Chemistry, Technology and Application of Substances

Vol. 5, No. 2, 2022

І. А. Дронь[1], Н. М. Букартик[1], М. М. Букартик[1], Д. Д. Остапів[2], В. Я. Самарик[1]
[1] Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра органічної хімії,
[2] Інститут біології тварин НААН,
лабораторія молекулярної біології та клінічної біохімії
iryna.a.dron@lpnu.ua

ОДЕРЖАННЯ АНТИСЕПТИЧНИХ ГІДРОГЕЛЕВИХ ПЛАСТИН НА ОСНОВІ ПРИРОДНИХ ПОЛІСАХАРИДІВ

https://doi.org/10.23939/ctas2022.02.178

Із використанням природних полісахаридів, пектину та альгінату натрію одержано гідрогелеві пластини, здатні до абсорбції ексудату. Проведені дослідження показали відсутність цитотоксичності матеріалу пластин. З метою створення на їх основі бактерицидних лікувальних пов'язок продемонстровано можливість наповнення пластин антисептичними засобами (йодом, бетадином, хлоргексидином) та досліджено динаміку їх вивільнення. Дослідження показали, що вивільнення йоду зі складу пластини є надто швидким і не може задовольнити умову його пролонгованого вивільнення. Встановлено, що бетадин і хлоргексидин вивільняються зі складу пластини пролонговано.

Ключові слова: полісахарид; гідрогель; антисептик; пектин; альгінат натрію; бетадин; хлоргексидин.

Вступ

Створення сучасних перев'язувальних матеріалів, здатних забезпечувати вологе загоєння ран, сьогодні є актуальним завданням [1]. Аналіз наукових досліджень процесу вологої терапії ран [2–4] показує, що ефективнішими матеріалами для цього є полімери природного походження, на основі яких розробляють вироби різної форми і призначення [5–7]. Актуальність та унікальність їх застосування полягає у тому, що вони є біосумісними, не спричиняють подразнення та реакцій з боку тканин організму, які з ними контактують, слугують бар'єром для проникнення в рану мікроорганізмів, також є газопроникними та створюють ідеальний мікроклімат для загоєння [8, 9]. Під час досліджень, описаних у медичній літературі [10, 11], виявлено, що такі матеріали є біоактивними і сприяють загоюванню ран без використання лікарських засобів, але їх широке застосування часто обмежується недостатньою здатністю поглинення ексудату.

З огляду на це, останніми роками зусилля розробників спрямовані на одержання гідрогелевих пластин на основі природних полісахаридів з підвищеними абсорбційними властивостями та створення композицій на їх основі із заданими властивостями (бактерицидними, знеболювальними, кровоспинними тощо) [12–14]. Зокрема, широко використовують антисептичні лікувальні пов'язки різного типу. Призначенням антисептичної пов'язки є захист пошкодженої ділянки шкіри від повторної інфекції [15]. На сучасному етапі в медичній практиці як антисептичні засоби широко використовують йод, фурацилін, бетадин, хлоргексидин, декасан тощо. Доцільно розробити ефективну антисептичну пов'язку на основі природних полісахаридів із використанням цих антисептиків.

Мета дослідження – одержання гідрогелевих пластин на основі природних полісахаридів (пектину та альгінату натрію) із достатньою абсорбційною спроможністю щодо ексудату та розроблення на їх основі антисептичних пов'язок із пролонгованим вивільненням діючої речовини.

Матеріали і методи досліджень

Вихідні речовини. Пектин цитрусовий (CF 131B, Grindsted, Чехія), альгінат натрію (CAS номер: 9005-38-3, Sigma-Aldrich, США), хло-

рид кальцію (харчовий), поліпропіленгліколь (Acros organics, Німеччина, ММ 2000), поліетиленгліколь (AppiChem GmbH, Німеччина, ММ 3500-4500), йод кристалічний, йодид калію, бетадин (10 % розчин, Угорщина), хлоргексидин (хлоргексидину біглюконат, 2 % розчин, Індія), 1-октанол (CAS номер: 111-87-5, Sigma-Aldrich, США).

