

POLIMERY

CZASOPISMO POŚWIĘCONE CHEMII, TECHNOLOGII i PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

Polimery uwalniające tlenek azotu(II)

Beata Parzuchowska¹⁾, Paweł Parzuchowski^{2),*)}

DOI: dx.doi.org/10.14314/polimery.2014.107

Streszczenie: Artykuł stanowi przegląd literaturowy dotyczący materiałów polimerowych zdolnych do generowania tlenku azotu(II). Tlenek azotu (NO) w organizmie pełni, m.in. funkcje ochronne, regulujące i sygnalizacyjne, bierze udział w regulacji ciśnienia krwi, procesach krzepnięcia, neurotransmisji i odpowiedzi immunologicznej. Omówiono zagadnienia związane z chemicznym wiązaniem cząsteczek donorów NO — diolanów diazoniowych — z łańcuchami polimerowymi lub cząstkami wypełniaczy. Podano podstawowe informacje na temat syntezy, właściwości oraz metod badania diolanów diazoniowych. Omówiono procesy modyfikacji polegające na wprowadzeniu donorów tlenku azotu do polimerów powszechnie uznawanych za biokompatybilne, takich jak: polisiloksany, poliuretany, poliakrylany, poli(chlorek winylu). Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku mało polarnych polimerów, takich jak: polisiloksany, modyfikowana krzemionka oraz polimery akrylowe, zdolnych do generowania kilku μmol NO na mg materiału. Największe ilości tlenku azotu uwalniają układy obejmujące polimery mało polarne modyfikowane diolanami diazoniowymi typu anionowego, a generowanie diolanów diazoniowych typu jonów obojętnych nie daje zadawalających efektów. Niektóre z opisanych układów polimerowych były zdolne do generowania tlenku azotu w ilościach tylko kilku-kilkunastu nmol/mg. Efektywny strumień NO generowany przez układy biologiczne jest jednak tak mały, że nawet tak słabe donory tlenku azotu mogą znaleźć dalsze zastosowania.

Słowa kluczowe: tlenek azotu(II), polimery, diolany diazoniowe.

Nitric oxide(II) releasing polymers

Abstract: The paper is a literature review concerning the polymeric materials capable of generating nitric oxide(II). The role of nitric oxide (NO) in an organism comprise the protective, regulatory, and signaling functions. NO molecule is involved in the regulation of blood pressure, clotting, neurotransmission and the immune response. The problems associated with chemical bonding of NO donor molecules — diazeniumdiolates — to the polymeric chains or filler particles have been discussed. The basic information on the synthesis, properties and methods of the investigation of diazeniumdiolates was given. The modifications of polymeric materials by introducing of nitric oxide donors to the polymers commonly regarded as biocompatible such as: polysiloxanes, polyurethanes, polyacrylates or PVC have been presented. The best results were obtained for the polymers of low polarity such as polysiloxanes, modified silica or acrylic polymers, which are able to generate several μmol of NO per mg of the material. The largest amounts of nitric oxide were released from low-polarity polymers modified with diazeniumdiolates of the anionic type, whereas the generation of zwitterionic diazeniumdiolates have not produced satisfactory results. Some

¹⁾ Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa.

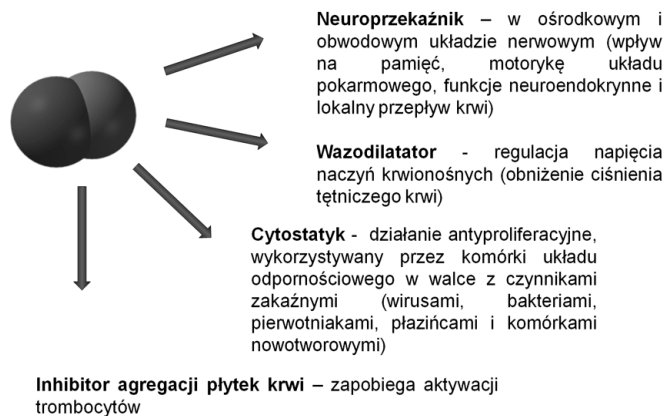
²⁾ Katedra Chemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa.

*) Autor do korespondencji; e-mail: pparzuch@ch.pw.edu.pl

of the described polymeric systems were capable of delivering nitric oxide at an almost negligible nmol per mg level. Efficient NO flux generated by biological systems, however, is so small that even such a weak nitric oxide donors may find further applications.

Keywords: nitric oxide (II), polymers, diazeniumdiolates.

Tlenek azotu (NO) to mała dwuatomowa cząsteczka, która – jak wykazano w ostatnich latach – odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych. Spełnia ona funkcje czynnika ochronnego, regulującego i sygnalizacyjnego, biorącego udział w regulacji ciśnienia krwi, procesach krzepnięcia, neurotransmisji i odpowiedzi immunologicznej (rys. 1) [1–4]. Tlenek azotu działa też stymulująco na pracę mózgu oraz pomaga w leczeniu problemów z erekcją i impotencją, a nawet niszczy niektóre postaci nowotworów [5]. Z tego względu bywa nazywany „cudowną cząsteczką”.



Rys. 1. Biologiczne funkcje tlenku azotu
Fig. 1. Biological functions of nitric oxide

Niedomiar tlenku azotu powoduje zaburzenia oddychania, impotencję, zapadanie się naczyń krwionośnych, lub powstawanie skrzepów. Również nadmiar tlenku azotu może być toksyczny. Zbyt duże obniżenie ciśnienia krwi spowodowane jego nadmiarem może prowadzić do niszczenia tkanek w niektórych chorobach przewlekłych np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów. NO obecny w nadmiarze, reagując z ponadtlenkami powstającymi w wyniku oddychania mitochondrialnego, może powodować niszczenie białek i DNA. Ze względu na swoje kluczowe funkcje bioregulacyjne, tlenek azotu jest jedną z najczęściej badanych cząsteczek w dziedzinie nauk biomedycznych. Czasopismo „Science” ogłosiło tlenek azotu(II) cząsteczką roku 1992.

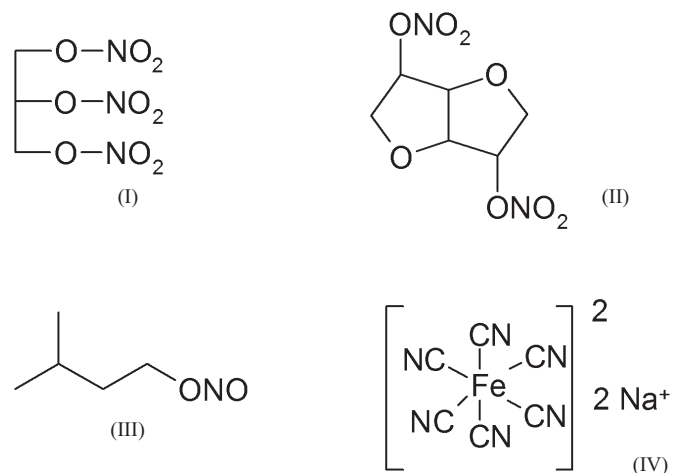
Biologiczne znaczenie tlenku azotu odkryto w wyniku prac grup badawczych trzech niezależnych ekspertów: Roberta Furchgotta (Dept. of Pharmacology, SUNY Health Science Center, Nowy Jork), Louisa Ignarro (Dept. of Molecular and Medical Pharmacology UCLA School of Medicine, Los Angeles) i Ferida Murada (Dept. of Integrative Biology Pharmacology and Physiology Univer-

sity of Texas Medical School, Houston). Robert Furchgott dowiódł, że komórki śródbłonna naczyń krwionośnych produkują nieznaną dotąd śródbłonkowy czynnik relaksacyjny (ang. *Endothelium Derived Relaxing Factor* – EDRF) powodujący rozluźnianie i rozszerzanie naczyń krwionośnych. Louis Ignarro kontynuując prace Furchgotta wykazał, że czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowany proces jest tlenek azotu. Było to pierwsze odkrycie wskazujące gaz jako czynnik sygnałowy w organizmie. Równolegle, Ferid Murad odkrył, że nitrogliceryna (oraz podobne leki nasercowe) generuje powstawanie tlenku azotu, co z kolei prowadzi do powiększenia średnicy naczyń krwionośnych i większego przepływu krwi. Dokonania te nagrodzono w 1998 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie Fizjologia i Medycyna [6].

W organizmie człowieka cząsteczka NO powstaje z reszty azotowej aminokwasu (L-argininy) w obecności NADPH (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) i tlenu cząsteczkowego, przy udziale enzymu – syntazy tlenku azotu. Ciało ludzkie produkuje od 1 do 9 mmoli NO na dobę [7]. Ze względu na swoją małą polarność oraz wielkość, NO może swobodnie dyfundować przez błony komórkowe, a dzięki swej reaktywności, może oddziaływać kowalencyjnie z różnymi białkami wpływając na ich aktywność.

Przemysłowo tlenek azotu produkuje się na drodze utleniania amoniaku. W laboratorium można go otrzymać w wyniku redukcji kwasu azotowego(III) za pomocą miedzi lub azotanu(III) sodu w obecności jonów żelaza(II). W czystej postaci NO jest gazem bezbarwnym. W obecności powietrza utlenia się do wyższych, „brunatnych” tlenków azotu.

