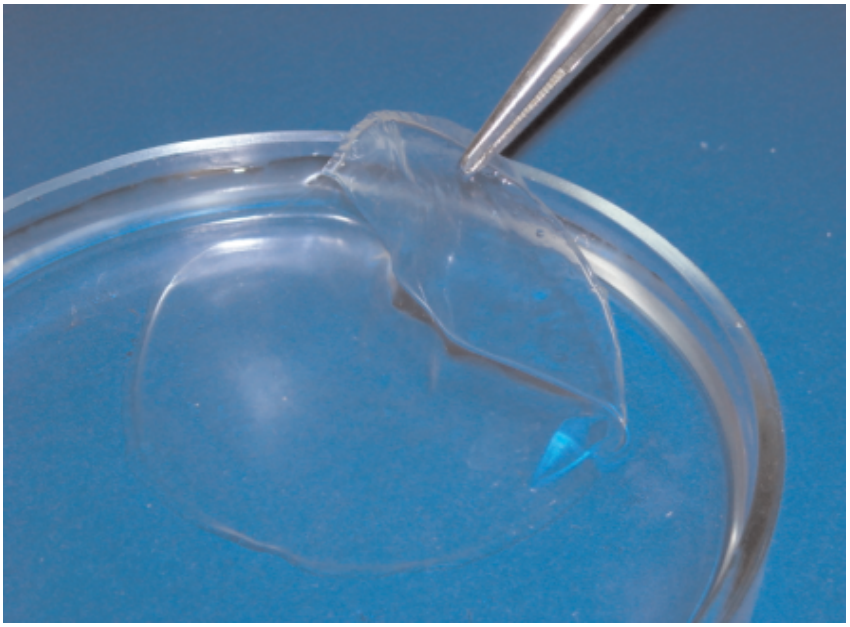

Рисунок 1. Фото плёнки сформованной из 2% раствора хитозана после обработки щёлочью и пластификатором.

При изучении *in vitro* деградации материалов с различной исходной концентрацией хитозана не было получено достоверного снижения их веса в первые 6 ч наблюдения, что свидетельствует о низкой начальной скорости биодеградации хитозановых мембран. На этом этапе происходит диффузия жидкой среды в массу плёнки, сольватация макромолекул материала молекулами растворителя. При этом плёнки, полученные из раствора, содержащего 2% хитозана, через 12 ч после погружения в растворы с pH 5,0 и 7,0 теряют от 4,37% до 5,00% веса.

Через 24 ч после начала наблюдения отмечается ускоренная потеря веса мембран в растворах с pH 5,0 и 7,0 до 36,45% и 46,66% соответственно, в тоже время плёнки, помещённые в раствор с pH 8,5, утратили лишь 13,4% от их исходной массы. Через 36 ч от начала эксперимента наблюдается потеря ещё около 10% веса в растворах с pH 5,0 и 7,0. При этом в щелочном растворе потеря массы достигла в данный промежуток времени 34,45%. В последующие сроки наблюдения потеря массы хитозановых мембран стабилизируется (рис. 2).

