

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.08.043>

УДК 621.762

Н.В. Бошицька, Л.С. Проценко,

О.М. Будиліна, Н.В. Каплуненко, І.В. Уварова

Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України, Київ

E-mail: nata25lia@gmail.com

Порівняльна фізико-хімічна стабільність композиційних систем гідроксіапатит/поліетиленгліколь 400 та 6000 у біологічних середовищах

Представлено членом-кореспондентом НАН України О.М. Григор'євим

Досліджено взаємодію композиційних систем на основі гідроксіапатиту і поліетиленгліколю (ГАП + ПЕГ) молекулярної маси (400 та 6000) з фізіологічними розчинами NaCl, Рінгера та Рінгера—Локка. Методами хімічного аналізу доведено, що композиційна система ГАП+ПЕГ 400 вступає у взаємодію з біологічними середовищами, даючи можливість кальцію поступово вивільнятися з матеріалу. Порошкова система ГАП + ПЕГ 6000 у фізіологічних розчинах залишається хімічно стабільною. Методом ІЧ-спектроскопії доведено, що на спектрограмах поверхні зразка ГАП + ПЕГ 400 після взаємодії з фізіологічними розчинами протягом 100 год присутні валентні коливання в діапазонах, що відповідають наявності ПЕГ. Можна припустити, що довготривала наявність ПЕГ в системі з біологічними середовищами сприятиме відновленню нервових імпульсів при кісткових дефектах. Показано, що композиційна система ГАП + ПЕГ 400 перспективна для подальшого дослідження з метою розробки матеріалів ортопедичного призначення.

Ключові слова: *гідроксіапатит, поліетиленгліколь, фізіологічні розчини, хімічна стабільність, поверхня.*

Поліетиленгліколь (продукт полімеризації оксиду етилену з етиленгліколем, далі — ПЕГ) поділяється на низькомолекулярний (ПЕГ 200, 300, 400, 600, 800 і 1000 [1]) та високомолекулярний (ПЕГ 1500, 2000, 4000, 6000 та 8000 [2, 3]). ПЕГ мають цілу низку позитивних властивостей: низьку токсичність; відсутність помітної побічної дії на організм; розчинність у воді та інших полярних розчинниках; стійкість до дії світла, температури і вологи; малу чутливість до зміни рН (при введенні до їх складу електролітів); стійкість до мікробної контамінації за рахунок гідроксильних груп, які послаблюють бактерицидну дію.

Виявляють ПЕГ ще й виразну осмотичну активність, а це зумовлює їх широке застосування у виробництві гелів для лікування інфікованих ран, де вони забезпечують як осмотичну, так і дегідратаційну дію — що, у свою чергу, прискорює терміни загоєння рани. Ці виняткові властивості ПЕГ пояснюються спіралеподібною конфігурацією молекул, яка зберігається і при його розчиненні [4]. У цілому лікувальні препарати (ЛП), що містять

ПЕГ, мають високу ефективність, і особливо при ексудативних дерматозах, для лікування яких не можуть бути використані ліки на жирових і вуглеводневих носіях.

Так, ПЕГ-гелі добре розчиняють велику кількість лікувальних речовин і легко їх вивільняють, забезпечуючи гарний контакт зі шкірою чи рановою поверхнею тканини, а це, у свою чергу, значно підвищує їхню абсорбцію та активність. Також, на відміну від мазей на гідрофобних основах, вони забезпечують надходження лікувальних речовин до усіх проблемних ділянок зі скупченнями мікрофлори і знижують стійкість цих останніх до антисептиків. Крім того, дисперсні системи у вигляді ПЕГ-гелів легко змиваються, можуть зберігатися тривалий час та не гіркнуть. Завдяки вищезазначеним властивостям ПЕГ входять до рецептур багатьох ЛП, не лише поліпшуючи технологічні характеристики та підвищуючи ефективність цих останніх, а й маючи власну лікувальну ефективність. Причому є всі підстави вважати, що на сьогодні у виробництві найрізноманітніших ЛП використано далеко не всі потенційні можливості ПЕГ [5, 6].