Дослідження процесу вивільнення йоду із суміші пектин – йод у часі. Для одержання суміші пектин-йод до розчину пектину концентрацією 20 % додавали розчин йоду в йодиді калію у співвідношенні 1:1. Суміш перемішували до однорідної маси та завантажували в склянки місткістю 50 мл по 3 г у кожну. Кількісне визначення вмісту йоду здійснювали відразу після приготування суміші (початкова концентрація антисептика) та через визначені проміжки часу титруванням 0,05 н розчином тіосульфату натрію [16]. Для порівняння в аналогічних умовах досліджували вивільнення йоду із його водного розчину в йодиді калію (1:1).

Дослідження процесу вивільнення йоду з марлевих підкладинок. На марлеві підкладинки розміром 1×2 см наносили 1–2 г розчину йоду в калію йодиді. Через визначені проміжки часу здійснювали екстракцію йоду з підкладинки метанолом упродовж 10 хв. Одержаний розчин розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Кількісний вміст йоду визначали титруванням 0,05 н розчином тіосульфату натрію за відомою методикою [16].

Одержання гідрогелевих пластин. Гідрогелі отримували із використанням пектину цитрусового та альгінату натрію як полімерів-гелеутворювачів за методом структурування солями кальцію [17]. Після формування гідрогелі відпресовували до різних ступенів відносної деформації з використанням пресувальної машини типу Sky Rack SR-42130. Ступінь відносної деформації гідрогелевих пластин (η) розраховували за рівнянням:

$$\eta = (h_0 - h) / h_0, \qquad (1)$$

де h_0 – товщина пектинового гідрогелю, мм; h – товщина пектинового гідрогелю після витиснення, мм.

Визначення ступеня набрякання зразків гідрогелів у воді та в ексудаті. Модель раневої рідини готували за методикою, описаною у [6]. Ступінь набрякання гідрогелів у воді та в ексудаті визначали із використанням методу "чайного пакетика" [18]. Ступінь набрякання α розраховували за рівнянням:

$$\alpha(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100, \qquad (2)$$

де m_t – маса набряклого зразка гідрогелю, г; m_0 – маса сухого полімеру, г

Введення бетадину та хлоргексидину до складу відпресованих гідрогелевих пластин. Бетадин та хлоргексидин вводили до складу відпресованих гідрогелевих пластин, які набрякали у водному розчині антисептичного препарату (концентрація бетадину – 10 %, хлоргексидину біглюконату – 2 %) упродовж 10–20 годин, залежно від необхідної концентрації антисептика у складі гідрогелевої пластини за її максимального ступеня набрякання.

Дослідження вивільнення бетадину та хлоргексидину зі складу гідрогелевих пластин. Зразки гідрогелів, насичені антисептичними препаратами, поміщали у восьмикратний до їх маси надлишок розчинника, через визначені проміжки часу брали проби розчину і з використанням спектрофотометра ULab 102 UV вимірювали оптичну густину: за λ = 470, 580 нм для бетадину та λ = = 257 нм для хлоргексидину. Кількісний вміст антисептика у розчині розраховували, використовуючи попередньо встановлені калібрувальні залежності:

Сб = 2,538·D – 0,015 для бетадину;

Схл = 376,7·D – 0,009 для хлоргексидину.

За отриманим значенням концентрації препарату в розчині розраховували кількість препарату, що залишився у гідрогелевій пластині.