Źródłem tlenku azotu(II) są też obecnie stosowane leki: nitrogliceryna [wzór (I)], diazotan izosorbidu [wzór (II)], azotan izoamylu [wzór (III)] oraz nitroprusydek sodu [wzór (IV)] [1]. Tlenek azotu(II) może być również



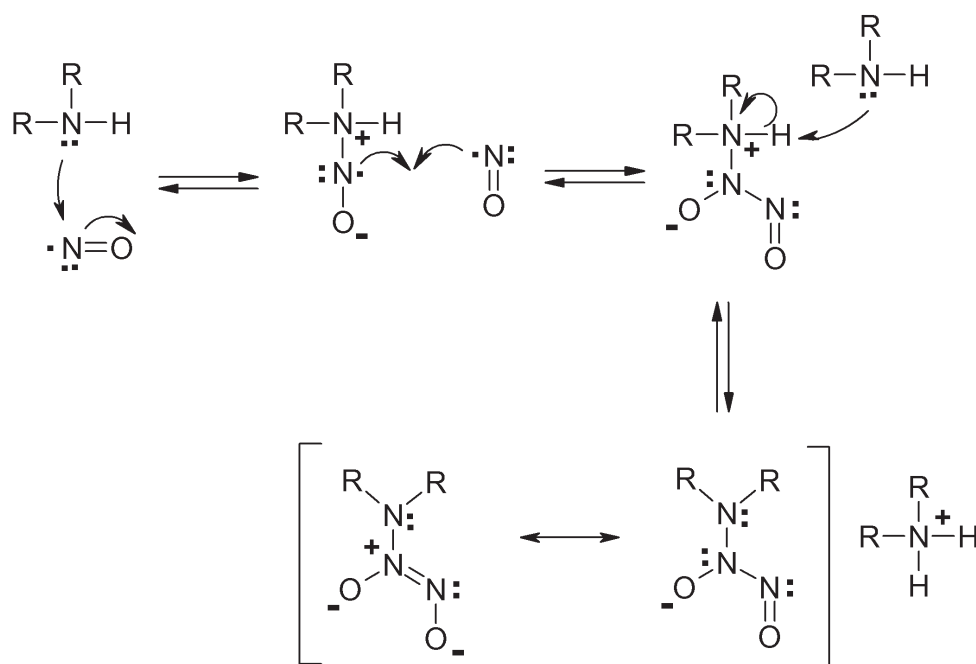
podawany w postaci pary na drodze inhalacji. Nitroglicerynę i diazotan izosorbidu aplikuje się zwykle doustnie lub przez skórę. Związki te metabolizują z wydzieleniem NO, powodując rozszerzanie się naczyń krwionośnych. Azotyn izoamylu w organizmie może ulegać bezpośredniej redukcji z wydzieleniem NO lub reagować z tiolami z utworzeniem S-nitrozotiole, które następnie metabolizują z wydzieleniem tlenu azotu. Podawany jest na drodze inhalacji. Nitroprusydek sodu wykorzystywany w intensywnej terapii w stanach bardzo wysokiego ciśnienia krwi jest wstrzykiwany bezpośrednio do krwionośnego obiegu. Tlenek azotu podawany przez inhalację stosuje się w małym stężeniu (ok. 20 ppm) jako mieszaninę z powietrzem. Powoduje rozszerzanie się naczyń krwionośnych w płucach. Ze względu na małą trwałość NO w organizmie konieczne jest podawanie ciągle w komorze inhalacyjnej lub przez respirator.

DIOLANY DIAZONIOWE – DONORY TLENU AZOTU(II)

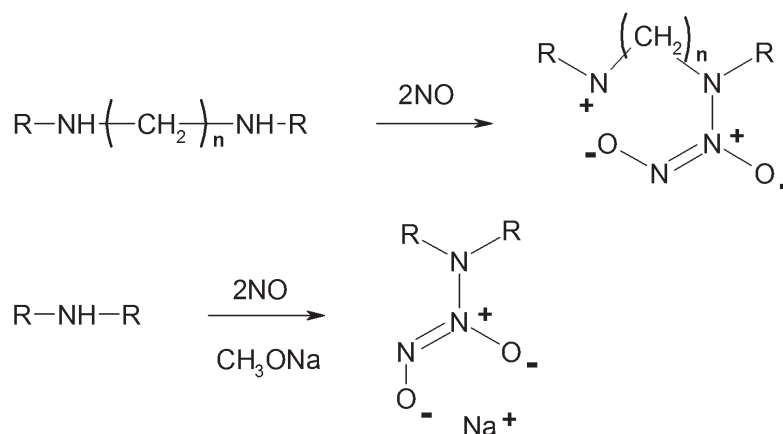
Metody syntezy

Tlenek azotu(II) w kontakcie z krwią ulega bardzo szybko dezaktywacji, dlatego istnieje potrzeba opracowania systemów jego kontrolowanego dozowania do organów, gdzie jest potrzebny, bez narażania innych części organizmu. Jedną z nowych grup związków ulegających rozkładowi z wydzieleniem NO są diolany diazoniowe (DDA) (ang. *diazoniumdiolates*).

W syntezie DDA wykorzystuje się fakt, że tlenek azotu zachowuje się jak kwas Lewisa (schemat A). Diolany diazoniowe są produktami reakcji alifatycznych amin pierwszo-, a częściej drugorzędowych z tlenkiem azotu w obecności zasady spełniającej rolę akceptora protonu.



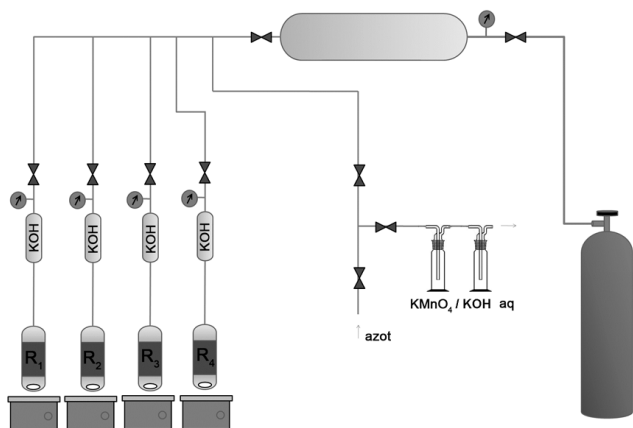
Schemat A



Schemat B

Zasadą może być inna cząsteczka tej samej aminy, drugie ugrupowanie aminowe tej samej cząsteczki (powstają diolany typu jonów obojnaczych) lub zasada zewnętrzna, np. metanolan sodu (powstają wtedy tzw. diolany anionowe) (schemat B). Dwie ostatnie grupy są najpopularniejsze.

W rzeczywistości istnieją dwie metody syntezy DDA [1]. Pierwsza metoda polega na przepuszczaniu pod ciśnieniem atmosferycznym NO przez roztwór aminy, w warunkach beztlenowych, w temp. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druga, częściej stosowana, polega na użyciu gazowego NO pod ciśnieniem ok. 0,5 MPa w temperaturze pokojowej i roztworu aminy w suchym rozpuszczalniku. W tym przypadku reakcja trwa od 72 do 96 h, w zależności od rodzaju aminy. W obu metodach produkt wytrąca się z roztworu w czystej postaci krystalicznej, którą następnie odsącza się i suszy w atmosferze beztlenowej. Schemat aparatury do syntezy diolanów diazoniowych

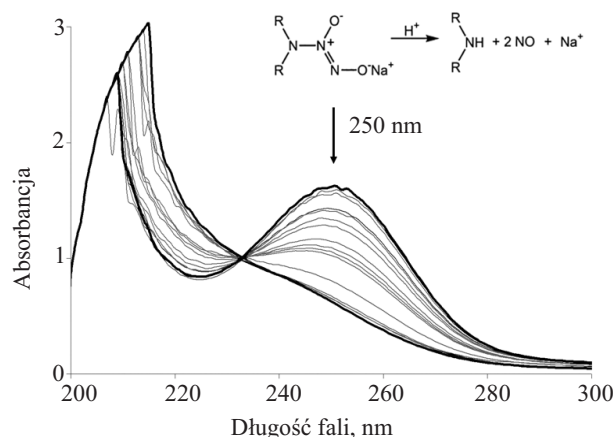


Rys. 2. Schemat aparatury do syntezy diolanów diazoniowych
Fig. 2. Schematic diagram of the setup used for the synthesis of diazeniumdiolates

atury do syntezy DDA metodą ciśnieniową przedstawiono na rys. 2. Układ umożliwia prowadzenie reakcji w czterech niezależnych od siebie szklanych reaktorach ciśnieniowych. Tlenek azotu jest podawany z butli do zbiornika przejściowego. Wybrany reaktor jest przepływany azotem, a następnie napełniany tlenkiem azotu przez pochłaniacz wilgoci wypełniony granulowanym wodorotlenkiem potasu. Po zakończeniu reakcji nieprzereagowany gaz odprowadza się przez system płuczek wypełnionych wodnym roztworem KMnO_4/KOH .