У зв'язку з вищенаведеним слід нагадати, що, як відомо, травма спинного мозку належить до найтяжчих захворювань нервової системи і далеко не у всіх випадках піддається хірургічному та медикаментозному лікуванню [7]. Водночас, дослідники з Університету Пердью (англ. *Purdue University*, м. Уест-Лафайєт, штат Індіана, США) переконані, що зцілення від цієї хвороби можливе завдяки найновішим досягненням нанотехнологій. Зокрема, на сьогодні вже синтезовано колоїдний розчин покритих ПЕГ наночастинок оксиду кремнію [8, 9] і показано, що при їх використанні, наприклад, при травмах спинного мозку щурів відновлення нейросигналу спостерігається вже через 15–20 хв. після відповідної ін'єкції [10]. Загалом ПЕГ вже понад 30 років вивчається та використовується як речовина, що стимулює злиття кліткових мембран, а його безпечність для організму було досліджено у чималій кількості робіт, проте для відновлення пошкодженого спинного мозку з використанням колоїдного розчину наночастинок він був застосований уперше.

Мета цієї роботи – розробка композиційної системи на основі гідроксиапатиту і поліетиленгліколю (далі – ГАП+ПЕГ) різної молекулярної маси (400 та 6000) з необхідною для медичного застосування фізико-хімічною стабільністю у біологічних середовищах живого організму.

Матеріали та методи дослідження. У роботі використовували порошок ГАП, синтезованого з використанням “мокрого” хімічного методу шляхом осадження зі змішаних водних розчинів $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ із додаванням розчину NH_4OH і дотриманням умови, що рН = 9,5.

Аналіз поверхонь порошків та компактних зразків на їхній основі проводили методом ІЧ-спектроскопії – одним із методів оптичного спектрального аналізу, що базується на здатності речовини вибірково взаємодіяти з електромагнітним випромінюванням – із поглинанням енергії в ІЧ ділянці спектра, яка є його довгохвильовою частиною (з довжинами хвиль 0,75–1000 мкм) і має ближню (0,75–2,5 мкм), середню (2,5–50 мкм) і дальню (50–1000 мкм) області [11].

Рентгеноструктурні дослідження фазового складу синтезованого ГАП-порошку проводили з використанням рентгенівського дифрактометра “ДРОН-3,0” в $\text{Co K}\alpha$ -випромінюванні. Фазовий склад визначали шляхом порівняння міжплощинних відстаней, розрахованих за експериментально записаними дифрактограмами (із наведеними в інтернаціональних та-

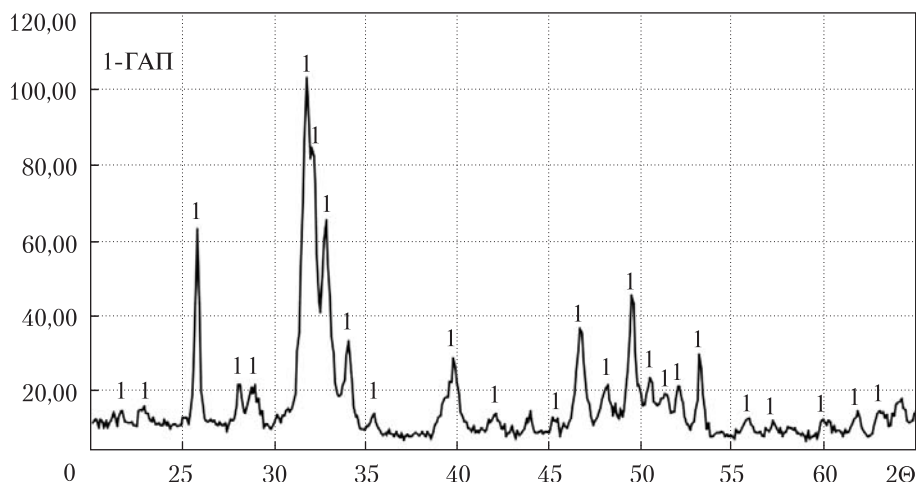


Рис. 1. Дифрактограма синтезованого порошку ГАП: 1 – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$

блицях дифракційними даними). Кількість знайдених фаз визначали за співвідношеннями найінтенсивніших ліній цих фаз на дифрактограмах [12].

