

Piotr OW CZARZ¹, Zofia MODRZEJEWSKA²

e-mail: owczarz@wipos.p.lodz.pl

¹ Katedra Inżynierii Chemicznej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź² Katedra Systemów Inżynierii Środowiska, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Wpływ substancji czynnych na własności reologiczne hydrożeli chitozanowych w pobliżu granicy przejścia fazowego żol-żel

Wstęp

Jednym z podstawowych rozwiązań wykorzystywanych obecnie w farmakologii jest zastosowanie matryc polimerowych tworzących układy koloidalne. Inhibitorem przejścia fazowego żol-żel jest zmiana *pH* lub temperatury. Układy termowrażliwe wytwarza się w oparciu o polimery, które w roztworach wodnych wykazują temperaturową zależność przejścia żolu w żel. W tych układach przejście od własności cieczy lepkiej do sprężystej następuje w wyniku szybkiego wzrostu lepkości w określonej temperaturze zwanej najniższą krytyczną temperaturą roztworu (LCST). Termowrażliwe hydrożele otrzymywane są na bazie: poli(N-izopropylakrylamidu) (PNIPA), kopolimeru (politlenek etylenu – politlenek propylenu – politlenek etylenu), polietylenoglikolu, kopolimeru kwasu mlekowego z kwasem glikolowym i polietylenoglikolu, polisacharydów (ksyloglukan, etyloceluloza, hydroksyetyloceluloza i chitozan). Układy te zaliczane są do tzw. inteligentnych i są przedmiotem szczególnego zainteresowania, zwłaszcza w aspekcie wykorzystania ich jako nośniki leków, a w przyszłości również jako materiały do hodowli komórkowej [Hennink i van Nostrum, 2002; Gupta i in., 2002; Duncan, 2003; Twaites i in., 2005; Schmaljohann, 2006; Wu Jie i in., 2006].

Na Wydziale Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej od kilku lat prowadzone są badania nad wytworzeniem nowej generacji nośnika chitozanowego o własnościach termowrażliwych. Termożele chitozanowe formowane są z niskolepkich roztworów soli chitozanowych (głównie chlorku chitozanu), z użyciem jako środka sieciującego β -glicerofosforanu sodu. Przejście fazowe żol-żel tych układów następuje w fizjologicznej temperaturze ciała. Istotne jest, że do roztworu soli wprowadzić można środki farmakologiczne, tworząc aktywne układy hybrydowe. W trakcie sieciowania (w temperaturze powyżej 35°C), zostają one unieruchomione w strukturze żelu i mogą być w sposób kontrolowany z niej uwalniane.

Pomiary reologiczne termożeli chitozanowych

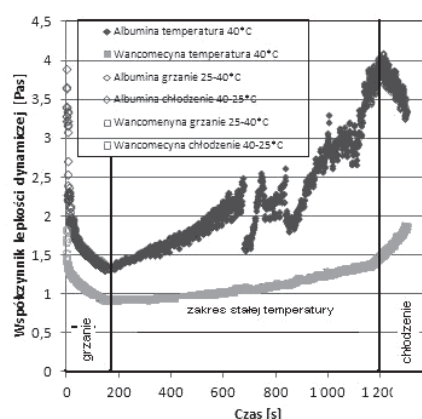
W pracy przedstawiono badania nad otrzymywaniem żeli chitozanowych formujących się w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego i tworzących układy hybrydowe z substancjami czynnymi. Do wytwarzania bazowego termo żelu, stanowiącego podstawową matrycę polimerową użyto chitozanu *Fluka* o masie cząsteczkowej 490 kDa oraz kwasu solnego. Jako substancję sieciującą wykorzystano β -glicerofosforanu sodu. W strukturę żelu wprowadzono albuminę wołową o masie cząsteczkowej 66 kDa w stosunku wagowym albuminy/chitozanu odpowiednio: 1:4 oraz wankomycynę (glikopeptyd) w tym samym stosunku wagowym.