Właściwości i metody oznaczania

Diolany diazoniowe umieszczone w buforze, krwi itp., dysocjują z uwolnieniem NO i wolnej aminy. Przebieg procesu potwierdza, obserwowany w widmie UV-Vis, zanik charakterystycznego pasma przy ok. 250 nm (rys. 3). Czasy połowicznego rozpadu tych związków wynoszą od 2 s do 20 h, w zależności od budo-



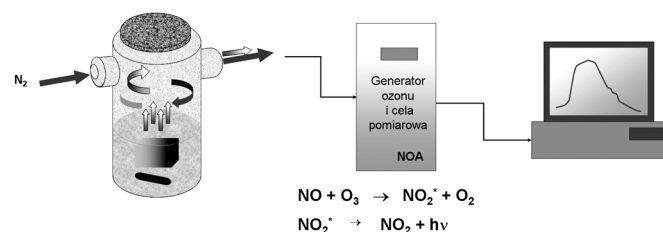
Rys. 3. Widmo UV-Vis diolanu diazoniowego poddanego działaniu rozcieńczonego kwasu solnego

Fig. 3. Decomposition of diazeniumdiolate in the presence of diluted hydrochloric acid observed in the UV-Vis spectrum

wy cząsteczki. Mechanizm rozkładu, odwrotny do mechanizmu powstawania DDA, jest inicjowany przez protonowanie azotu aminowego.

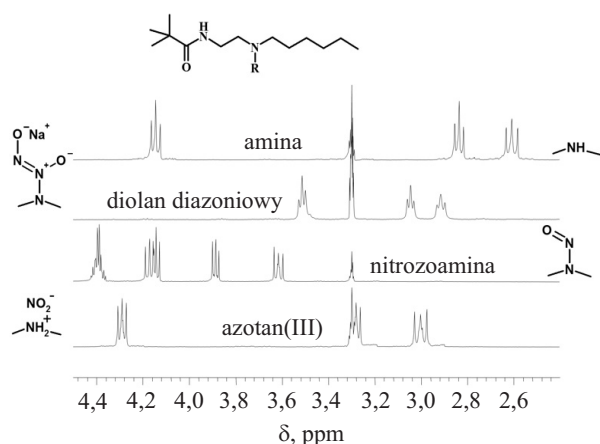
Do ok. 2000 r. do charakterystyki materiałów uwalniających NO stosowano test Griessa [8], stanowiący metodę kolorymetryczną opracowaną i stosowaną w kryminalistyce do wykrywania nitrogliceryny. Test polega na reakcji diazowania, w wyniku której sulfanilamid jest sprzęgany z *N*-naftyloetylenodiaminą. Natężenie barwy barwnika azowego jest proporcjonalne do ilości NO, utleniającego się w kontakcie z tlenem z powietrza do jonów NO_2^- . Test jest jednak niemiarodajny, jeśli w badanym materiale występują azotyny.

Obecnie najczęściej stosuje się chemiluminescencyjne analizatory tlenku azotu (rys. 4). W aparatach tych gaz nośny zawierający NO miesza się z dużym nadmiarem ozonu. W wyniku reakcji z ozonem powstaje tlen i ditlenek azotu, generowane też są fotony (reakcja chemiluminescencyjna) mierzone fotodetekтором. Ilość światła jest proporcjonalna do ilości NO. Zwykle próbkę materiału umieszcza się w buforze fosforanowym. Problemem jest zbyt duża rozpuszczalność NO w buforze, dlatego też stosuje się specjalne konstrukcje naczynek, umożliwiające dodatkowe przedmuchiwanie roztworu gazem nośnym [9].



Rys. 4. Układ do analizy ilości wydzielonego tlenku azotu metodą chemiluminescencyjną

Fig. 4. Setup for the determination of released nitric oxide by chemiluminescence method



Rys. 5. Przesunięcia chemiczne protonów grup metylenowych przy atomach azotu w widmach ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) pochodnych *N*-heksyl-*N'*-(*t*-butylokarbonylo)etylenodiaminy z różnym rodzajem podstawnika R

Fig. 5. Comparison of ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) chemical shifts of methylene protons adjacent to a nitrogen atom in *N*-hexyl-*N'*-(*t*-butylcarbonyl)ethylenediamine for various types of R substituent

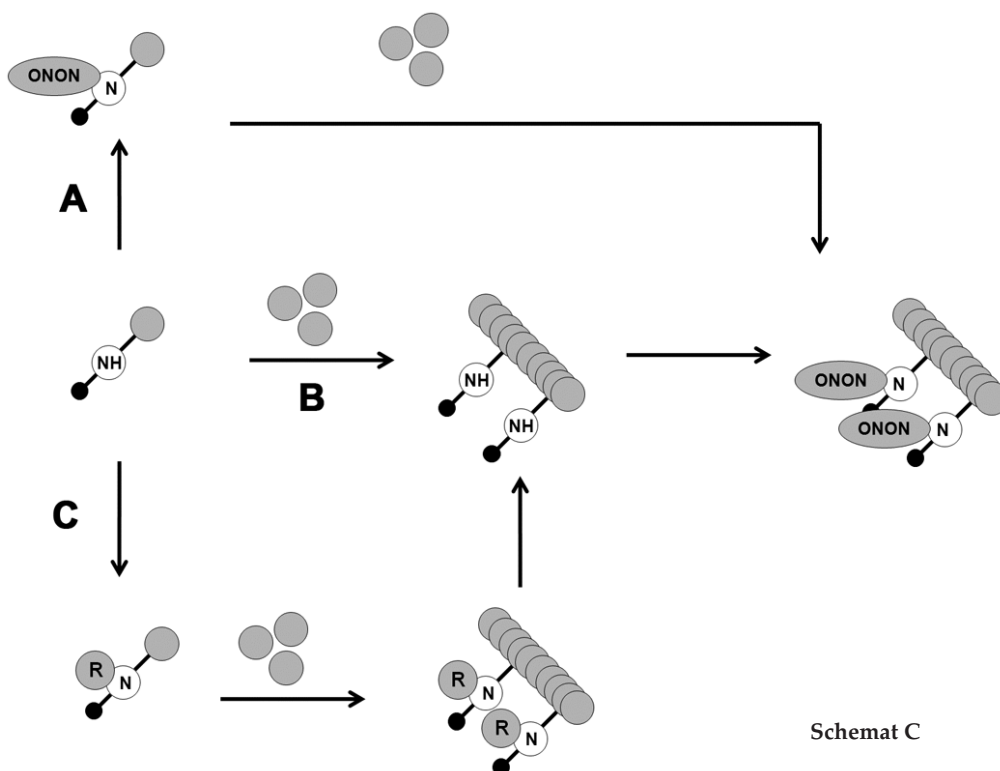
Do analizy budowy DDA z powodzeniem można wykorzystywać również spektroskopię protonowego rezonansu magnetycznego ^1H NMR. Dzięki dużym różnicom przesunięć chemicznych protonów grup CH_2 przy atomie azotu, jest możliwe rozróżnienie poszczególnych pochodnych (rys. 5). Na podstawie widm NMR stwierdzono, że obecność tlenu zarówno podczas otrzymywania, jak i rozkładu diolanów diazoniowych powoduje powstawanie niezamierzonych produktów. W przypadku

syntezy w obecności tlenu powstawały głównie nitrozoaminy i azotany(III), w przypadku rozkładu zaś produktami były wolna amina i nitrozoamina [10].

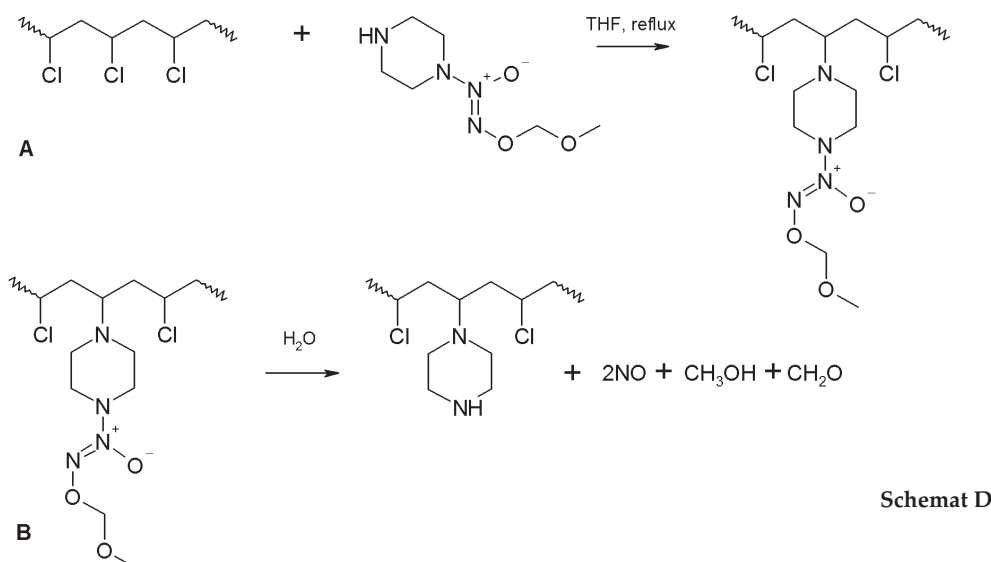
Układy polimerowe zawierające diolany diazoniowe

Wykorzystywanie diolanów diazoniowych jako donorów NO w układach biologicznych, stwarza niebezpieczeństwo przenikania do krwioobiegu substancji niebezpiecznych, takich jak nitrozoaminy. Zjawisku temu można zapobiegać wieloma sposobami. Najprostszym jest stosowanie DDA o charakterze hydrofobowym, np. posiadających w swojej budowie długie podstawniki alifatyczne, umieszczonych w matrycy polimerowej [11, 12]. Kolejne rozwiązanie polega na chemicznym wiązaniu donorów tlenu azotu na powierzchni napętniaczy, np. krzemionki koloidalnej. Najbardziej zaawansowane rozwiązania polegają zaś na immobilizacji cząsteczek donorów na matrycach polimerowych. Materiał polimerowy zazwyczaj charakteryzuje się korzystnymi właściwościami mechanicznymi, które można dostosować do konkretnych aplikacji. Rozwiązanie takie pozwala na otrzymywanie tzw. „szytych na miarę” materiałów uwalniających NO.