Дослідження цитотоксичності гідрогелевих пластин. Для оцінювання цитотоксичності гідрогелевих пластин на основі природних полісахаридів брали еякуляти бугаїв з фізіологічними характеристиками: об'ємом – 3–6 мл, концентрацією сперміїв – 0,8–1,3×109 клітин/мл і кількістю живих 70–85 %. Сперму розріджували фосфатно-сольовим буфером (ФСБ; NaCl – 0,8 г, KCl – 0,02 г, Na_2HPO4 – 0,11 г, KH_2PO4 – 0,02 г, $MgCl_2$ – 0,01 г, вода дистильована – до 100 мл) і ділили на частини: контрольну – зразки, розбавлені ФСБ; дослідні – із додаванням пектинових гідрогелевих пластин у розбавлені ФСБ зразки. У дослідні зразки додавали гідрогелеві пластини на основі пектину та альгінату натрію у дозах: 20,

50 і 100 мг/мл розбавленої сперми. Досліджували виживання сперміїв (год) під мікроскопом (×200) до припинення прямолінійного поступального руху в збереженій за температури 2–5 °С спермі та активність окиснювального ензиму цитохромоксидази (ЦХО, од.) з реактивом "наді" [19].

Результати досліджень та їх обговорення

Гідрогелеві пластини одержували з використанням пектину та альгінату натрію як полімерів-гелеутворювачів та хлориду кальцію як агенту структурування за методикою, яку ми описали у роботі [17]. Елементарними ланками використаних полісахаридів є уронові кислоти [20], причому в цитрусовому пектині більшість карбоксильних груп у макромолекулі естерифікована, що спричиняє значне зменшення ймовірності утворення міжмолекулярних сольових зв'язків під час структурування. Встановлено, що, використовуючи як полімер-гелеутворювач лише високоестерифікований пектин, сформувати гідрогелеву пластину не вдається [17]. А введення альгінату натрію як додаткового полімеру-гелеутворювача до складу гідрогелевої композиції дає змогу збільшити кількість карбоксильних груп у складі композиції та отримати достатньо міцні та пластичні гідрогелеві пластини.

Внаслідок комбінації високоестерифікованого пектину й альгінату натрію у гелеутворювальній композиції зростає спроможність одержаних пластин до набрякання, але не досягаються ступені набрякання, необхідні для використання їх як гідрогелевих лікувальних матеріалів [17]. Проведені дослідження показали, що істотно збільшити ступінь набрякання гідрогелевих пластин, одержаних на основі пектину й альгінату натрію, можна за рахунок їх пресування після формування, внаслідок якого спостерігається незворотна пластична деформація зразків. У табл. 1 наведено дані щодо ступеня набрякання у воді та ексудаті зразків гідрогелевих пластин відразу після формування та після подальшого пресування до різних ступенів відносної деформації.

Як свідчать наведені дані, набрякання істотно зростає зі збільшенням ступеня відносної деформації і може досягати значень, які достатні для використання їх як лікувальних пов''язок для терапії ран, що виділяють ексудат у малій або помірній кількості (пролежневі, гнійні, трофічні післяопераційні та рани механічного походження на другій та третій стадіях терапії) [21].

Таблиця 1

Властивості гідрогелевих пластин залежно від ступеня відносної деформації

№	Ступінь відносної деформації	Вміст полімерів, %	Початковий вміст води в гелі, г/г	Рівноважне набрякання у воді, г/г	Набрякання в ексудаті, г/г
1	0	5,7	17,01	18,09	5,33
2	0,3	6,5	14,92	20,65	11,42
3	0,5	8,2	11,82	28,57	20,84
4	0,7	15,9	6,11	34,43	21,28

Таблиця 2

Активність окисних ензимів і виживання сперміїв у разі введення пектинових гідрогелевих пластин у зразки сперми

Вміст гідрогелевих пластин у зразках, мг/мл	Активність окиснювального ензиму (ЦХО), од.	Виживання, год
100	25,2±1,1	53±4
50	23±1,36	53±4
20	28±1,36	58±5
контроль	25±2	58±5

Вагомою вимогою до полімерних матеріалів медичного призначення є відсутність токсичності, що особливо важливо під час створення антисептичних виробів. Для підтвердження відсутності токсичних властивостей полімеру пластини виконано низку цитологічних досліджень на живих клітинах (еякуляті бугаїв). У результаті цих досліджень (табл.2) встановлено, що збільшення вмісту пектинової гідрогелевої пластини в розрідженій спермі незначно впливає на виживання сперміїв, що в сукупності з активністю ензимів дихального ланцюга мітохондрій свідчить про відсутність цитотоксичного ефекту. Отже, сформовані за описаною методикою гідрогелеві пластини можна рекомендувати використовувати як матеріали медичного призначення.

