

А. М. Рубан¹, А. І. Казанець¹, Т. В. Крупська², В. В. Туров²
 КЛІНІЧНА ОФТАЛЬМОЛОГІЧНА ЛІКАРНЯ "ЦЕНТР МІКРОХІРУРГІЇ ОКА"¹, КИЇВ
 ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМЕНІ О. О. ЧУЙКА НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

МІЖФАЗНІ ВЗАЄМОДІЇ ВІТРЕОРЕТИНАЛЬНОГО СИЛІКОНУ З РОЗЧИНОМ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

Методом ¹H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням рідкої фази досліджено властивості силікону та диспергованого в ньому розчину гіалуронової кислоти. Встановлено, що, крім сигналу метильних груп силікону ($\delta_H=0$ м.ч.), в спектрах присутній слабоінтенсивний сигнал води ($\delta_H=5,5$ м.ч.), зв'язаної з полімерними молекулами. Ведення в середовище полімеру 1,5 % розчину гіалуронової кислоти полегшує процес кристалізації емульсії та погіршує її оптичну однорідність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ¹H ЯМР-спектроскопія, силікон, гіалуронова кислота, кластери води.

ВСТУП. В останні роки силіконова ендотампонада отримала широке застосування в офтальмохірургії для лікування ряду патологій, пов'язаних з розвитком ускладнень відшарування сітківки (діабетична проліферативна ретинопатія, травма ока, регматогенне відшарування сітківки) [10]. Незважаючи на високу ефективність вітреоретинальних втручань, розвиток емульсифікації силікону може призвести до цілого ряду серйозних ускладнень (вторинна глаукома, запалення, репроліферація епіретинальних мембран), здатних погіршити анатомічний і функціональний результати операцій та вимагають повторного хірургічного втручання [5, 9].

Значну частину силіконових масел для вітреоретинальної хірургії виготовляють на основі полідиметилсилоксанів з різною молекулярною масою. Вони можуть містити добавки гетерополімерів і фторполімерів, які впливають на густину силіконів та їх механічні характеристики (в'язкість, пружність та ін.) [4]. Силікони – гідрофобні речовини, які практично не змішуються з водою чи водними розчинами низькомолекулярних органічних сполук. Оскільки основною полімерною складовою склоподібного тіла є гіалуронова кислота (ГК), яка виробляється в преретинальних шарах кортикального гелю склоподібного тіла [6], в процесі ендотампонади силіконового масла здійснюється контакт гідрофобної поверхні силікону з розчином гіалуронової кислоти. Незважаючи на високу гідратованість ГК, її молекули можуть взаємодіяти з полімерними ланцюгами силіконів з утворенням вандер-

© А. М. Рубан, А. І. Казанець, Т. В. Крупська, В. В. Туров, 2012.

ваальсових комплексів, в яких молекули води витісняються із зазору між полімерними ланцюгами силікону і ГК. Крім того, можна очікувати, що розчини гіалуронової кислоти за певних умов можуть формувати емульсійні включення в силіконі, які впливають на його оптичні та механічні характеристики.

Метою даної роботи було вивчити методом низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії властивості силікону (Oxane 5700, Bausch+Lomb), який використовували тривалий час як імплантат.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. *Матеріали.* Силікон (Oxane 5700, Bausch+Lomb) було аспіровано з ока пацієнта через 6 місяців після проведеної раніше вітреоретинальної операції до скляного шприца.

Для дослідження використовували ліофілізовану ГК, яку розчиняли в дистильованій воді при кімнатній температурі.

¹H ЯМР-спектроскопія. Спектри ЯМР одержували на ЯМР-спектрометрі високого розрішення (Varian "Mercury") з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зондуєчий імпульс тривалістю 3 мкс. Температура в датчику регулювалась термоприставкою Bruker VT-1000 з точністю ± 1 град. Інтенсивності сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з використанням (при необхідності) процедури розкладу сигналу на його складові в припущенні гауссівської форми сигналу та оптимізації його нульової лінії і фази з точністю, яка для добре розділених сигналів була не меншою 5 %, а для сигналів, які перекриваються, – ± 10 %. Для запобігання переохолодженню рідини в досліджуваних об'єктах

вимірювання концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Методику ЯМР-вимірювань та визначення радіуса кластерів міжфазної води детально описано в роботах [1, 2, 8].