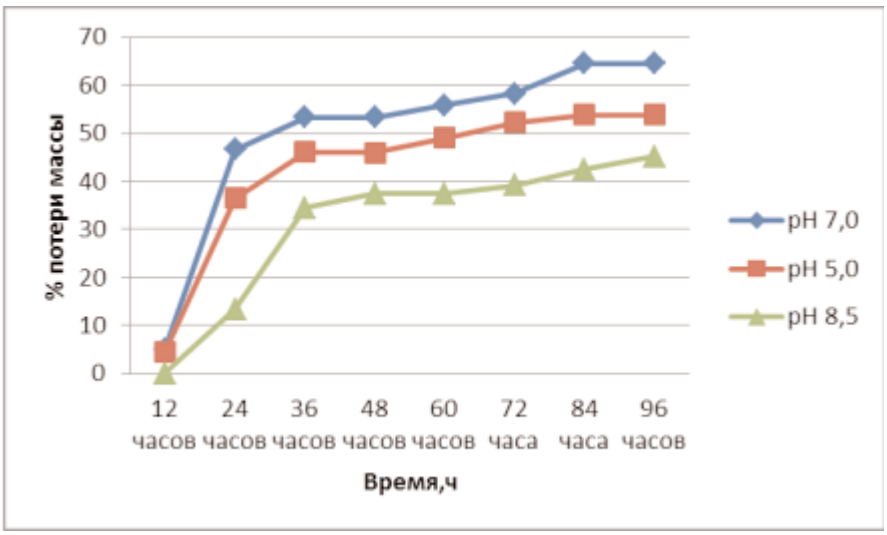

Рисунок 2. Процент потери массы хитозановых плёнок, сформированных из 2% раствора хитозана в 1% уксусной кислоте, в зависимости от pH среды.

Максимальный уровень деградации наблюдается в нейтральном растворе, минимальный – в щелочном. Через 96 ч после начала эксперимента процент потери исходной массы составил соответственно 45,11% в щелочном растворе, 53,75% – в кислом и 64,5% – в нейтральном. Минимальный уровень деградации плёнок в щелочной среде, очевидно, обусловлен основной формой хитозана в плёнках.

Наибольшая разница в скорости деградации отмечена через 24 ч после начала эксперимента (рис. 2). При этом при pH 7,0 процент потери массы был больше на 28,01% ($p \leq 0,05$) в сравнении с pH 5,0. В последующие временные интервалы разница между степенью деградации мембран в системе pH 8,5 - pH 5,0 и pH 5,0 - pH 7,0 была относительно стабильной с максимумом соответственно 11,6% ($p \leq 0,05$) и 33,38% ($p \leq 0,05$). Разница в скорости деградации при pH 8,5 и 7,0 является существенно большей и составляет от 42,98% ($p \leq 0,05$) до 54,80% ($p \leq 0,05$).

Мембраны, полученные из 3% раствора хитозана, показали большую начальную скорость деградации во всех экспериментальных растворах. Так, через 12 ч после начала эксперимента отмечается потеря от 8,2% (щелочная среда) до 12,5% (нейтральная и кислая среды) исходной массы экспериментальных материалов. В нейтральной и кислой среде наблюдается ускоренное снижение веса мембран, которое достигает через 36 ч 27,5% и 31,25% соответственно. При этом потеря веса мембран, находящихся в щелочной среде составила через 24 ч и 36 ч лишь 9,9% и 14,6%. Временной промежуток от 36 до 84 часов характеризуется стабилизацией потери массы мембран при pH 5,0 и 7,0. В щелочной среде наблюдается плавное увеличение потери исходной массы образцов с максимальной степенью деградации 25,56% через 84 и 96 ч после начала эксперимента. В кислой среде возникает резкое снижение массы образцов через 96 ч, которое составляет 43,75%. Таким образом, несмотря на позднее начало деградации мембран в щелочной среде, через 96 ч после начала эксперимента не наблюдается достоверной разницы потери массы мембран при pH 5,0 и 8,5 для образцов, полученных из 3% раствора хитозана (рис. 3).

Разница в степени деградации в pH 5,0 и 7,0 во временном промежутке с 12 ч до 84 ч является недостоверной, лишь в последний срок наблюдения (96 ч) степень деградации мембран в кислой среде превышает нейтральную на 59,09% ($p \leq 0,05$). Степень деградации в щелочной среде во временном промежутке от 12 до 60 ч была меньше в сравнении с кислой средой от 42,04% ($p \leq 0,05$) до 114,04% ($p \leq 0,05$). В последующие сроки наблюдения разница была недостоверной. При этом разница в степени деградации плёнок при pH 8,5 и 5,0 была достоверной на протяжении всего периода наблюдения с максимальной разницей через 96 ч, которая составила 70,56% ($p \leq 0,05$).