З літературних джерел [22] відомо, що йод із макромолекулами полісахаридів у водних середовищах може формувати молекулярні комплекси, утворення яких зменшує швидкість сублімації йоду із основи, що надає можливість одержувати на основі таких комплексів системи пролонгованої дії. Проте наші дослідження показують, що утворення зазначених комплексів недостатньо сповільнює вивільнення.

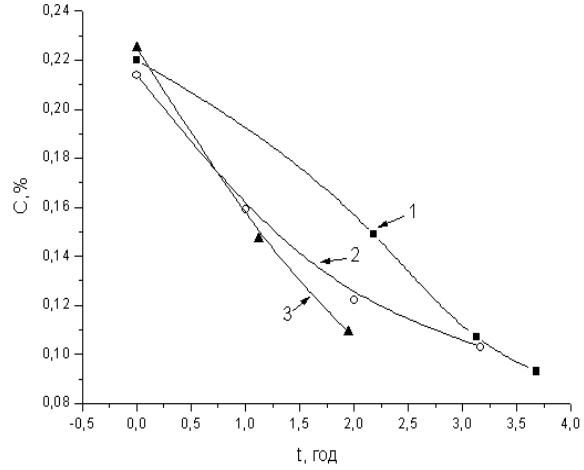

Рис. 1. Криві вивільнення йоду із водних розчинів пектину: 1 – концентрація пектину 10 %; мольне співвідношення КІ:I_2 = 2:1; 2 – концентрація пектину 10 %, мольне співвідношення КІ:I_2 = 1:1; 3 – без вмісту пектину, мольне співвідношення КІ:I_2 = 2:1

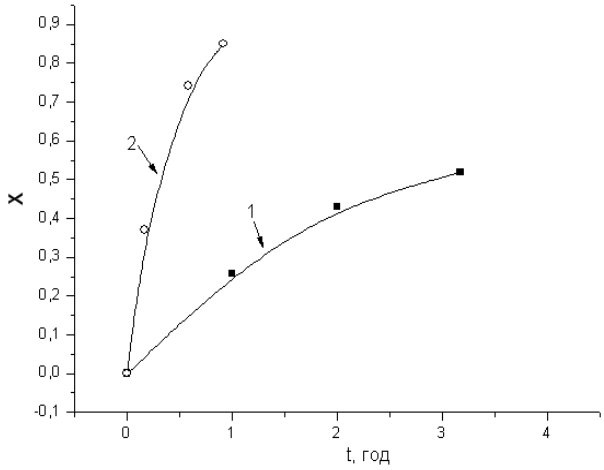

Рис. 2. Залежність ступеня вивільнення йоду (X) від часу: 1 – з розчину пектину; 2 – із марлевої підкладинки

Крива 3 на рис. 1 демонструє швидкість вивільнення йоду (в комплексі із КІ) з водного розчину, криві 1 і 2 – швидкість вивільнення йоду, за цієї ж концентрації, із комплексів з пектином різної концентрації. Спостерігається сповільнення виділення, але воно, на нашу думку, є не настільки істотним, щоб формувати системи пролонгованої дії. Здійснено також порівняльні дослідження процесу вивільнення йоду із марлевої підкладинки (як модель матеріалу, що використовується на бактерицидних пластирах) та з пектинового розчину. Кінетичні криві вивільнення наведено на рис. 2. Виявлено, що за однакових умов вивільнення йоду з пектинового розчину відбувається пролонгованіше, на відміну від марлевої підкладинки, де йод вивільняється практично повністю вже впродовж 1 год (рис. 2). Отже, експериментально встановлено, що використання йоду як антисептичного лікарського засобу для наповнення гідрогелевих пов'язок на основі пектину та альгінату натрію недостатньо ефективне.