У роботі використовували ПЕГ 400 фірми “БАРВА-ФРАМ” (ТУ У 24.1-25066661-002: 2008) та ПЕГ 6000 тієї самої фірми (ТУ 2483-008-71150986-2006).

Композиційні системи ГАП+ПЕГ отримували шляхом додавання наважок ПЕГ 400 або ПЕГ 6000 до 96 %-го медичного спирту. В отриманий розчин вносили наважку ГАП, постійно помішуючи, щоб забезпечити рівномірний розподіл ГАП-порошку. Після випаровування спирту одержували композиційні системи ГАП + 10 % ПЕГ 400 та ГАП + 10 % ПЕГ 6000.

В якості біологічних середовищ використовували:

0,9%-й розчин NaCl: 9 г/л NaCl, рН = 6,7;

розчин Рінгера (г/л): NaCl – 8,6; KCl – 0,3; CaCl_2 – 0,33;

розчин Рінгера–Локка (г/л): натрію хлориду – 9,0; натрію гідрокарбонату – 0,2; кальцію хлориду – 0,2; калію хлориду – 0,2; глюкози – 5 %.

Оскільки досліджувані середовища близькі за своїм хімічним складом до тканинної рідини та застосовуються в медичній практиці для внутрішньовенного введення, це дає нам право ввести до них термін “біологічні середовища живого організму”.

В якості неорганічного середовища використовували дистильовану воду. Кальцій у фільтратах біологічних середовищ визначали трилонометричним методом [13].

Наважки порошоків ГАП+ПЕГ витримували в біологічних середовищах протягом 100 год і визначали зміну маси наважки та кількість кальцію в фільтраті біологічних середовищ до і після взаємодії.

Результати досліджень та їх обговорення. На рис. 1 наведено рентгенограму порошку ГАП, основною фазою якого є $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$.

Методом седиментаційного аналізу визначено, що розмір частинок синтезованого порошку знаходиться у діапазоні значень 30–40 мкм.

В таблиці наведено дані щодо взаємодії систем ГАП + ПЕГ 400 із розчином Рінгера та водою.

Для композиційної системи ГАП + ПЕГ 6000 ніяких змін маси наважки після взаємодії як із водою, так і з розчином Рінгера не відбувалося, а кількість кальцію в фільтратах