Dla tak przygotowanych próbek wykonano serię pomiarów reologicznych. Badania prowadzono w układzie stożek – płytka (stożek $\phi 50$ z kątem 1°) na reometrze *Physica MR301* firmy *Anton Paar*. Przeprowadzono pomiary krzywych płynięcia, krzywych płynięcia oraz krzywych oscylacyjnych roztworów wyjściowych zawierających odpowiednio czysty chitozan usieciowany β -glicerofosforanem sodu oraz dwu roztworów, w których do roztworu wyjściowego dodano substancje czynne, odpowiednio albuminę wołową i wankomycynę. Wyznaczona dla roztworu bazowego, w oparciu o pomiar wartości współczynnika lepkości dynamicznej η przy wzroście temperatury, najniższa krytyczna temperatura roztworu wynosiła ok. 40°C. Dalsze pomiary reologiczne prowadzono w zakresie temperatur od 25 do 40°C. Maksymalna temperatura 40°C wyznaczona została ze względu na możliwość koagulacji albuminy

wołowej i układu peptydowego zawartego w strukturze wankomycyny. Wylimitowanie możliwości koagulacji białek. Taki sposób prowadzenia pomiarów eliminował wpływ zjawiska koagulacji na wyniki pomiarów reologicznych badanych roztworów. Z wcześniejszych badań własnych autorów [Modrzejewska i in., 2001; Modrzejewska i Owczarz, 2004; Wylon i in., 2004; Owczarz i Modrzejewska, 2005; Owczarz i Modrzejewska, 2006; Modrzejewska i in., 2007] wiadomo, że czyste roztwory soli chitozanowych usieciowanych β -glicerofosforanem sodu po osiągnięciu najniższej krytycznej temperatury roztworu (LCST) wykazują szybki wzrost współczynnika lepkości dynamicznej z jednoczesnym wzrostem własności sprężystych. Natomiast w czasie ponownego ochładzania otrzymujemy ponownie roztwór lepki o własnościach zbliżonych do roztworu wyjściowego. Mamy zatem układ odwracalny żol-żel wynikający ze zmiany własności hydrofilowych w hydrofobowe badanego polimeru pod wpływem zmian temperatury.

Krzywe temperaturowe roztworów zawierających substancje czynne

Badania wpływu temperatury na lepkość układów hybrydowych zawierających substancje czynne zawarte w roztworze wyjściowym soli chitozanowych wykonano w układzie stożek – płytka na reometrze *Physica MR 301*. Próbkę umieszczoną w układzie w temperaturze 25°C ogrzewano do temperatury 40°C z prędkością wzrostu temperatury 0,5°C/s. Następnie termostatowano przez 1000 s w temperaturze 40°C i ponownie ochładzano do temperatury wyjściowej (25°C) z prędkością 0,5°C/s. Jednocześnie wykonywano pomiary reologiczne wyznaczając współczynnik lepkości dynamicznej η . W pomiarach stosowano wybraną arbitralnie wartość szybkości ścinania $\dot{\gamma} = 20$ 1/s. Otrzymane krzywe temperaturowe przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Krzywe temperaturowe otrzymane dla układów hybrydowych roztworów soli chitozanowych z dodatkiem substancji czynnych, $\dot{\gamma} = 20$ 1/s

W przebiegach krzywych lepkości w funkcji zmian temperatury wyraźnie widać różnice pomiędzy układem zawierającym czystą białkoalbuminę wołową, a układem zawierającym wankomycynę. Przebieg krzywej lepkości dla roztworu zawierającego albuminę jest zbieżny z takim, jaki otrzymywany był dla czystych roztworów soli chitozanowych. Wzrost temperatury powoduje początkowo spadek lepkości aż do osiągnięcia najniższej krytycznej temperatury roztworu (LCST). Następnie obserwujemy wzrost lepkości. W tej temperaturze następuje bu-