Do potencjalnych zastosowań polimerowych donorów NO zalicza się warstwy ochronne zwiększające biokompatybilność narzędzi i sensorów medycznych, stenty naczyniowe, implanty, urządzenia do hemodializy, cewniki, soczewki kontaktowe, pojemniki do przechowywania produktów krwiopochodnych, itp. Takie polimerowe materiały mogą również znaleźć zastosowanie w transplantologii, gdzie wykorzystuje się antyzakrzepowe



Schemat C



i antybakteryjne działanie tlenku azotu, a także jego zdolność do zwiększania natlenowania narządów przewodzących do przeszczepu.

Obecnie badania skupiają się w największym stopniu na wytwarzaniu warstw atrombogennych. Ich zadaniem jest naśladowanie zjawiska naturalnie występującego w komórkach śródbłonkowych, stanowiących wyściółkę naczyń krwionośnych w organizmie i emitujących do krwioobiegu niewielkie ilości tlenku azotu, zapobiegającego adhezji i aktywacji płytek krwi. Wymagany w tych zastosowaniach strumień NO generowany z powierzchni komórek śródbłonka, wg różnych źródeł wynosi $0,5-4,1 \cdot 10^{-10}$ mol/min cm [13, 14].

Polimery uwalniające tlenek azotu stanowią stosunkowo nową dziedzinę wiedzy. Większość publikacji powstała w ciągu ostatnich dziesięciu lat. W charakterze matryc polimerowych stosowano głównie polimery powszechnie znane ze swojej obojętności biologicznej, takie jak polisiloksany, poliuretany, poli(chlorek winylu), poliakrylany. W ostatnich dwóch latach w tematyce badań pojawił się również problem biodegradowalności polimerowych nośników NO, w tym także nośników o budowie rozgałęzionej. Rozwijane są też badania nad układami zawierającymi nowe źródła tlenku azotu, takie jak nitrozotiole lub układy katalityczne bazujące na reakcji jonów azotanowych(III).

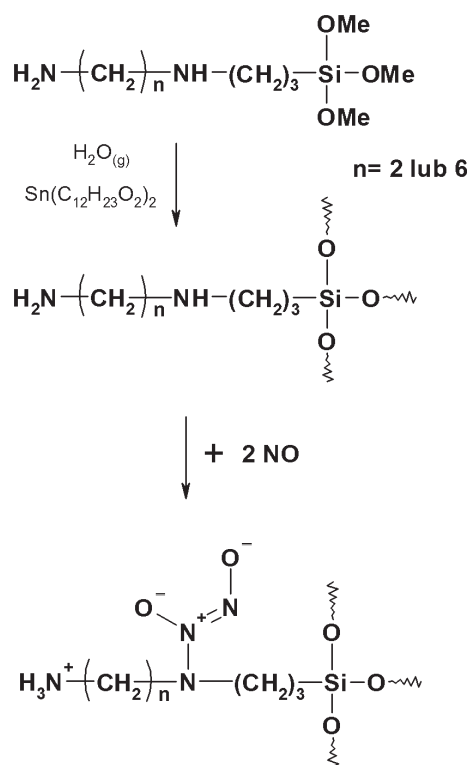
W literaturze opisano różne metody otrzymywania polimerowych materiałów uwalniających tlenek azotu. Pierwsza z nich (schemat C: A) polega na wykorzystaniu monomeru zawierającego drugorzędowe grupy aminowe oraz grupę funkcyjną umożliwiającą wbudowanie go w strukturę polimeru lub immobilizację na powierzchni innego materiału. Grupy aminowe poddaje się reakcji z tlenkiem azotu, a produkt – reakcji polimeryzacji. Jest to jednak rozwiązanie możliwe tylko w przypadku DDA o największej trwałości. Gdy grupa funkcyjna odpowiedzialna za polimeryzację nie może reagować z grupami aminowymi, wówczas przeprowadza się wstępnie proces polimeryzacji (schemat C: B), po którym następuje

etap addycji tlenku azotu. Najbardziej skomplikowany przypadek ma miejsce, gdy grupy funkcyjne odpowiedzialne za polimeryzację mogą reagować z grupami aminowymi. Konieczna jest wtedy synteza monomeru z zablokowanymi grupami aminowymi, jego polimeryzacja i odblokowanie grup aminowych, a dopiero następnie addycja NO (schemat C: C).

Jeden z pierwszych przykładów polimerów uwalniających tlenek azotu opisali Meyerhoff i współpr., którzy wykorzystali pochodną piperazyny, zawierającą ugrupowanie DDA zabezpieczone grupą metoksymetylową, do immobilizacji na poli(chloroku winylu) (PVC) (schemat D: A – synteza, B – hydroliza) [15]. Uzyskane materiały w kontakcie z krwią nie powodowały aktywacji trombocytów i generowały do 0,8 nmoli NO na mg materiału. Modyfikowany PVC wykazywał jednak szereg niekorzystnych właściwości, takich jak: konieczność stosowania plastyfikatora, co przyczyniało się do powstawania zagłębień na powierzchni spowodowanych jego wypływaniem, małą szybkość uwalniania NO ograniczoną obecnością stosunkowo trwałej grupy metoksymetylowej, a także toksyczne produkty rozkładu (obecność metanolu i formaldehydu wśród produktów hydrolizy).

Większość opisanych w literaturze układów dotyczy gotowych polimerów zawierających drugorzędowe ugrupowania aminowe, poddawanych reakcji z tlenkiem azotu. Dobry przykład stanowią tu żywice silikonowe. Produktem wyjściowym do ich syntezy był trimetoksylan z łańcuchem bocznym zawierającym wolne grupy aminowe (schemat E) [16].

Żywice silikonowe uwalniające tlenek azotu otrzymywano w procesie dwustopniowym [16]. Na pierwszym etapie oleje silikonowe (np. polidimetylosiloksany zawierające końcowe grupy hydroksylowe) poddawano sieciowaniu trimetoksylanem. Proces biegnący w obecności wilgoci z powietrza, katalizowany laurynianem cyny(II), prowadził do kowalencyjnego związania wszystkich składników mieszaniny reakcyjnej. Wytworzone żywice umieszczano następnie w reaktorze ciśnie-



Schemat E

niowym (por. rys. 2) pod ciśnieniem 0,55 MPa na czas 36–64 h. Otrzymano DDA typu jonów obojnych (schemat B). Konwersja grup aminowych, przy założeniu, że na każdą cząsteczkę diolanu diazoniowego przypada jeden kation amoniowy, wyniosła 40–60 %. W tym przypadku mamy jednak do czynienia z siecią polimerową zdolną do fizycznego wiązania gazu w swojej objętości. Możliwe jest więc, że faktyczne stopnie przereagowania grup aminowych były mniejsze niż przedstawiane przez autorów. Całkowita ilość tlenu azotu uwolnionego w żywicy silikonowej nie przekraczała 63 nmol/cm², dla warstwy o grubości 700 μm. Modyfikowane żywice silikonowe charakteryzowały się podatnością na adhezję trombocytów, jednak po zetknięciu z powierzchnią materiału nie ulegały aktywacji.

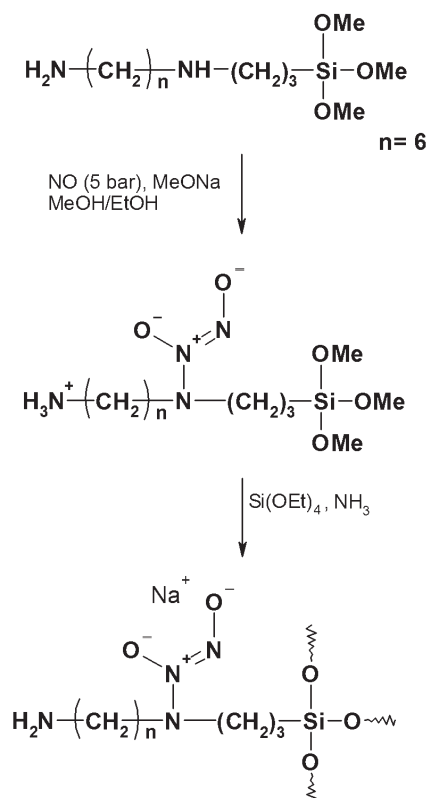
W podobnym procesie modyfikowano krzemionkę koloidalną [17], która może służyć jako napelniczą różnych systemów polimerowych. Takie same trimetoksylany poddano chemicznej immobilizacji na powierzchni krzemionki, a następnie przeprowadzono syntezę diolanów diazoniowych typu zwitterjonów oraz jonowych, stosując zasadę zewnętrzną (metanolan sodu). Efektywność tworzenia struktur DDA była niewielka i nie przekraczała, odpowiednio, 12 % w przypadku diolanów typu jonów obojnych i 33 w przypadku typu jonowego. Ze względu jednak na relatywnie większe stężenie grup aminowych w materiale, udało się uzyskać do 0,68 μmoli tlenu azotu na mg modyfikowanej krzemionki. Wytworzone napelnicze wykorzystano do otrzymania kompozytów polimerowych, którymi pokryto wewnętrzną powierzchnię przewodów do przetaczania krwi. Na pod-

stawie zdjęć SEM powierzchni polimerowych zawierających 20 % aktywnego napelnicza, poddanych czterogodzinnemu kontaktowi z krwią królika, nie stwierdzono obecności na tej powierzchni zaadsorbowanych trombocytów. Na uwagę zasługuje fakt, że diolany diazoniowe immobilizowane na krzemionce ulegały powolnemu rozkładowi bez względu na temperaturę przechowywania.