При использовании раствора хитозана большей концентрации для формирования плёнки (а следовательно плёнка имеет большую плотность) при нейтральном значении гидролитической среды происходит основная потеря массы обусловленная потерей аморфной зоны полимера за 36 ч, далее масса плёнки стабилизируется, дальнейшая деградация не происходит. В целом степень деградации за 96 ч значительно ниже по сравнению с плёнкой сформованной из 2% раствора

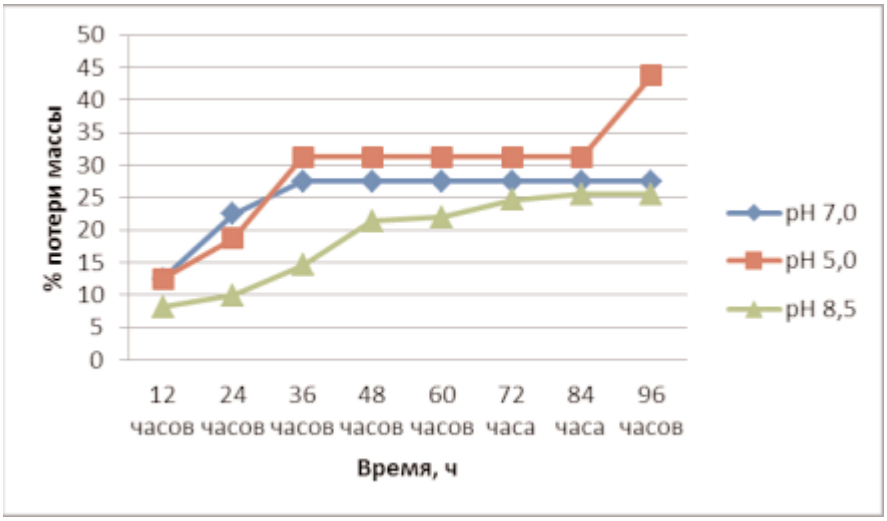

Рисунок 3. Процент потери массы хитозановых плёнок, сформированных из 3% раствора хитозана в 1% уксусной кислоте, в зависимости от pH среды.

(таблица), что объясняется более плотной и упорядоченной укладкой цепей полимера, которая препятствует проникновению растворителя и сольватации макромолекул. Аналогичная ситуация наблюдается и в щелочной среде, но процесс растворения в начале происходит медленнее. Удаление макроцепей полимера из плёнки в щелочной среде прекращается через 84 ч. В кислой среде наблюдается период стабилизации потери массы, после чего происходит интенсивное растворение плёнки, что связано с разрушением упорядоченной структуры полимера. Но в целом за 96 ч разрушение плёнки сформованной из 3% хитозана в кислой среде также ниже, чем плёнки сформованной из 2% хитозана (таблица).

Для перевода хитозана из солевой в основную форму использовали обработку образцов плёнок раствором NaOH и фосфатным буфером, содержащим ионы $H_2PO_4^-$ и HPO_4^{2-}. Использование различных способов обработки также может влиять на степень и скорость деградации материалов. Определение степени потери массы мембран, обработанных NaOH, показало начало деградации через 12 ч после начала эксперимента. Процент деградации составил 6% при pH 7,0, 6,125% – при pH 5,0 и 3,2% – при pH 8,5. Мембраны, которые находились в кислой и нейтральной средах, показали резкую потерю массы через 24 ч после начала эксперимента, которая составила 28,83% и 39,0% соответственно. Снижение массы образцов, находящихся в щелочной среде, составило лишь 12,87% через 24 ч наблюдения. Образцы, находящиеся в растворах с pH 5,0 и 7,0, показали стабилизацию потери массы в сроки от 36 ч до 72 ч от начала эксперимента (рис. 4), которая составляет от 37,91% до 47,66%. Через 84 ч и 96 ч наблюдается незначительное усиление деградации мембран в нейтральной и кислой средах, которая составила соответственно 54,0% и 45,54%. В растворе со щелочной средой наблюдается постепенная деградация образцов с максимальной потерей массы через 84 ч, которая составила 30,33%.

Достоверная разница степени деградации мембран при pH 5,0 и 7,0 наблюдается лишь в сроки 24 ч, 84 ч и 96 ч и составляет соответственно 35,27% ($p \leq 0,05$), 18,51% ($p \leq 0,05$)

Таблица. Деградация плёнок в водных средах за период наблюдения (96 ч).