Для дослідження антисептичної активності хлоргексидину та бетадину у складі полісахаридних гідрогелевих пластин здійснювали насичення відпресованих зразків антисептиками під час сорбції їх водних розчинів. Після цього вивчали їх вивільнення з водного середовища гідрогелевих пластин у середовище октанолу-1, оскільки бінарна система октанол-1-вода вважається моделлю взаємодії клітинної мембрани із середовищем, що

її оточує [23]. На рис. 3 наведена крива вивільнення бетадину та хлоргексидину зі зразків гідрогелевих пластин у часі. Як видно (рис. 3), упродовж першої доби відбувається виділення більше ніж 30 % бетадину від кількості сорбованого препарату. Аналогічні дослідження щодо вивільнення хлоргексидину зі зразків гідрогелевих пластин показали, що впродовж двох годин відбувається вивільнення 40–50 % введеного препарату, далі швидкість вивільнення дещо зменшується (рис. 3).

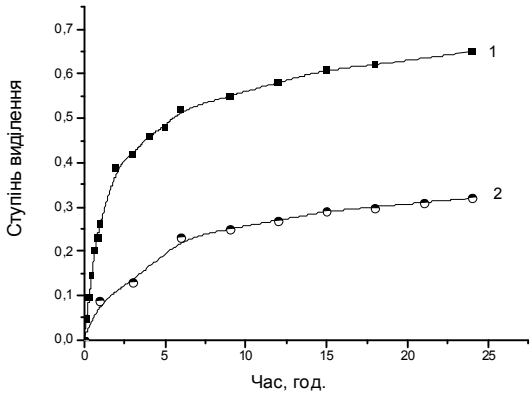

Рис. 3. Залежність ступеня вивільнення антисептичного препарату від часу:
1 – хлоргексидин; 2 – бетадин

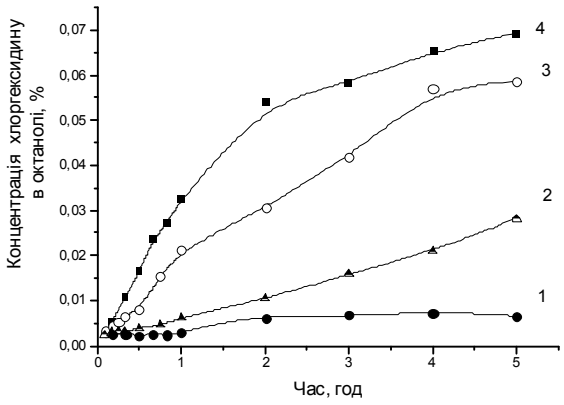

Рис. 4. Залежність кількості вивільненого хлоргексидину в октанол від часу за різних початкових концентрацій антисептика в гелі:
1 – 0,05 %; 2 – 0,075 %; 3 – 0,4 %; 4 – 1,5 %

Подальші дослідження процесу вивільнення виконували з використанням антисептичних гідрогелів, наповнених хлоргексидином. Цей вибір зумовлений ширшим використанням цього антисептика під час хірургічних втручань та для післяопераційного догляду за ранами. Для цього були отримані зразки гідрогелів, до складу яких вводили різну кількість хлоргексидину. На рис. 4 наведено криві вивільнення хлоргексидину залежно від кількості препарату, сорбованого зразком гідрогеля. Результати дослідження вивільнення хлоргексидину зі зразків гідрогелів показують, що за всіх концентрацій хлоргексидину, що досліджували, відбувається поступове виділення сорбованого препарату зразком гідрогеля з часом, що дає змогу забезпечити пролонговану дію антисептичного препарату в часі.