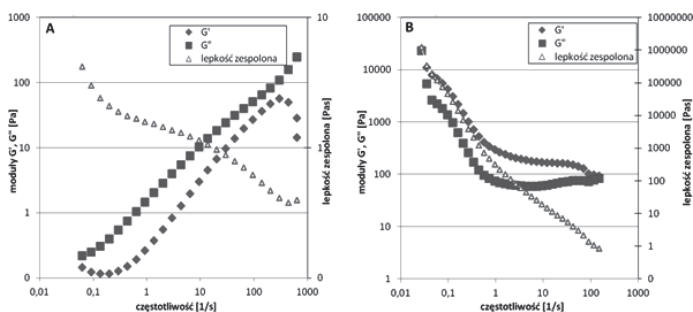
dowa struktury usieciowanego polimeru. W trakcie ochładzania próbki spadek wartości lepkości, a więc zniszczenie usieciowanej struktury polimeru i przemianę fazową żel-zol. Wskazywać to może, że mechanizm powstawania żelu pod wpływem temperatury oparty jest na powstaniu nietrwałych oddziaływań fizycznych a nie trwałych połączeń chemicznych pomiędzy łańcuchami polimeru.

W przypadku roztworu zawierającego wankomycynę jako substancję czynną obserwujemy podobny przebieg krzywej temperaturowej w czasie ogrzewania, jednak wartości współczynnika lepkości dynamicznej są niższe niż w przypadku roztworów z albuminą. Następnie następuje niewielki wzrost w trakcie termostatowania. Jednak w czasie chłodzenia próbki obserwujemy dalszy wzrost współczynnika lepkości dynamicznej. Może to wskazywać, że w trakcie podgrzewania i termostatowania otrzymaliśmy trwały układ struktury polimerowej. W podgrzewanym roztworze mogła zajść reakcja chemiczna tworząca zupełnie inny układ polimerowy. Może to być spowodowane obecnością ugrupowań węglowodanów (glikanów) przyłączonych kowalencyjnie do łańcuchów bocznych aminokwasów. Ponieważ w łańcuchu chitozanu także występują grupy aminowe to istnieje prawdopodobieństwo wytworzenia się takich wiązań nie tylko w cząsteczkach wankomycyny, ale także poprzez trwałe związanie tych cząsteczek z łańcuchem polimeru.

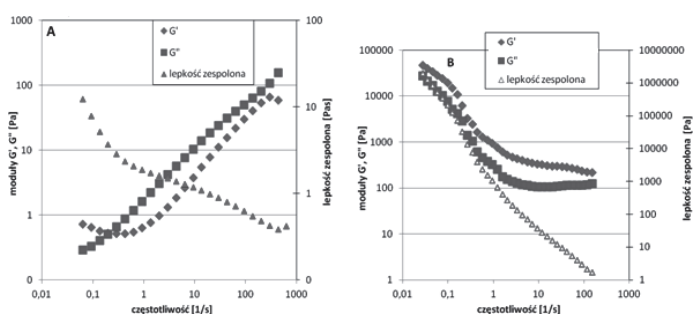
Badanie własności lepkością roztworów zawierających substancję czynną

Wyniki pomiarów oscylacyjnych przedstawiono na rys. 2-4.

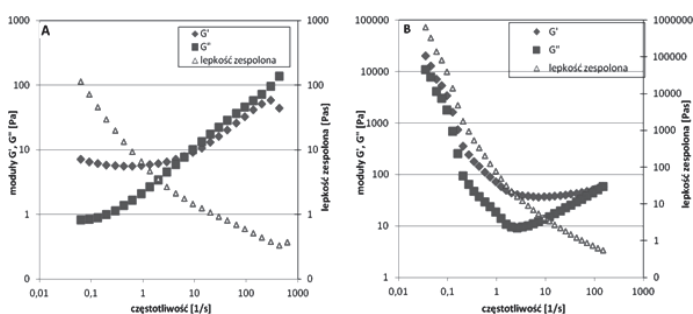
Z przedstawionych wykresów wynika, że w temperaturze 25°C wyjściowy roztwór soli chitozanowych jest płynem nienewtonowskim



Rys. 2. Krzywe oscylacyjne roztworów soli chitozanowych
A – temperatura 25°C, B – temperatura 40°C



Rys. 3. Krzywe oscylacyjne roztworów soli chitozanowych z dodatkiem albuminy wołowej,
A – temperatura 25°C, B – temperatura 40°C