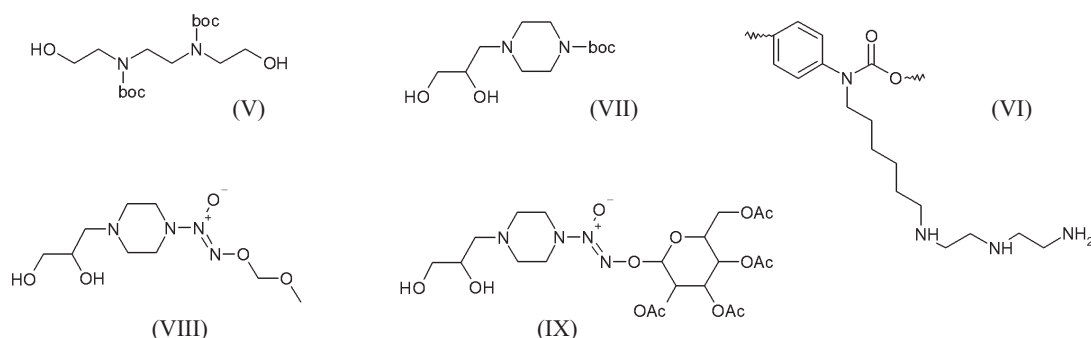
Nieco odmienną metodą otrzymywania krzemionki koloidalnej, modyfikowanej DDA, zaprezentowali Schoenfisch i współpr. (schemat F) [18]. Cząstki modyfikowanej krzemionki o rozmiarach 90–500 nm wytwarzano *in situ* z tetraetoksylanu i modyfikowanego podstawnikami DDA trimetoksylanu, w obecności alkoholu (metanol lub etanol) oraz amoniaku. Ilość NO wydzielonego z wytworzonego w taki sposób materiału była prawie trzykrotnie większa niż w przypadku poprzedniej metody i wynosiła do 1,78 μmoli na 1 mg modyfikowanej krzemionki. Czas połowicznego rozpadu tego materiału wynosił ok. 6 h. Na uwagę zasługuje bardzo równomierny rozkład wymiarów otrzymanych cząstek, co zostało potwierdzone obrazami SEM.

Kolejną grupą badanych polimerów były poliuretany, w przypadku których istnieje możliwość umieszczenia diolanów diazoniowych w łańcuchu głównym lub w postaci grup bocznych. Poliuretany otrzymywano wykorzystując dwie różne metody syntezy (schemat C: A, C).

N,N'-bis(2-hydroksyetylo)etylenodiamina z zablokowanymi grupami aminowymi [wzór (V)] posłużyła do



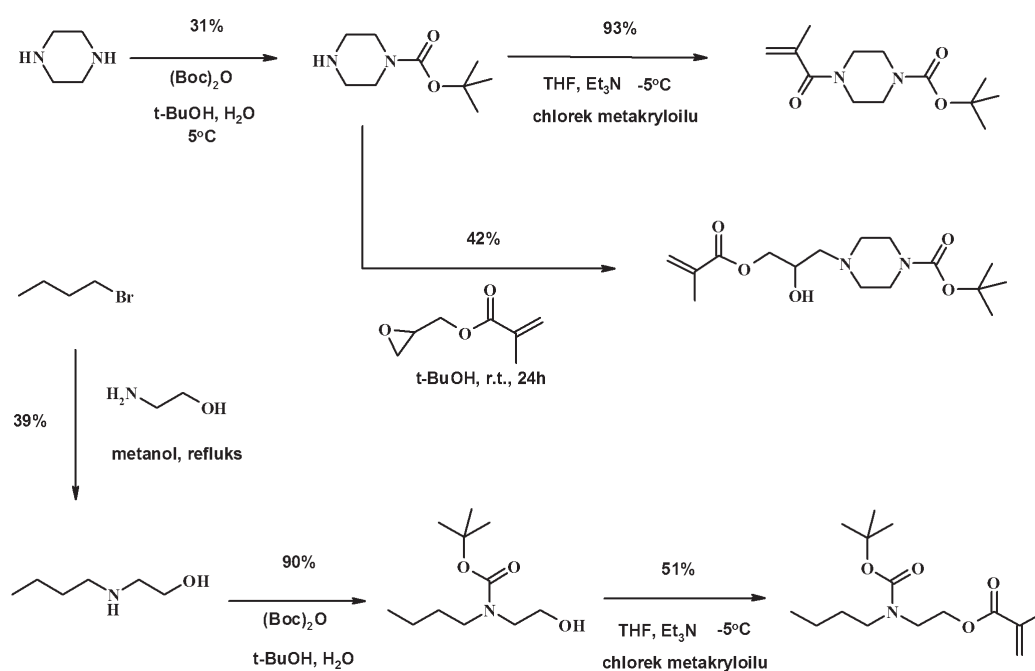
Schemat F



wytworzenia poliuretanów zawierających w łańcuchu głównym wolne grupy aminowe [19]. Tego typu polimery nie były jednak zdolne do tworzenia diolanów diazoniowych typu jonu obojnego, ze względu na bardzo małe prawdopodobieństwo odpowiedniego skonfigurowania łańcucha polimeru, zapewniającego stabilizację ładunków elektrycznych. Na podstawie pomiaru wydzielonego tlenu azotu (21 nmol/mg) stwierdzono, że tylko 0,9 % atomów azotu aminowego utworzyło ugrupowania DDA. Badane poliuretany były jednak podatne na tworzenie diolanów diazoniowych typu jonowego, które udało się uzyskać z wydajnością 41 %. W tym przypadku była konieczna optymalizacja procesu addycji, gdyż zbyt silne zasady powodowały degradację łańcuchów polimerowych. W przytoczonej publikacji opisano również modyfikację poliuretanu na bazie MDI i oligo(tlenku butylenu). Modyfikacja polegała na podstawieniu protonu uretanowego podstawnikiem alkilowym zawierającym grupy aminowe [wzór (VI)]. Tak zmodyfikowany poliuretan w kontakcie z tlenkiem azotu tworzył niewielkie ilości DDA typu jonów obojnych i był zdolny do generowania 17 nmol NO na 1 mg polimeru.

W innej pracy wspomnianej grupy badawczej [20] opisano wykorzystanie pochodnych piperazyny z grupami hydroksylowymi, umożliwiającymi wbudowanie w łańcuch poliuretanu [wzory (VII)–(IX)]. Wykorzystano dwie metody syntezy: pierwszą, bazującą na trwałych diolanach diazoniowych (schemat C: A) i drugą polegającą na blokowaniu grup aminowych (schemat C: C). Wszystkie związki (VII)–(IX) udało się wbudować w strukturę poliuretanu na bazie MDI i oligo(tlenku butylenu) z wydajnością ilościową. Podobnie, jak w przypadku modyfikowanego PVC [15], uzyskane tu diolany okazały się zbyt stabilne, uwalniały bowiem tylko ok. 0,07 % teoretycznej ilości NO po 70 dniach kontaktu z buforem fosforanowym w temp. 37 °C. Wykorzystanie monomeru (VII) również skończyło się niepowodzeniem. Po wbudowaniu w strukturę polimeru i odblokowaniu atomów azotu aminowego nie udało się wygenerować na nich ugrupowań diolanowych. Podsumowując, poliuretany powszechnie uznawane za polimery biogodne, nie sprawdziły się jako nośniki donorów tlenu azotu.

Kolejną, opisaną w literaturze grupą polimerów uwalniających tlenek azotu są polimery akrylowe [21,



Schemat G

22]. Do ich syntezy wykorzystano funkcjonalizowane monomery zawierające ugrupowania metakrylowe. Dzięki możliwości doboru odpowiednich komonomerów, w tej grupie otrzymuje się polimery o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, co rekompensuje stosunkowo skomplikowaną drogę syntezy monomerów.