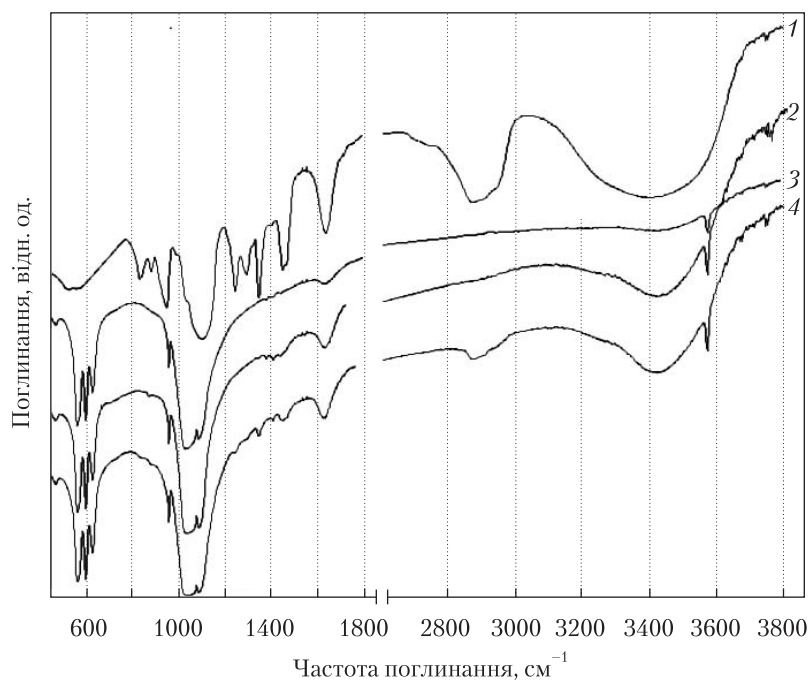


Рис. 2. Інфрачервоні спектри композиційної системи ГАП +10 % ПЕГ 400: 1 – ПЕГ 400; 2 – ГАП; 3 – ГАП+10 % ПЕГ 400; 4 – ГАП+10 % ПЕГ 400 після взаємодії з фізіологічним розчином

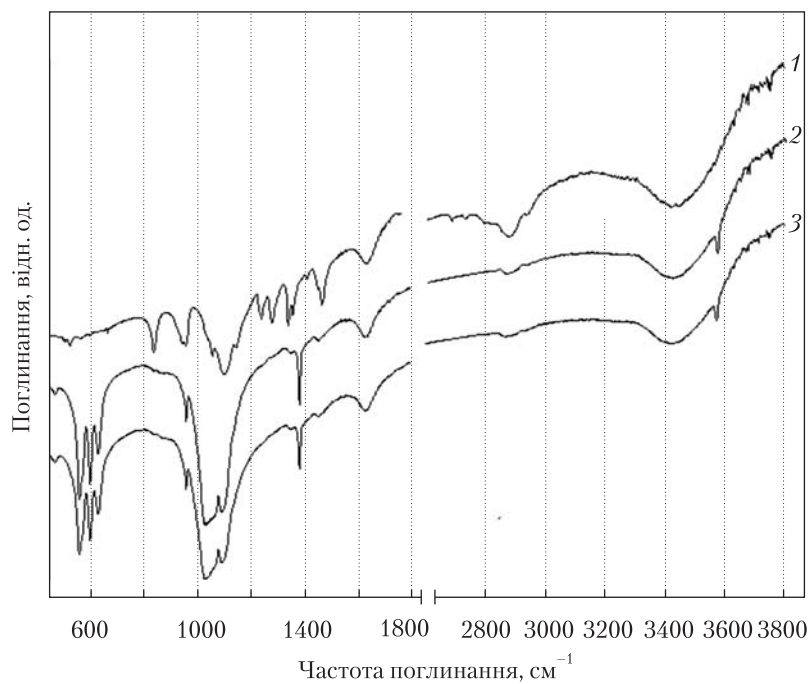


Рис. 3. Інфрачервоні спектри композиційної системи ГАП та 10 % ПЕГ 6000: 1 – ПЕГ 6000; 2 – ГАП+10 % ПЕГ 6000; 3 – ГАП+10 % ПЕГ 6000 після взаємодії з фізіологічним розчином

біологічних середовищ становила 0 мг/100 мл (із поправкою на кількість кальцію у вихідних розчинах). Ці дані свідчать про те, що високомолекулярний ПЕГ 6000 покриває порошок гідроксіапатиту досить щільним шаром, перешкоджаючи взаємодії Са з тканинною рідиною.

При взаємодії системи ГАП + ПЕГ 400 із водою та розчином Рінгера маса наважки зменшується більше для розчину Рінгера — у ~2 рази (див. таблицю). Кількість кальцію у фільтраті біологічних середовищ після 100 год взаємодії становить ~0,043 мг/100 мл для води та ~0,098 мг/100 мл для розчину Рінгера, і така присутність кальцію у фільтратах фізіологічних розчинів після взаємодії з композиційною системою ГАП + ПЕГ 400 свідчить про те, що низькомолекулярний ПЕГ вкриває поверхню ГАП не щільно, що дає змогу гідроксиапатиту вступати у реакції з біологічними середовищами. Цей процес сприятиме відновленню кальцієвого обміну між композиційним матеріалом, кістковою тканиною та тканинною рідиною, а це є визначальним у замісній терапії кісткових дефектів і захворювань нервової системи.