Rys. 4. Krzywe oscylacyjne roztworów soli chitozanowych z dodatkiem wankomycyny,
A – temperatura 25°C, B – temperatura 40°C

o przeważających cechach płynu lepkiego. Dodatek substancji czynnych powoduje zmiany własności reologicznych tego roztworu. Szczególnie widoczne jest to w przypadku układu hybrydowego z dodatkiem wankomycyny (Rys. 3A). Dodatek tej substancji powoduje, że powstaje roztwór o wyraźnych cechach płynu sprężysto lepkiego, a lepkość zespolona jest o ponad rząd wielkości większa, niż w przypadku roztworu wyjściowego (Rys. 2A). Wyraźne cechy układu sprężysto-lepkiego wskazują, że dodatek substancji czynnej w postaci glikopeptydu powoduje wytworzenie sieci polimerowej. Potwierdzono zatem, zaobserwowany podczas pomiarów krzywych lepkości w funkcji temperatury, występowanie wiązań innych niż występujące w czystym roztworze soli chitozanowych.

Krzywe oscylacyjne otrzymane w temperaturze 40°C wykazują dla wszystkich układów (Rys. 2B, 3B, 4B) wykazują wyraźne cechy płynów sprężystych. We wszystkich przypadkach nastąpiło więc wytworzenie żelu z roztworów wyjściowych. r czcionki stosowanej w tych obiektach może być zmniejszony do 7 pkt.

Wnioski

Zaobserwowane wyraźne różnice w przebiegu krzywych temperaturowych układów hybrydowych zawierających albuminę wołową i wankomycynę wskazują na różne typy wiązań powstające po dodaniu do roztworu wyjściowego soli chitozanowych substancji czynnych.

W przypadku wankomycyny otrzymuje się układ nieodwracalny, w którym cząstka antybiotyku łączy się wiązaniem chemicznym z łańcuchem polimeru chitozanowego.

Wszystkie badane układy wykazują cechy termożeli, dla których wzrost temperatury inicjuje przemianę fazową żel-zol.

LITERATURA

- Duncan R., 2003. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 347-360, DOI:10.1038/nrd1088
- Gupta P., Vermani K., Grag S., 2002. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *DDT*, 7, nr 10, 569-578, DOI: 10.1016/S1359-6446(02)02255-9
- Hennink W.E., van Nostrum C.F., 2002. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 13-36, DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00240-X
- Modrzejewska Z., Owczarz P., 2004. The Effect of Molecular Mass and Solvent Composition on Rheological Properties of Chitosan Salts. *Inż. Chem. Proc.*, 25, 1417-1422
- Modrzejewska Z., Korus I., Owczarz P., 2001. The effect of seasoning a membrane-forming solution on the separation properties of chitosan membranes. *J. Membrane Science*, 181, nr 2, 229-239. DOI: 10.1016/S0376-7388(00)00537-8
- Modrzejewska Z., Maniukiewicz W., Owczarz Piotr, Wojtasz-Pająk A., 2007. The Effect of the Rheological Properties of Membrane-Forming Solutions on the Structural Features of Chitosan Hydrogel Membranes. *Polish J. of Environ. Stud.*, 16, nr 2A, Part II, 199-204
- Owczarz P., Modrzejewska Z., 2005. The effect of solvent type on rheological properties of chitosan salts. *Int. J. of Applied Mechanics and Engineering*, 10, 131-136
- Owczarz P., Modrzejewska Z., 2006. The effect of molecular weigh of polymer and solvent type on rheological properties of chitosan salts, *Chemical Industry and Environment V. 5th European Meeting on Chemical Industry and Environment*, Wien, 3-5 May, 418-425
- Schmaljohann D., 2006. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, nr 15, 1655-1670, DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.020
- Twaites B., de las Heras Alarcon C., Alexander C., 2005. Synthetic polymers as drugs and therapeutics. *J. Mater. Chem.*, 15, nr 4, 441-455, DOI: 10.1039/b410799n
- Wu Jie, Zhi-Guo Su, Guang-Hui Ma, 2006. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *Int. J. Pharm.* 315, nr 1-2, 1-11. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.045
- Wylon E., Modrzejewska Z., Owczarz P., Zarzycki R., 2004. Assessment of Physicochemical properties of chitosan membranes. *Engineering of Biomaterials*, 3, 128-131
- Praca powstała w ramach grantu NCN „Zmineralizowane termożele chitozanowe jako scaffody do hodowli komórkowej”.**