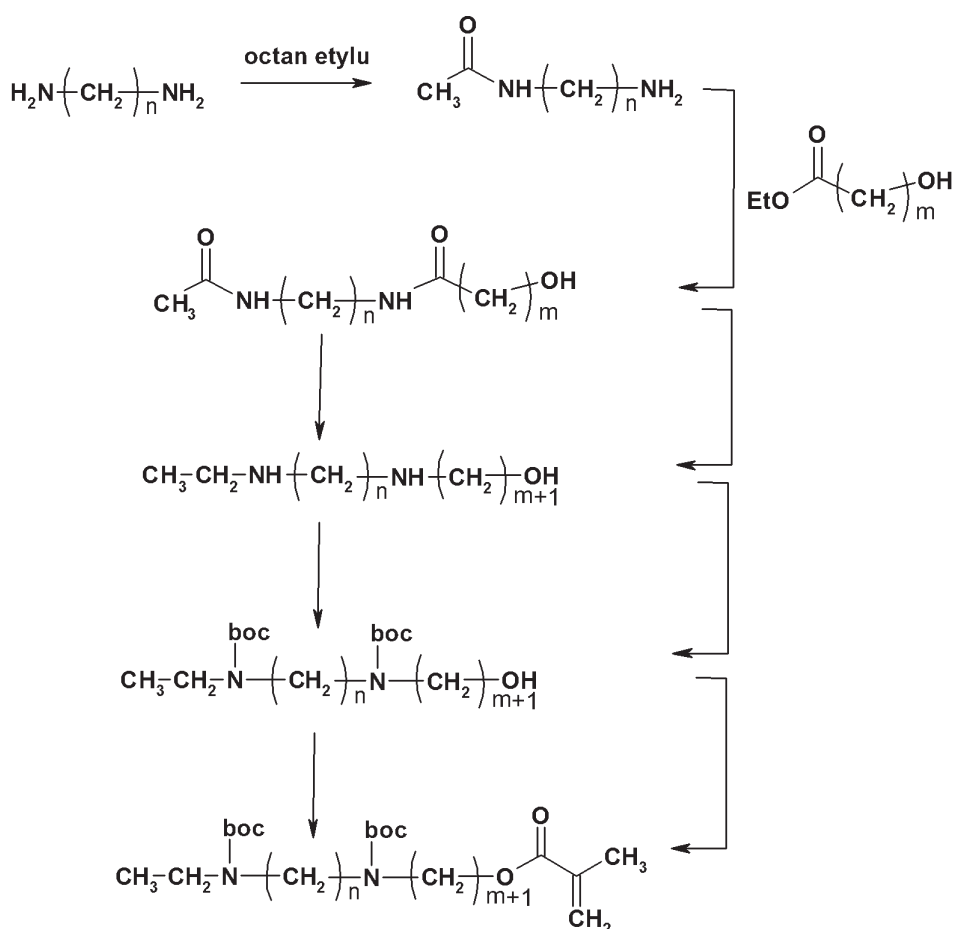
Monomery poddano homopolimeryzacji lub kopolimeryzacji z metakrylanem metylu w różnych stosunkach molowych (schemat G) [21]. Otrzymane polimery po odblokowaniu grup aminowych poddano reakcji z tlenkiem azotu w obecności metanolanu sodu. Otrzymano produkty, w przypadku których całkowita ilość wydzielonego NO wynosiła: $\leq 1,99 \mu\text{mol/mg}$ w przypadku homopolimeru i, odpowiednio, 1,31 i $0,9 \mu\text{mol/mg}$ – w przypadku kopolimerów zawierających 60 i 80 % mol. metakrylanu metylu. Omawiane monomery zastosowano również w reakcji polimeryzacji suspensyjnej wykorzystywanej do syntezy usieciowanych w niewielkim stopniu perełek o wymiarach 100–200 μm . Po spęcznieniu uzyskanego produktu w rozpuszczalniku organicznym udało się odblokować grupy aminowe i wygenerować ugrupowania DDA. Otrzymany materiał w postaci perełek użyto w charakterze wypełniacza w silikonowych warstwach atombogennych na powierzchni sen-

sorów. We wstępnych badaniach *in vivo* nie stwierdzono tworzenia się skrzepliny na powierzchni sensorów, w ciągu 16 h implantacji w krwioobiegu świni.

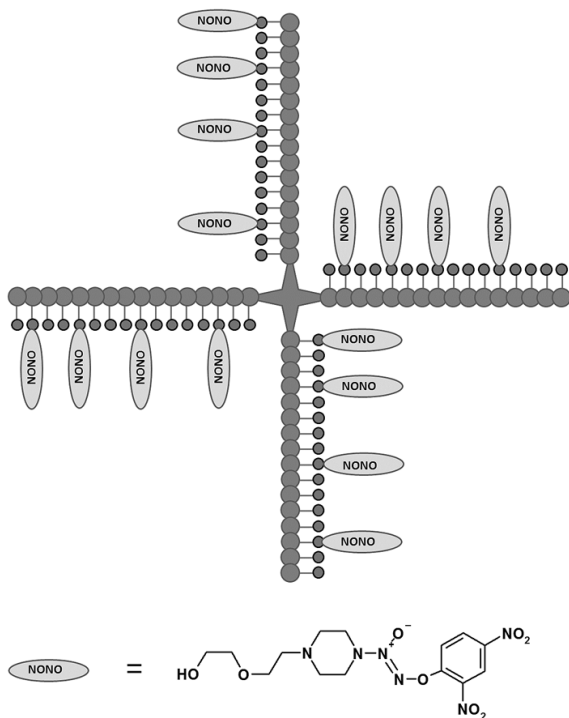
Stosując diaminy alifatyczne udało się również zsyntezować monomery akrylowe zawierające dwa drugorzędowe ugrupowania aminowe (schemat H) [22]. Uzyskane monomery użyto w reakcji polimeryzacji lub kopolimeryzacji z metakrylanem metylu, poddano reakcji usunięcia grup blokujących, a następnie reakcji z tlenkiem azotu. Podobnie jak w przypadku modyfikowanych poliuretanów, diolany diazoniowe typu jonów obojnaczych powstawały w bardzo ograniczonym zakresie. Dodatek metanolanu sodu w trakcie addycji NO pozwolił jednak na otrzymanie polimerów wydzielających do $0,94 \mu\text{mol/mg}$ tlenku azotu.

W ostatnich latach istotną badaną cechą nowych materiałów polimerowych stała się ich biodegradowalność. Pojawiły się również doniesienia dotyczące opracowywanych polimerów o budowie gwieżdzistej i silnie rozgałęzionej, w tym również polimerów uwalniających tlenek azotu.

Bardzo interesującą grupę polimerów zawierających donory tlenku azotu stanowią polimery gwieżdziste opracowane przez Forresta i współprac. [23, 24]. Otrzymano je w wyniku kontrolowanej polimeryzacji wolnorod-



Schemat H



Rys. 6. Gwiazdy poliakrylowe uwalniające tlenek azotu
Fig. 6. Polyacrylate stars releasing nitric oxide

nikowej (MADIX/RAFT) akrylanu *tert*-butyłu [24] lub pochodnej galaktozy zawierającej jeden podstawnik akrylanowy oraz zablokowane grupy hydroksylowe na rdzeniu z modyfikowanego pentaerytrytola [23]. Wytworzone polimery modyfikowano na drodze wprowadzenia grup karboksylowych, co w pierwszym przypadku zrealizowano przez hydrolizę estrów *tert*-butylowych, w drugim zaś przez odblokowanie grup hydroksylowych i reakcję z bezwodnikiem bursztynowym. Grupy karboksylowe w obu przypadkach poddano reakcji z diolanem diazoniowym, zawierającym w swojej strukturze łącznik zakończony wolną grupą OH. Ogólną budowę polimerów gwieżdzystych oraz strukturę diolanu diazoniowego przedstawiono na rys. 6.

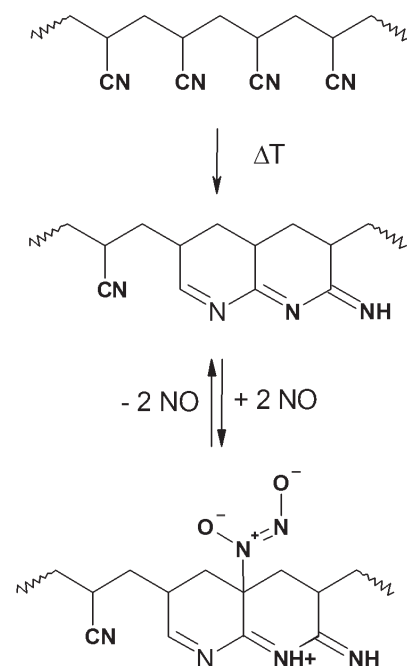
Polimery bazujące na strukturze poli(kwasu akrylowego) [24] znalazły zastosowanie w chemoterapii jako nanonośniki dwóch czynników terapeutycznych: tlenku azotu i cisplatyny. Tlenek azotu zapobiega proliferacji niektórych komórek rakowych [25–27], a cisplatylna powoduje sieciowanie nici DNA, dzięki temu uniemożliwia jego replikację i podział komórki. Podobnie, polimery gwieżdziste zawierające reszty galaktozowe [23], użyto w charakterze nanonośników w chemoterapii raka płaskonabłonkowego głowy i szyi.

Przykładem rozgałęzionych nośników tlenku azotu, znacznie mniej skomplikowanym syntetycznie niż przedstawione gwiazdy polimerowe, są hiperrozgałęzione polioksetany [28]. Syntezowano je metodą polimeryzacji kationowej, otrzymując polimer zawierający dużą liczbę grup hydroksylowych. Do dalszej modyfikacji wykorzystano metodykę zastosowaną wcześniej do

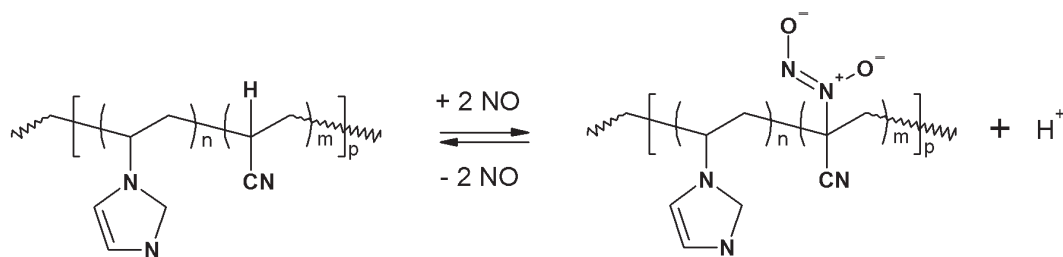
modyfikacji krzemionki koloidalnej [17], gdzie użyto trimetoksylanu z łańcuchem bocznym zawierającym wolne grupy aminowe (schemat F); po tej modyfikacji nastąpił etap addycji tlenku azotu pod ciśnieniem 0,55 MPa. Otrzymano DDA typu zwitterjonów, charakteryzujące się wydajnością uwalniania NO na poziomie 0,43 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, co stanowi wartość zbliżoną do wartości odpowiadającej materiałowi otrzymanemu w podobny sposób z krzemionki koloidalnej (0,68 $\mu\text{mol}/\text{mg}$). W przypadku omawianej pracy ilość wydzielonego NO oszacowano tylko za pomocą testu Griessa nie potwierdzając jej metodą chemiluminescencyjną.