З метою більш детального дослідження поверхневого стану композиційної системи ГАП + ПЕГ із молекулярними масами 400 та 6000 використано метод ІЧ-спектроскопії (рис. 2 та 3). Для більшої інформативності дані для ГАП + ПЕГ із різними молекулярними масами наведено в тих діапазонах, які є найвиразнішими саме для кожної з цих систем. Показано, що утворена композиційна система характеризується частотами $\nu = -875, -1414, -1506, -1539$ та -1558 , що притаманні смугам поглинання ПЕГ 400 — крива 1 на рис. 2 та ПЕГ 6000 — крива 1 на рис.3. Також методом ІЧ-спектроскопії показано, що після взаємодії з фізіологічними розчинами композиційної системи ГАП + ПЕГ із молекулярними масами 400 та 6000 практично ніяких змін ІЧ спектрів не спостерігається (криві 3, 4 на рис. 2 та 3).

Наявність ПЕГ у композиційній системі ГАП + ПЕГ (як 400, так і 6000) після взаємодії з фізіологічними розчинами протягом 100 год свідчить про те, що отримана система є достатньо стабільною, а, отже, наявність ПЕГ у ГАП-порошку сприятиме відновленню нервових імпульсів у тканинах при кісткових пошкодженнях.

Отримані дані свідчать про те, що композиційна система ГАП/ПЕГ400 досить активно вступає у взаємодію з розчином Рінгера. При цьому наявність кальцію у фільтратах дозволяє припустити, що поверхня порошку ГАП не щільно вкрита ПЕГ 400, який, ймовірно, частково розчиняється в біологічних середовищах.

Таким чином, встановлено, що розроблені порошкові системи ГАП + ПЕГ 400 та 6000 мають різну хімічну стабільність у біологічних середовищах живого організму, виходячи зі щільності покриття частинок порошку високомолекулярним ПЕГ 6000 або ж низькомолекулярним ПЕГ 400.

Методами хімічного аналізу доведено, що композиційна система ГАП + ПЕГ 400 вступає у взаємодію з біологічними середовищами, даючи можливість кальцію поступово вивільнятися з матеріалу.

Показано, що порошок ГАП+ПЕГ 6000 у фізіологічних розчинах залишається хімічно стабільною системою

Зміни маси наважок системи ГАП + ПЕГ 400 після взаємодії з водою та розчином Рінгера

Біологічні середовища	Маса наважки вихідна	Маса наважки після взаємодії	Різниця
H ₂ O	0,5033	0,4218	0,0815
Розчин Рінгера	0,5038	0,3400	0,1638

і не вивільняє кальцій, а це, в свою чергу, може перешкоджати хімічному обміну між досліджуваним матеріалом та біологічними середовищами живого організму.

Методом ІЧ-спектроскопії доведено, що на спектрограмах поверхні зразка ГАП + ПЕГ 400 після взаємодії з фізіологічними розчинами протягом 100 год присутні валентні коливання в діапазонах, що відповідають наявності ПЕГ. Можна припустити, що довготривала наявність ПЕГ в системі з біологічними середовищами сприятиме відновленню нервових імпульсів при кісткових дефектах.