Плёнка, способ обработки	% потери массы за 96 ч		
	Нейтральная среда	Кислая среда	Щелочная среда
Хитозан 2% раствор	64,50±0,75	53,75±0,45	45,11±1,35
Хитозан 3% раствор	25,56±0,12	43,75±0,92	25,56±0,63
Хитозан 2% NaOH	34,16±0,39	25,53±0,77	18,43±0,39
Хитозан 2% Фосфатный буфер	54,00±1,02	45,54±0,81	30,33±0,58

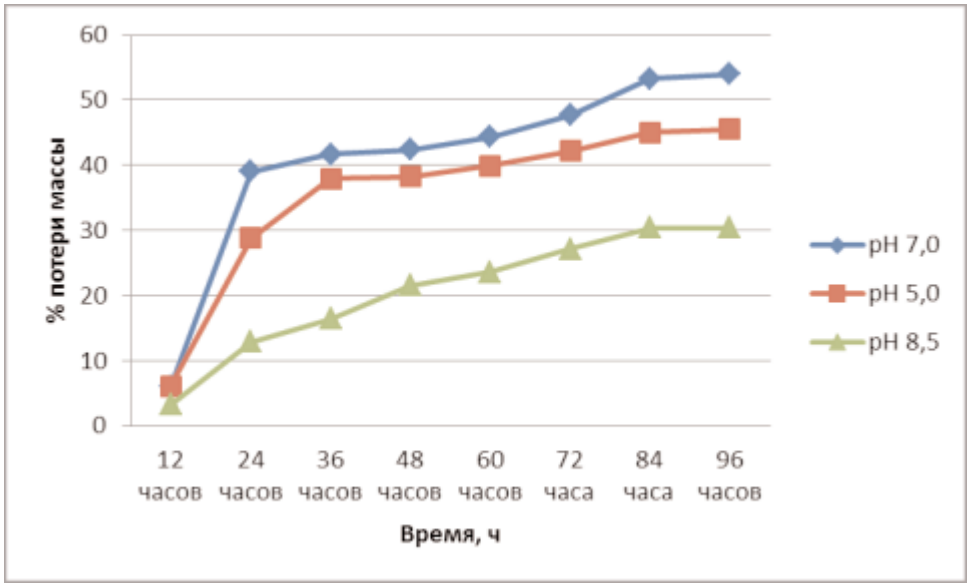

Рисунок 4. Процент потери массы хитозановых мембран, полученных методом обработки 0,5% NaOH в зависимости от pH среды.

и 18,57% ($p \leq 0,05$). Разница потери массы мембран при pH 5,0 и 8,5 была достоверной во все сроки наблюдения с минимумом в 48,36% ($p \leq 0,05$) через 84 ч и максимумом в 130,59% – через 36 часов после начала эксперимента.

Обработка мембран фосфатным буфером приводит к снижению скорости и степени деградации образцов по сравнению с обработкой 0,5% NaOH. Так, потеря массы образцов через 12 ч эксперимента наблюдается лишь при pH 7,0 и составляет 6,25%. В то же время, образцы, находящиеся в растворе с pH 5,0, показали резкое снижение массы через 24 ч наблюдения, которое составило 21,09%. Начало деградации образцов при pH 8,5 наблюдается лишь через 36 ч и составляет 7,89%. Через 36 ч наблюдения при pH 5,0 и 7,0 наблюдается максимальная потеря массы, которая достигает 25,53% и 34,16% и остается стабильной до конца эксперимента (рис. 5). В щелочной среде наблюдается медленная деградация экспериментальных образцов с пиками через 48 ч и 72 ч. В дальнейшем потеря массы стабилизируется и составляет 18,43%. Меньшая степень и скорость деградации обусловлена более плотной упаковкой цепей при обработке буфером и затрудненным проникновением растворителя между ними.