Poliakrylonitryl (PAN) jest szeroko stosowanym polimerem włóknotwórczym. Jest używany, m.in. do produkcji włókien węglowych [29] i dużej gamy materiałów sportowych. Uważa się, że PAN nie jest polimerem zdolnym do wiązania tlenku azotu, proces, tzw. „stabilizacji” sprawia jednak, że atomy wodoru w pozycji α do grupy CN stają się bardziej kwasowe, co umożliwia przyłączenie tlenku azotu (schemat I) [30, 31]. Proces stabilizacji PAN polega na poddaniu polimeru działaniu podwyższonej temperatury, w której grupy CN reagują ze sobą wewnątrzcząsteczkowo z utworzeniem struktur cyklicznych. Częściowo powstaje wówczas polimer o strukturze drabinkowej [31]. Alternatywnie, diolany diazoniowe w pozycjach α do grupy CN, można wygenerować w PAN przy użyciu silnej zasady, takiej jak NaOSiMe₃. Uzyskany materiał jest zdolny do uwalniania ok. 15 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ tlenku azotu w ciągu 80 dni.

Aby zwiększyć kwasowość atomu wodoru w pozycji α do grupy CN, akrylonitryl poddano kopolimeryzacji z *N*-winyloimidazolem (schemat J) [32, 33]. Z otrzymanych kopolimerów, które mogły przyłączać i uwalniać tlenek azotu, wykonano wytrzymałe nici chirurgiczne. Po wy-



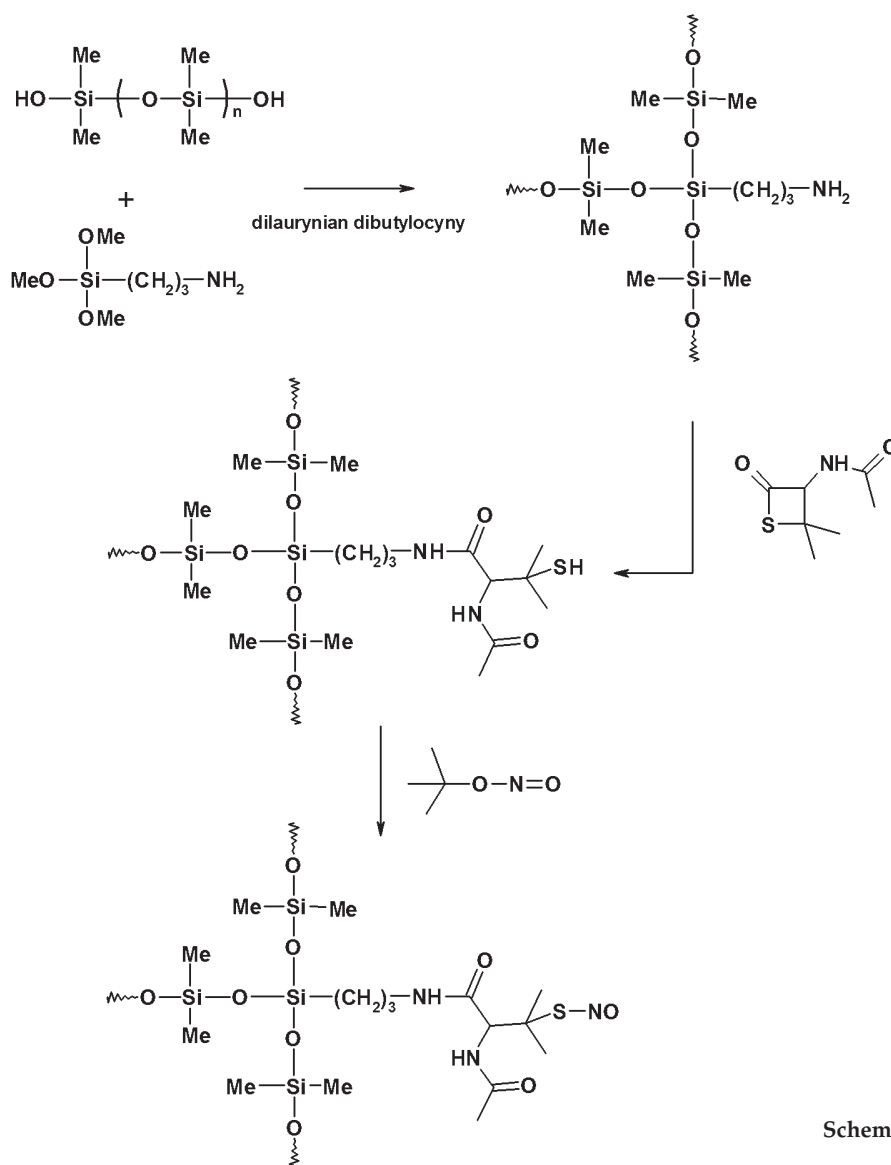
Schemat I



Schemat J

generowaniu diolanów diazoniowych na merach akrylonitrylowych materiału nici, ich właściwości mechaniczne nie ulegały pogorszeniu. Aby wydłużyć czas uwalniania NO, nici pokrywano dodatkowo cienką, biodegradowalną warstwą polikaprolaktonu. Było to konieczne w celu zapewnienia uwalniania NO podczas całego okresu gojenia rany. W ciągu 3 tygodni z włókna pokrytego warstwą polikaprolaktonu wydzielono się 84 μmol NO na gram

polimeru. Niestety, ciągle jeszcze rzetelność wyników publikowanych w czasopismach naukowych przez niektórych badaczy budzi poważne zastrzeżenia. Przykładem jest praca Ameer'a i współpracowników [34], którzy wykorzystali *N,N'*-bis(2-hydroksyetylo)etylenodiaminę w mieszaninie z 1,8-oktanodiolem w reakcji polikondensacji z trójfunkcyjnym kwasem cytrynowym, do otrzymywania biodegradowalnych elastomerów poliestrowych. Pro-



Schemat K

dukt kondensacji był następnie poddawany reakcji z tlenkiem azotu w celu wprowadzenia diolanów diazoniowych typu zwitterjonów. Autorzy nie wzięli jednak pod uwagę, że w opisanych warunkach reakcji polikondensacji, grupy aminowe w pierwszej kolejności będą reagować z resztami kwasowymi z utworzeniem soli amoniowych, a otrzymana sieć polimerowa nie będzie zawierała wolnych grup aminowych potrzebnych do wygenerowania diolanów diazoniowych. Biorąc to pod uwagę ilość uwolnionego NO wyznaczona na podstawie testu Griessa (bez weryfikacji metodą chemiluminescencyjną) budzi poważne wątpliwości.

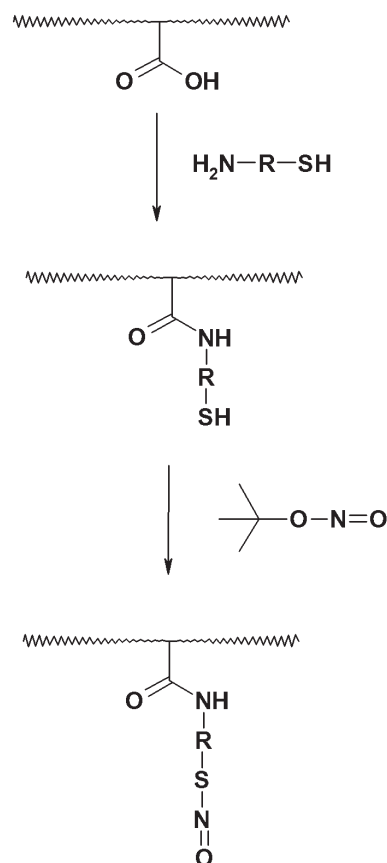
INNE RODZAJE POLIMEROWYCH DONORÓW TLENKU AZOTU

Diolany diazoniowe nie są jedynymi donorami tlenu azotu wykorzystywanymi w układach polimerowych. W ostatnim roku pojawiło się kilka prac dotyczących syntezy i zastosowań polimerów zawierających ugrupowania *S*-nitrozotiolowe [35–37].

S-nitrozotiole w układach biologicznych służą jako rezerwuary i czynniki transportujące tlenek azotu [38]. Wiązanie siarka azot *S*-NO w nitrozotiolach może ulegać rozpadowi pod wpływem kilku czynników. Należy tu wymienić procesy redox z wykorzystaniem soli miedzi, gdzie jon Cu^{2+} ulega redukcji do jonu Cu^+ , który następnie reaguje z nitrozotiolem z wydzieleniem NO [39]. W warunkach fizjologicznych czynnikami redukującymi jony Cu^{2+} mogą być askorbiniany. Askorbiniany zastosowane bezpośrednio w stężeniach powyżej 1 mM, mogą również powodować wydzielenie NO z nitrozotiolem z utworzeniem wolnego tiolu oraz dehydroaskorbinianu [40]. Trzecim czynnikiem jest promieniowanie o długości fali 330–350 lub 550–600 nm, powodujące homolityczny rozpad wiązań *S*-NO z wydzieleniem NO i utworzeniem wiązań disulfidowych [41].