Показано, що саме композиційна система ГАП + ПЕГ 400 є перспективною з погляду її подальшого використання при розробці широкого спектра різнофункціональних матеріалів ортопедичного призначення.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Delgado C., Francis G., Fisher D. The Uses and Properties of PEG-Linked Proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1992. **9** (3/4). P. 249–304.
2. Bruce A. Clinical Considerations in Pegylated Protein Therapy. From Research to Practice. 2001. **3** (1). P. 3–9.
3. Batiza R., White J.D.L. Submarine Lavas and Hyaloclastite. *Encyclopedia of Volcanoes*; 1417 p. Ed. H. Sigurdsson. New York: Academic Press, 1999. 363 p.
4. Garratty G. Modulating the Red Cell Membrane to Produce Universal/Stealth Donor Red Cells Suitable for Transfusion. *Vox Sanguinis*. 2008. **94**, №. 2. P. 87–95.
5. Перців І.М., Даценко Б.М., Гунько В.Г. Розробка лікарських препаратів багатонаправленої дії на гнійно-запальний процес: обґрунтування складу, виробництво, клінічний досвід та застосування. *Фармац. журн.* 1991. № 3. С. 5; 56–61; 65–68.
6. Jaiswal J., Gupta S.K., Kreuter J. Preparation of Biodegradable Cyclosporine Nanoparticles by High-Pressure Emulsion-Solvent Evaporation Process. *J. Control. Release*. 2004. №. 96. P. 169–178.
7. Bittner G.D. et al. Rapid, Effective, and Long-Lasting Behavioral Recovery Produced by Microsutures, Methylene Blue, and Polyethylene Glycol after Completely Cutting Rat Sciatic Nerves. *J. Neuroscience Research*. 2012. **90** (5). P. 967–980 [Ел. ресурс. Режим доступу: doi:10.1002/jnr.23023].
8. Bittner G. et al. Melatonin Enhances the in vitro and in vivo Repair of Severed Rat Sciatic Axons. *Neuroscience Lett*. 2005. **376** (2). P. 98–101.
9. Britt J.M., Kane J.R., Spaeth C.S. et al. Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury. *J. Neurophysiology*. 2010. **104** (2). P. 695–703.
10. Sexton K.W., Pollins A.C., Cardwell N.L. et al. Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury. *J. Surgical Research*. 2012. **177** (2). С. 392–400.
11. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. Москва: Высш. шк., 1987. 367 с.
12. Лиопо В.А., Гимпель Н.Н., Васильев Е.К. Рентгеновский фазовый анализ с использованием базы данных. Применение рентгеновских лучей в науке и технике. Иркутск. гос. ун-тет, 1995. С. 125–131.
13. Крылов А.А., Кац А.М. и др. Руководство для клинико-диагностических лабораторий. Ленинград: Медицина, 1981. 212 с.

Надійшло до редакції 23.03.2017

REFERENCES

1. Delgado, C., Francis, G. & Fisher, D. (1992). The Uses and Properties of PEG-Linked Proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 9 (3/4), pp. 249-304.
2. Bruce, A. (2001). Clinical considerations in pegylated protein therapy. *From Research to Practice*, 3 (1), pp. 3-9.

3. Batiza, R. & White, J. D. L. (1999). Submarine Lavas and Hyaloclastite. Encyclopedia of Volcanoes; 1417 p. Ed. H. Sigurdsson. New York: Academic Press.
4. Garratty, G. (2008). Modulating the Red Cell Membrane to Produce Universal/Stealth Donor Red Cells Suitable for Transfusion. Vox Sanguinis, 94, No. 2, pp. 87-95.
5. Pertsiv, I.M, Datsenko, B. M, Gunko, V. Y. (1991). Development of drugs multidirectional action on purulent inflammation: study of manufacturing, clinical experience and application. Pha. Zh., No. 3, pp. 5; 56-61; 65-68 (in Ukrainian).
6. Jaiswal, J., Gupta, S. K. & Kreuter, J. (2004). Preparation of Biodegradable Cyclosporine Nanoparticles by High-Pressure Emulsion-Solvent Evaporation Process. J. Control. Release, No. 96, pp. 169-178.
7. Bittner, G. D. et al. (2012). Rapid, Effective, and Long-Lasting Behavioral Recovery Produced by Microsutures, Methylene Blue, and Polyethylene Glycol after Completely Cutting Rat Sciatic Nerves. J. Neuroscience Research, 90 (5), pp. 967-980.
8. Bittner, G. D. et al. (2005). Melatonin Enhances the in vitro and in vivo Repair of Severed Rat Sciatic Axons. Neuroscience Letters, 376 (2), pp. 98-101.
9. Britt, J. M., Kane, J. R., Spaeth, C. S. et al. (2010). Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury. J. Neurophysiology, 104 (2), pp. 695-703.
10. Sexton, K. W., Pollins, A. C., Cardwell, N. L. et al. (2012). Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury. J. Surgical Research, 177 (2), pp. 392-400.
11. Pentin, Yu. A. & Vilkov, L. (1987). Physical methods of research in chemistry. Moscow: Higher School (in Russian).
12. Liopo, V. A., Himpel, N. N. & Vasylyev, Ye. K. (1995). X-ray phase analysis using a database. X-ray application in science and technology. Irkutsk. State. Univ., pp. 125-131 (in Russian).
13. Krylov, A. A, Kats, A. M and others. (1981). Manual for clinical diagnostic laboratories. Leningrad: Medicine (in Russian).