Для визначення геометричних розмірів кластерів адсорбованої води використовували рівняння Гіббса–Томпсона, яке зв'язує радіус сферичного чи циліндричного водного кластера (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl} T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, локалізованого в порах радіуса R ; $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об'ємного льоду; ρ – густина твердої фази; σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною; ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення. Це рівняння можна використовувати для обчислення розподілу пор за розмірами з температурної залежності концентрації незамерзаючої води (C_{uw}), одержаної на основі методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим виморожуванням води, для водних суспензій твердих тіл чи гідратованих біологічних об'єктів, коли застосування інших методів аналізу структурних характеристик утруднене [2]. Для практичного використання рівняння (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, де константа k для багатьох гетерогенних систем, які містять воду, близька до 50 К нм [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1, а наведено зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР силікону (5700 сSt) після його тривалого (6 місяців) контакту з внутрішньоочними тканинами. Сигнал протонів силікону спостерігається у вигляді одиночного сигналу з хімічним зсувом протонів $\delta_H=0$ м.ч. Така величина хімічного зсуву характерна для метильних груп у кремнієорганічних сполуках. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу зменшується, що свідчить про часткове замерзання силікону. Для сильногідрофобних полімерів при зниженні температури характерним є формування молекулярних кристалів, в яких окремі полімерні молекули зв'язані одна з одною вандерваальсовими взаємодіями. Зменшення інтенсивності сигналу метильних груп вказує на значне зниження їх рухливості (коливальної та обертальної) [3] при формуванні молекулярного кристалу силікону.

Крім сигналу метильних груп силікону, в спектрах фіксується слабоінтенсивний сигнал протонів у межах $\delta_H=5,5$ м.ч. Зі зниженням

температури його інтенсивність швидко зменшується і при $T < 270$ К перестає реєструватися в спектрах. Спектральні характеристики даного сигналу відповідають параметрам води, зв'язаної полімерними молекулами [1].

Для підтвердження можливості проникнення в середовище силікону розчину ГК у нього ввели певну кількість 1,5 % розчину ГК, після чого зразок піддавали обробці ультразвуком (4 хв, 293 К) в ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1. В результаті до 5 мас% розчину гіалуронової кислоти (відносно маси силікону) було суспендовано в силікон. При цьому оптична однорідність силікону істотно погіршувалась. Він набував матового відтінку, який зберігався протягом тривалого часу, що дозволяє зробити висновок про можливість формування в силіконі стабільної суспензії розчину ГК. Спектри емульсії ГК у силіконі наведено на рисунку 1, б, в. У спектрах в широкому діапазоні зміни температури добре спостерігалися сигнали метильних груп силікону (рис. 1, б) та води, зв'язаної з молекулами ГК (рис. 1, в). Спектральні параметри води в емульсії силікону близькі до тих, що характерні для вихідного силікону (порівнюючи рис. 1, а та 1, б). Порівняння інтенсивностей сигналу метильних груп силікону і води (до початку процесу кристалізації) дозволяє оцінити концентрацію емульсії, яка виявилась близькою до 5 % (відносно маси силікону).

За температурною залежністю концентрації незамерзаючої води ($C_{uw}(T)$) в процесі її розморожування (рис. 2, а) при використанні рівняння (1) розраховано розподіл за радіусами кластерів води, зв'язаних з молекулами ГК (рис. 2, б).

На залежностях $C_{uw}(T)$ реєструються дві ділянки, одна з яких (при $T > 265$ К) відповідає швидкій зміні концентрації незамерзаючої води у вузькому діапазоні зміни температури. Вільна енергія даного типу води незначно знижена адсорбційними взаємодіями з молекулами ГК. Відповідно до класифікації, наведеної в [1, 2, 8], така вода є слабозв'язаною (WBW). Друга ділянка залежності $C_{uw}(T)$ (при $T \leq 265$ К) відповідає ознакам сильнозв'язаної води (SBW). На основі даних рисунка 2, а можна зазначити, що $C_{SBW}=4$ мг/г, а $C_{WBW}=46$ мг/г.

Слабоасоційована вода входить до складу кластерів, радіус яких складає 6–16 нм (рис. 2, б). Для сильнозв'язаної води радіус кластерів становить 0,4–5 нм (рис. 2, б).

На рисунку 3 наведено залежності зміни температурної інтенсивності сигналу метильних груп силікону вихідного і того, який містить емульсію ГК.