За результатами мікробіологічних досліджень пектиново-альгінатних антисептичних пластин зі ступенем відносної деформації 0,85 встановлено, що хлоргексидин, який міститься у зразках, вивільняючись, гальмує ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій. Водночас спостерігається збільшення радіуса гальмування росту бактерій залежно від дози внесеного в гель хлоргексидину. За вмісту діючої речовини в межах 1,0–1,5 % проявляється максимально ефективне інгібування росту незалежно від виду мікроорганізмів.

Узагальнюючи результати досліджень щодо цитотоксичності, введення та виведення антисептичних препаратів, можна стверджувати, що одержані гідрогелеві пластини на основі пектину та альгінату натрію можна рекомендувати для створення надалі сучасних гідрогелевих перев'язувальних матеріалів із антисептичними властивостями.

Висновки

Із використанням гелеутворювальних полімерів природного походження, а саме пектину та альгінату натрію, одержано гідрогелеві пластини. Отримані за запропонованим методом пластини характеризуються достатньою спроможністю до набрякання у моделі раневого ексудату, відсутністю цитотоксичного впливу на живі клітини, тож їх можна використовувати надалі для створення гідрогелевих перев'язувальних матеріалів. Вста-

новлено, що для надання одержаним виробам антисептичних властивостей доцільно наповнювати їх бетадином або хлоргексидином. Виконані дослідження демонструють ефект пролонгованого виділення цих антисептиків зі складу пластин, внаслідок чого відбувається пригнічення росту грампозитивних та грамнегативних бактерій.

References

1. Tavakoli, S., Klar, A. S. (2020). Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules*, *10*(8), 1169. DOI: 10.3390/biom10081169.

2. Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., Tao, O. (2019). Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials*, *12*, 3323–3356. DOI: 10.3390/ma12203323.

3. Catoira, M., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, *30*, 105–115. DOI: 10.1007/s10856-019-6318-7.

4. Samchenko, Y., Korotych, O., Kernosenko, L., Poltoratska, T., Pasmurtseva, N. (2018). Stimuli-responsive hybrid porous polymers based on acetals of polyvinyl alcohol and acrylic hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *544*, 91–104. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.02.015.

5. Barbetta, A., Barigelli, E., Dentini, M. (2009). Porous Alginate Hydrogels: Synthetic Methods for Tailoring the Porous Texture. *Biomacromolecules*, *10*, 2328–2337. DOI: 10.1021/bm900517q.

6. Rezvanian, M., Ahmad, N., Mohd Amin, M. C. I., Ng, S. (2017). Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *97*, 131–140. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.079.

7. Tummalapalli, M., Berthet, M., Verrier, B., Deopura, B. L., Alam, M. S., Gupta, B. (2016). Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, *82*, 104–113. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.087.

8. Weller, C. D., Team, V., Sussman, G. (2020). First-Line Interactive Wound Dressing Update: A Comprehensive Review of the Evidence. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 155–179. DOI: 10.3389/fphar.2020.00155.

9. Lucília P. da Silva, Rui L. Reis, Vitor M. Correlo, Alexandra P. Marques. (2019). Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *21*, 145–169. DOI: 10.1146/annurev-bioe ng-060418-052422.

10. Ehterami, A., Salehi, M., Farzamfar, S., Samadian, H., Vaez, A., Sahrapeyma, H., Ghorbani, S. (2020). A promising wound dressing based on alginate hydrogels containing vitamin D3 cross-linked by calcium carbonate/d-glucono-δ-lactone, *Biomedical Engineering Letters*, *10*, 309–319. DOI: 10.1007/s13534-020-00155-8.

11. Stoica, A. E., Chircov, C., Grumezescu, A. M. (2020). Hydrogel Dressings for the Treatment of Burn Wounds: An Up-To-Date Overview. *Materials*, *13*, 2853–2877. DOI: 10.3390/ma13122853.