Received 23.03.2017

*Н.В. Бошицкая, Л.С. Проценко,
О.Н. Будилина, Н.В. Каплушенко, И.В. Уварова*

Институт проблем материаловедения им. И.Н. Францевича НАН Украины, Киев
E-mail: nata25lia@gmail.com

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ КОМПОЗИЦИОННЫХ СИСТЕМ ГИДРОКСИАПАТИТ/ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ 400 И 6000 В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Исследовано взаимодействие композиционных систем на основе гидроксиапатита и полиэтиленгликоля (ГАП+ПЭГ) молекулярной массы (400 и 6000) с физрастворами NaCl, Рингера и Рингера—Локка. Методами химического анализа доказано, что композиционная система ГАП + ПЭГ 400 вступает во взаимодействие с биологическими средами, давая возможность кальцию постепенно высвобождаться из материала. Порошковая система ГАП + ПЭГ 6000 в физрастворах остается химически стабильной. Методом инфракрасной спектроскопии доказано, что на спектрограммах поверхности образца ГАП + ПЭГ 400 после взаимодействия с физрастворами в течение 100 ч присутствуют валентные колебания в диапазоне, которые отвечают наличию ПЭГ. Можно допустить, что долговременное наличие ПЭГ в системе с биологическими средами будет способствовать восстановлению нервных импульсов при костных дефектах. Показано, что композиционная система ГАП + ПЭГ 400 является перспективной для дальнейшего исследования с целью разработки материалов ортопедического назначения.

Ключевые слова: гидроксиапатит, полиэтиленгликоль, физиологические растворы, химическая стабильность, поверхность.

*N.V. Boshytska, L.S. Protsenko,
O.N. Budilina, N.V. Kaplunenko, I.V. Uvarova*

Frantsevich Institute for Problems of Material Sciences of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: nata25lia@gmail.com

COMPARATIVE PHYSICAL CHEMICAL STABILITY
OF COMPOSITION SYSTEMS OF HYDROXYAPATITE/
POLYETHYLENEGLYCOL 400 AND 6000 IN BIOLOGICAL MEDIA

Interaction of composite systems on the bases of hydroxyapatite and polyethylene glycol (HAP + PEG) with molecular weights of 400 and 6000 with physiological Ringer and Ringer-Locke solution of NaCl has been investigated. By the methods of chemical analysis, it is established that the HAP + PEG 400 composite system interacts with biological media liberating calcium from a material step-by-step. The powder HAP + PEG 6000 system remains chemically stable during 100 h. By IR-spectroscopy, it is demonstrated that the spectrogram of surfaces of HAP + PEG 400 and HAP + PEG 6000 samples after the interaction with physiological solutions during 100 h contains valence vibrations in a range corresponding to the PEG presence. It can be supposed that the chemical activity of HAP + PEG 400 material relative to calcium and the prolonged presence of polyethylene glycol in the biological media help a reduction in both mineral metabolism and nervous impulses at bone defects. It is shown that the composite HAP + PEG 400 system is promising for the future development of materials for orthopedic applications.

Keywords: *hydroxyapatite, polyethylene glycol, physiological solution, chemical stability, surface.*