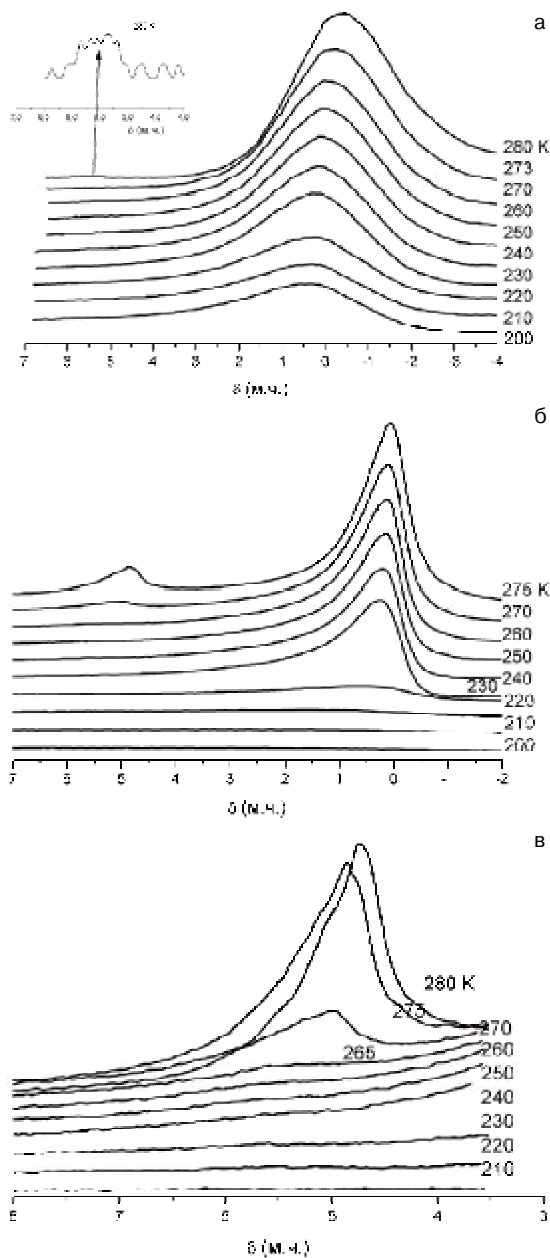


Рис. 1. Зняті при різній температурі спектри ^1H ЯМР силікону, який використовували як очний імплантат, до (а) та після УЗ-супендування, де 1,5 % розчин гіалуронової кислоти (б, в).

Як уже зазначалось вище, зменшення інтенсивності сигналу пов'язане з формуванням при низькій температурі молекулярних кристалів силікону. З даних рисунка 3 випливає, що диспергування в силіконі розчину ГК істотно полегшувало процес кристалізації. При однаковій швидкості нагрівання зразків, за присутності ГК вона здійснювалась при вищій температурі. Таким чином, формування у фазу силікону нанокрапель розчину ГК може істотно позначатися на фізико-хімічних властивостях силікону, що повинно відобразитися і на його механічних властивостях.

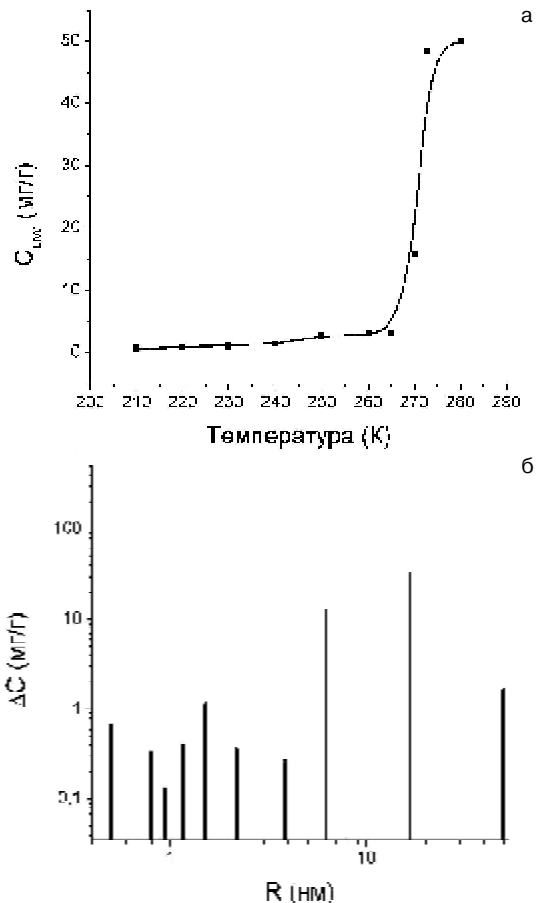


Рис. 2. Температурна залежність концентрації незамерзаючої води в емульсії 1,5 % розчину ГК у силіконі (а) та побудований на її основі розподіл за радіусами кластерів адсорбованої води (б).

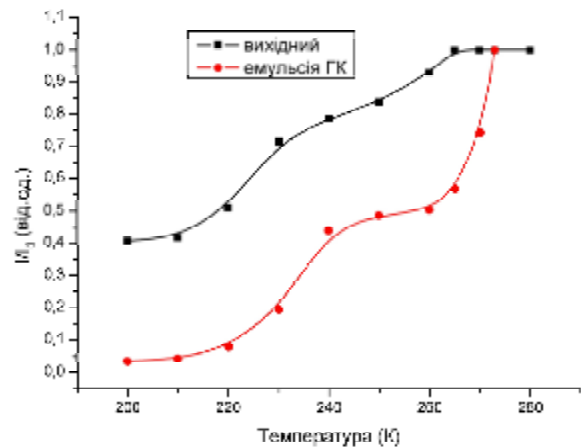


Рис. 3. Відносні зміни з температурою сигналу метильних груп вихідного силікону та силікону з диспергованим у ньому 1,5 % розчином ГК.