При обработке мембран фосфатным буфером разница в степени деградации мембран при pH 5,0 и 7,0 является достоверной во временном интервале с 36 ч до 96 ч и составляет от 33,80 ($p \leq 0,05$) до 43,36% ($p \leq 0,05$). Из-за более позднего начала деградации мембран при pH 8,5, разница в потере массы в сравнении с pH 5,0 является значительной вплоть до 60 ч и составляет 103,26% ($p \leq 0,05$). В дальнейшие сроки разница является стабильной и составляет 38,52% ($p \leq 0,05$).

Таким образом, использование различных исходных концентраций хитозана и методов обработки полученных мембран позволяет создать широкий спектр материалов с различной скоростью и степенью деградации. Управление данными процессами позволяет использовать полученные материалы при различных видах дефектов кожи, контролировать частоту смены материалов на ране и прогнозировать конечный результат лечения.

ВЫВОДЫ:

1. Материалы, полученные из 2% и 3% растворов хитозана, обладают различной скоростью и степенью деградации в зависимости от pH растворов. Ранее начало деградации характерно для материалов, полученных из 3% раствора хитозана, при этом данные образцы характеризуются меньшей потерей массы в последующие контрольные точки. Несмотря на позднее начало гидролитической деградации плёнок на основе 2% хитозана (более 12 ч), они характеризуются большей потерей массы в конечные сроки эксперимента.

2. Обработка мембран фосфатным буфером приводит к замедлению как скорости, так и степени деградации образцов.

3. Наибольшую скорость деградации все виды мембран показали при pH 5,0 и 7,0, в то время как щелочная среда приводит к замедлению деградации хитозановых плёнок.