Jednym z rodzajów opisanych w literaturze materiałów polimerowych zawierających podstawniki *S*-nitrozotiolowe są usieciovane żywice silikonowe, których syntezę przedstawiono na schemacie K [35]. Do usieciovania żywicy autorzy wykorzystali trimetoksysilan z grupą aminopropylową. Grupy aminowe w żywicy posłużyły następnie do otwarcia pierścienia *N*-acetylo-*D*-penicyloaminy, a azotyn *tert*-butylu – do wygenerowania grup nitrozotiolowych. Otrzymane żywice pod wpływem światła (470 nm) uwalniały tlenek azotu z wydajnością $3,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min}^1)$. Materiał przechowywany bez dostępu światła zachował stabilność przez ok. 300 dni.

Biodegradowalne donory tlenu azotu zawierające *S*-nitrozotiole próbowano również wytworzyć na bazie poliesterów alifatycznych (schemat L) [36, 37, 42]. W cytowanych pracach wykorzystywano kwas dimetylopropionowy (5 %) jako inicjator kopolimeryzacji laktydu (85 %) z glikolidem (10 %), przebiegającej według mechanizmu koordynacyjno-insercyjnego z udziałem 2-etylo-



Schemat L

heksanianu cyny(II) jako katalizatora. W wyniku polimeryzacji otrzymywano poliestry alifatyczne mające wolne grupy karboksylowe, poddawane dalszej modyfikacji na drodze reakcji z czynnikami zawierającymi jednocześnie grupy aminowe i tiolowe, a następnie reakcji z azotynem *tert*-butylu. Wytworzone materiały uwalniały tlenek azotu z wydajnością na poziomie 0,026–0,280 mmol/g. Potencjalnym zastosowaniem tego typu materiałów mogą być rusztowania tkankowe do regeneracji tkanek i kości.

W literaturze pojawiły się również doniesienia o próbach katalitycznego generowania tlenków azotu z jonów azotanowych(III) w obecności jonów miedzi [43]. Należy się spodziewać, że wkrótce zostaną opracowane układy, w których cząsteczki katalizatora są immobilizowane na matrycy polimerowej.

PODSUMOWANIE

Przedstawione w pracy modyfikacje materiałów polimerowych, w większości przypadków polegały na wprowadzeniu donorów tlenu azotu do polimerów powszechnie uznawanych za biokompatybilne, takich jak: polisiloksany, poliuretany, poliakrylany, poli(chlorek winylu). Nie wszystkie z zastosowanych polimerów nadawały się jednak na matryce polimerowe dla diolanów diazoniowych. Najmniej korzystne było użycie poliuretanów. Dużo lepsze wyniki otrzymano wykorzystując mniej polarne polimery, takie jak: polisiloksany, modyfi-

kowana krzemionka oraz polimery akrylowe, zdolne do generowania kilku μmol NO na mg materiału. Największe ilości uwalnianego tlenku azotu uzyskano w przypadku układu polimerów modyfikowanych diolanami diazoniowymi typu anionowego. Próby generowania diolanów diazoniowych typu jonów obojnych, niezależnie od rodzaju matrycy polimerowej oraz umiejscowienia ugrupowań aminowych (w łańcuchu głównym, lub w grupach bocznych), nie przyniosły zadowalających rezultatów, albowiem niektóre z opisanych układów polimerowych były zdolne do generowania tlenku azotu w ilościach tylko kilku–kilkunastu nmol/mg. Efektywny strumień NO generowany przez układy biologiczne jest jednak tak znikomo mały, że nawet takie słabe donory tlenku azotu mogą znaleźć zastosowania.

W literaturze widoczna jest tendencja do poszukiwania nowych, bardziej stabilnych i łatwiejszych w syntezie donorów tlenku azotu, których ostatnio badanym układem mogą być nitrozotiole.

LITERATURA

- [1] Saavedra J. E., Keefer L. K.: *J. Chem. Educ.* **2002**, 79, 1427.
- [2] Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S.: *Nature* **1987**, 327, 524.
- [3] Marletta M. A., Yoon P. S., Iyengar R., Leaf C. D., Wishnok J. S.: *Biochemistry* **1988**, 27, 8706.
- [4] Garthwaite J., Charles S. L., Chess-Williams R.: *Nature* **1988**, 336, 385.
- [5] www.nitricoxide.org
- [6] www.nobelprize.org
- [7] Tannenbaum S. R., Wishnok J. S., Leaf C. D.: *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, 53, 247S.
- [8] Schmidt H. H. W., Kelm M.: w „Methods in Nitric Oxide Research” (red. Feelisch M., Stamler J. S.), John Wiley, Chichester 1996, str. 491.
- [9] Batchelor M. M.: „Synthesis and characterization of nitric oxide releasing agents/polymers for biomedical applications”, rozprawa doktorska, University of Michigan, USA 2004.
- [10] Parzuchowski P. G.: Niepublikowane prace własne.
- [11] Wan A., Gao Q., Li H.: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, 20, 321.
- [12] Wu Y., Zhou Z., Meyerhoff M. E.: *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, 81A, 956.
- [13] Vaughn M. W., Kuo L., Liao J. C.: *Am. J. Physiol.* **1998**, 247, H1705.
- [14] Radomski M. W., Palmer R. M. J., Moncada S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1987**, 148, 1482.
- [15] Mowery K. A., Schoenfisch M. H., Saavedra J. E., Keefer L. K., Meyerhoff M. E.: *Biomaterials* **2000**, 21, 9.
- [16] Zhang H., Annich G. M., Miskulin J., Osterholzer K., Merz S. I., Bartlett R. H., Meyerhoff M. E.: *Biomaterials* **2002**, 23, 1485.
- [17] Zhang H., Annich G. M., Miskulin J., Stankiewicz K., Osterholzer K., Merz S. I., Bartlett R. H., Meyerhoff M. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5015.
- [18] Shin J. H., Metzger S. K., Schoenfisch M. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4612.
- [19] Reynolds M. M., Hrabie J. A., Oh B. K., Politis J. K., Citro M. L., Keefer L. K., Meyerhoff M. E.: *Biomacromolecules* **2006**, 7, 987.
- [20] Reynolds M. M., Saavedra J. E., Showalter B. M., Valdez C. A., Shanklin A. P., Oh B. K., Keefer L. K., Meyerhoff M. E.: *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 3107.
- [21] Parzuchowski P. G., Frost M. C., Meyerhoff M. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12 182.
- [22] Zhou Z., Meyerhoff M. E.: *Biomacromolecules* **2005**, 6, 780.
- [23] Duan S., Cai S., Yang Q., Forrest M. L.: *Biomaterials* **2012**, 33, 3243.
- [24] Duan S., Cai S., Xie Y., Bagby T., Ren S., Forrest M. L.: *J. Polym. Sci., Part A* **2012**, 50, 2715.
- [25] McMurtry V., Saavedra J. E., Nieves-Alicea R., Simeone A. M., Keefer L. K., Tari A. M.: *Int. J. Oncol.* **2011**, 38, 963.
- [26] Riganti C., Miraglia E., Viarisio D., Costamagna C., Pescarmona G., Ghigo D., Bosia A.: *Cancer Res.* **2005**, 65, 516.
- [27] Maciag A. E., Chakrapani H., Saavedra J. E., Morris N. L., Holland R. J., Kosak K. M., Shami P. J., Anderson L. M., Keefer L. K.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 336, 313.
- [28] Kou Y., Wan A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2337.
- [29] Farsani R. E., Raissi S., Shokuhfar A., Sedghi A.: *Proc. World Acad. Sci. Eng. Technol.* **2009**, 38, 434.
- [30] *Pat. USA* 7 968 664 (2011).
- [31] DeRosa F., Kibbe M. R., Najjar S. F., Citro M. L., Keefer L. K., Hrabie J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3786.
- [32] Lowe A., Deng W., Smith D. W., Balkus K. J.: *Macromolecules* **2012**, 45, 5894.
- [33] Deng W., Lobovsky A., Iacono S. T., Wu T., Tomar N., Budy S. M., Long T., Hoffman W. P., Smith D. W. Jr.: *Polymer* **2011**, 52, 622.
- [34] Zhao H., Serrano M. C., Popowich D. A., Kibbe M. R., Ameer G. A.: *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, 93A, 356.
- [35] Gierke G. E., Nielsen M., Frost M. C.: *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2011**, 12, 055007.
- [36] Damodaran V. B., Joslin J. M., Wold K. A., Lantvit S. M., Reynolds M. M.: *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 5990.
- [37] Wold K. A., Damodaran V. B., Suazo L. A., Bowen R. A., Reynolds M. M.: *Appl. Mater. Interfaces* **2012**, 4, 3022.
- [38] Jourd’heuil D., Hallén K., Feelisch M., Grisham M. B.: *Free Radical Biol. Med.* **2000**, 28, 409.
- [39] Dicks A. P., Swift H. R., Williams D. L. H., Butler A. R., Al-Sadoni H. H., Cox B. G. J.: *Chem. Soc. Perkin. Trans.-2* **1996**, 4, 481.
- [40] Holmes A. J., Williams D. L. H. J.: *Chem. Soc. Perkin. Trans.-2* **2000**, 8, 1639.
- [41] Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B.: *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 18 596.
- [42] Damodaran V. B., Reynolds M. M.: *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 5870.
- [43] Zhao H., Feng Y., Guo J.: *J. Appl. Pol. Sci.* **2011**, 122, 1712.