12. Narayanaswamy, R., Torchilin, V. P. (2019). Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. *Molecules*, *24* (3), 603–624. DOI: 10.3390/MOLECULES24030603.

13. Palii, H. K, Nechytailo, M. Ie., Kovalchuk, V. P. ta in. (2010). Porivnialna kharakterystyka antyseptychnoi aktyvnosti dekametoksynu ta furatsylinu. *Zdorovia Ukrainy*, *22* (251), 56–57.

14. Giordano, S., Peltoniemi, H., Lilius, P., Salmi, A. (2013). Povidone-iodine combined with antibiotic topical irrigation to reduce capsular contracture in cosmetic breast augmentation: a comparative study. *Aesthetic Surgery Journal*, *33*(5), 675–680. DOI: 10.1177/1090820X13491490.

15. Bigliardi, P. L., Alsagoff, SAL., El-Kafrawi, H. Y., Pyon, J. K., Wa C. T. C., Villa, M. A. (2017). Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery*, *44*, 260–268. DOI: 10.1016/j.ijsu.2017.06.073.

16. Syhhya, S., Khanna, Dzh. H. (1983). *Kolichestvennyiy organicheskiy analiz po funktsionalnyim gruppam.* M.: Khimiia.

17. Dron, I., Stasiuk, A., Bukartyk, M., Luhova, Yu., Samaryk, V. (2020). Formuvannia hidroheliv na osnovi pektynu z riznym stupenem esteryfikatsii. *Khimiia, tekhnolohiia rechovyn ta yikh zastosuvannia*, *3* (1), 239–244.

18. Zhang, K., Feng, W., Jin, C. (2020). Protocol efficiently measuring the swelling rate of hydrogels. *Methods X.*, *7*. DOI: 10.1016/J.MEX.2019.100779.

19. Chukhrii, B. M., Klevets, L. O., Ostapiv, D. D. (1995). Kolorymetrychnyi sposib vyznachennia aktyvnosti suktsynatdehidrohenazy v spermi buhaiv. *Visnyk ahrarnoi nauky*, *11*, 73–76.

20. Yapeng Fang, Saphwan Al-Assaf, Glyn, O. Phillips, Katsuyoshi Nishinari, Takahiro Funami, Peter A. Williams. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, *72*, 334–341. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.08.021.

21. Peles, Z., Zilberman M. (2012). Novel soy protein wound dressings with controlled antibiotic release: mechanical and physical properties, *Acta Biomaterialia*, *8*(1), 209–217. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.08.022.

22. Moulay, S. (2013). Molecular iodine-polymer complexes. *Journal of Polymer Engineering*, *33*(5), 389–443. DOI: 10.1515/polyeng-2012-0122.

23. Hansch, C., Fujita, T. (1963) ρ-σ-π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, *86*, 1616–1626.

I. A. Dron[1], N. M. Bukartyk[1], M. M. Bukartyk[1], D. D. Ostapiv[2], V. Ya. Samaryk[1]
[1] Lviv Polytechnic National University,
Department of Organic Chemistry,
[2] Institute of Animal Biology of NAAS,
The laboratory of Molecular Biology and Clinical Biochemistry

PREPARATION OF ANTISEPTIC HYDROGEL PLATES BASED ON NATURAL POLYSACCHARIDES

Using natural polysaccharides, pectin and sodium alginate, hydrogel plates capable of absorbing exudate were obtained. Studies have shown no cytotoxicity of the plate material. In order to create bactericidal therapeutic dressings based on them, the possibility of filling the plates with antiseptics (iodine, betadine, chlorhexidine) was shown and their release dynamics was studied. Studies have shown that the release of iodine from the plate is too fast and can not meet the condition of its prolonged release in contrast to betadine and chlorhexidine.

Key words: polysaccharide; hydrogel; antiseptic; pectin; sodium alginate; betadine; chlorhexidine.