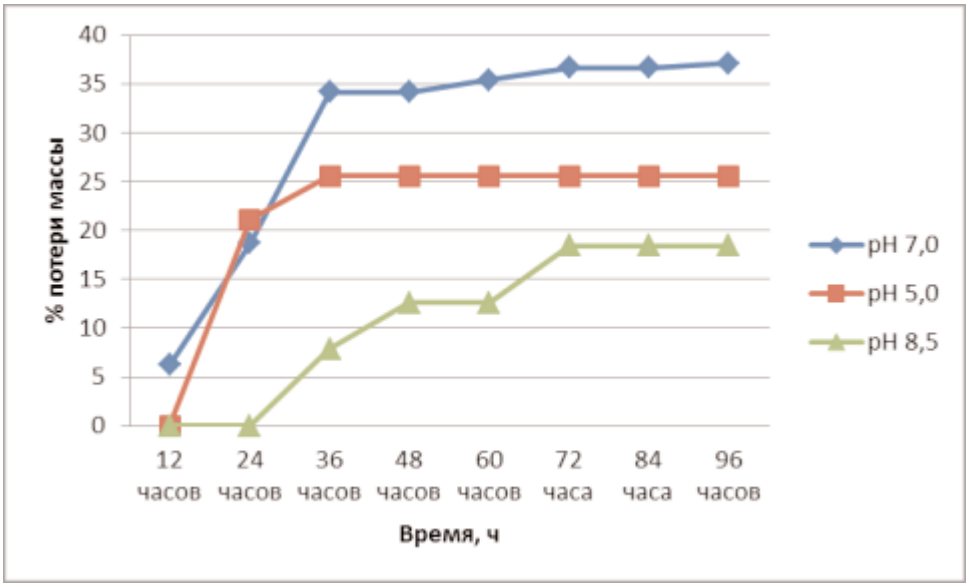

Рисунок 5. Процент потери массы хитозановых мембран, полученных методом обработки фосфатным буфером в зависимости от pH среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kumar M.N.V.R.* (2000) React. Funct. Polym., **46**, 1-27.
2. *Galed G., Heras A.* (2009) Current Chemical Biology, **3**, 203-230.
3. *Ueno H., Mori T., Fujinaga T.* (2001) Adv. Drug Deliv. Rev., **52**, 105-15.
4. *Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J.* (2001) Biomaterials, **22**, 2959-2966.
5. *Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y.* (2007) Carbohydr. Polym., **67**, 640-644.
6. *Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Gurny R.* (2004) Eur. J. Pharm. Biopharm., **57**, 35-52.
7. *Jiang H., Park I., Shim N.* (2004) Eur. J. Pharm. Biopharm., **58**, 471-476.
8. *Mi F.L., Kuan C.Y., Shyu S.S., Lee S.T., Chang S.F.* (2000) Carbohydr. Polym., **41**, 389-396.
9. *Gupta K.C., Jabrail F.H.* (2006) Carbohydr. Polym, **66**, 43-54.
10. *Ho M.H., Wang D.M., Hsieh H.J.* (2005) Biomaterials, **26**, 3197-3206.
11. *Ma L., Gao C., Mao Z.* (2003) Biomaterials, **24**, 4833-4841.
12. *Madihally S.V., Howard W.T.* (1999) Biomaterials, **20**, 1133-1142.
13. *Kalinkevich O.V., Pogorelov M.V., Kalinkevich A.N., Sklyar A.M., Danilchenko S.N., Sukhodub L.F.* (2009) Book of abstracts, "Fint", Kharkov, Ukraine, 94.
14. *Danilchenko S.N., Kalinkevich O.V., Pogorelov M.V.* (2009) J. Biol. Phys. Chem., **9**, 119-126.
15. *Danilchenko S.N., Kalinkevich O.V., Pogorelov M.V.* (2011) J. Biomed. Mater. Res. Part A, **96A**, 639-647.
16. *Погорелов М.В., Калинкевич О.В., Данильченко С.М., Калинкевич О.М.* (2012) Росс. Мед.-биол. Вестн. им. ак. И.П. Павлова, **4**, 34-45.
17. *Pangburn S.H., Trescony P.V., Heller J.* (1982) Biomaterials, **3**, 105-108.
18. *Freier T., Koha S.H., Kazazian K.* (2005) Biomaterials, **26**, 5872–5878.
19. *Lim S.M., Song D.K., Oh S.H.* (2008) J. Biomater. Sci. Polym. Ed., **19**, 453-466.
20. *Yi Hong, Haiqing Song, Yihong Gong* (2007) Acta Biomaterialia, **3**, 23–31.
21. *Wan Y., Yu A., Wu H., Wang Z.* (2005) J. Mater. Sci. Mater. Med., **16**, 1017-1028.
22. *Po-Hui Chen, Ya-His Hwang, Ting-Yun Kuo* (2007) J. Med. Bio Engineering, **27**, 23-28.
23. *Агеев Е.П., Вихорева Г.А., Матушкина Н.Н., Пчелко О.М., Гальбрайх Л.С.* (2000) Высокомолекулярные соединения **42**(2), 332-339.

Поступила: 12.09. 2013.

IN-VITRO DEGRADATION OF THE CHITOSAN MEMBRANES UNDER VARIOUS SYNTHESES CONDITIONS

O.V. Kalinkevich[1], M.V. Pogorielov[2], I.M. Babich[2], V.N. Deyneka[2], A.N. Kalinkevich[1], S.N. Danilchenko[1], G.F. Tkach[2]

[1]Institute of Applied Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy, Ukraine
[2]Sumy State University, Medical Institute,
31, Sanatornaya str., Sumy, 40018 Ukraine; tel./fax: +38 (0542) 661-761; e-mail: pogorelov_max@mail.ru

The hydrolytic degradation of polymer films, which were obtained by application of 2% and 3% chitosan solutions in 1% acetic acid on a base sheet has been investigated. As the solvent was removed, these firms were either treated with 0.5% NaOH for 3 min or with phosphate buffer (pH 8) for 10 min. The degrees of degradation for the obtained samples were studied during 1-96 h in solutions with pH values of 5.0, 7.0 and 8.5. The results revealed resistance of the films within the first 6 h, followed by their subsequent degradation. The rate of degradation depended on pH of the solution, chitosan percentage and the treatment methods of films. The materials with the initial chitosan content of 3% were more resistant to the hydrolytic degradation, but the decreasing in pH accelerated the weight loss of the film. However, if the membranes were treated with phosphate buffer, the rate and degree of sample degradation were slowed down. Thus, the results are considered as a basis for the further development of biomaterials to treat the skin surface damages.

Key words: chitosan, biocompositions, hydrolytic degradation.