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено можливість формування колоїдних розчинів гіалуронової кислоти в силіконовому маслі. При цьому разом із молекулами ГК у середовище силікону переноситься певна кількість води, яка перебуває у вигляді кластерів, що зв'язані з молекулами ГК та мають радіус 0,4–16 нм.

2. Присутність у силіконовому маслі нанокрапель розчину ГК істотно впливає на процес

кристалізації рідкого силікону, що може позначатися на його фізико-хімічних та оптичних характеристиках.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гунько В. М. Вода на межфазній границі / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наукова думка, 2009. – 694 с.
2. Туров В. В. Кластеризованная вода и пути ее использования / В. В. Туров, В. М. Гунько. – К. : Наукова думка, 2011. – 313 с.
3. Emsley J. W. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy / J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe. – Oxford : Pergamon Press, 1965. – 1154 p.
4. Hardingham T. E. Proteoglycans: many forms and functions / T. E. Hardingham, A. J. Fosang // The FASEB J. – 1992. – 6. – P. 861–870.
5. Histopathological findings in eyes after silicone oil injection / B. Kirchhof, U. Tavakolian, H. Paulmann, K. Heimann // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 1986. – 224, № 1. – P. 34–37.

6. Osterlin S. The synthesis of hyaluronic acid in vitreous. I. Soluble and particulate transferases in hyalocytes / S. Osterlin, B. Jacobson // Experimental eye research. – 1968. – 7, № 4. – P. 497–510.
7. Petrov O. V. NMR cryoporometry: Principles, application and potential / O. V. Petrov, I. Furo // Progr. In NMR. – 2009. – 54. – P. 97–122.
8. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. M. Bogatyrev [et al.] // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – 118, № 1–3. – P. 125 – 172.
9. Valone J. Jr. Emulsified anterior chamber silicone oil and glaucoma / J. Jr. Valone, M. McCarthy // Ophthalmology. – 1994. – 101, № 12. – P. 1908–1912.
10. Vitrectomy with silicone oil infusion in severe diabetic retinopathy / A. Castellarin, R. Grigorian, N. Bhagat [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2003. – 87. – P. 318–321.

А. Н. Рубан¹, А. И. Казанец¹, Т. В. Крупская², В. В. Туров²
КЛИНИЧЕСКАЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА “ЦЕНТР МИКРОХИРУРГИИ ГЛАЗА”¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А. А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

МЕЖФАЗНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИТРЕОРЕТИНАЛЬНОГО СИЛИКОНА С РАСТВОРОМ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Методом ¹H ЯМР-спектроскопии с послойным вымораживанием жидкой фазы исследовано свойства силикона и диспергированного в нем раствора гиалуроновой кислоты. Установлено, что, кроме сигнала метильных групп силикона ($\delta_H=0$ м.д.), в спектрах присутствует слабоинтенсивный сигнал воды ($\delta_H=5,5$ м.д.), связанной с полимерными молекулами. Введение в среду полимера 1,5 % раствора гиалуроновой кислоты облегчает процесс кристаллизации эмульсии и ухудшает ее оптическую однородность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ¹H ЯМР-спектроскопия, силикон, гиалуроновая кислота, кластеры воды.

A. M. Ruban¹, A. I. Kazanets¹, T. V. Krupskaya², V. V. Turov²
CLINICAL EYE HOSPITAL “EYE MICROSURGERY CENTER”¹, KYIV
O. O. CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE², KYIV

INTERPHASE INTERACTION OF VITREORETINALIC SILICONE WITH A SOLUTION OF HYALURONIC ACID

Summary

The properties of silicone and dispersion in silicone of hyaluronic acid (HA) solution was study by ¹H NMR spectroscopy method with layer by layer freezing out of liquid phase. Its shown that beside the signal of methyl groups of silicone ($\delta_H=0$ ppm.) in the spectra presents less intensive signal of water ($\delta_H=5,5$ ppm), bonded with HA molecules. With the introduction insilicone medium of 1,5 % HA solution the process of crystallization of the silicone is worsened and its optical homogeneity is deteriorated.

KEY WORDS: ¹H NMR-spectroscopy, silicone, hyaluronic acid, water clusters.

Отримано 22.05.12

Адреса для листування: Т. В. Крупська, вул. Генерала Наумова, 17, Київ-164, 03164, Україна.