

А. Н. Рубан, А. И. Казанец, Т. В. Крупская, В. В. Туров

Эмульсии полидиметилсилоксанов в концентрированных растворах САЧ, желатина и гиалуроновой кислоты

(Представлено академиком НАН Украины Н. Т. Картелем)

Методом низкотемпературной ^1H ЯМР спектроскопии и фазово-контрастной микроскопии изучено влияние биополимерных сред на состояние микрокапель силикона и дисперсного силикона на гидратные свойства биополимерных молекул. Обнаружен эффект повышения температуры размерзания микрокапель силикона, максимальная величина которого (до 50°) зарегистрирована в случае диспергирования ПДМС-5700 в 10% растворе САЧ. Показано, что под влиянием дисперсной фазы силиконов величина межфазной энергии границы раздела фаз биополимер — вода может изменяться в 2–3 раза, что свидетельствует о конформационной перестройке биополимеров.

Силиконовые масла (полидиметилсилоксаны) широко используются в качестве имплантов, в том числе и в витреоретинальной хирургии [1, 2]. Благодаря произвольному движению мышц на границе раздела имплант — ткань возможно взаимное проникновение силикона и водных сред биополимеров путем формирования эмульсий вода — масло и масло — вода, что может приводить к изменению оптических и механических свойств импланта, а проникновение силикона в биополимерные растворы — вызывать вынос силикона из зоны имплантации и сопровождаться воспалительными реакциями.

Если размер капель дисперсной фазы превышает 100 нм, их можно наблюдать путем использования фазово-контрастной микроскопии. При меньшем размере частиц более надежным способом их регистрации служат методы ЯМР-криометрии и низкотемпературной ЯМР спектроскопии [3–5]. С их помощью не только могут быть измерены размеры нанодисперсных частиц силиконов в водных системах (и наоборот), но и определены характеристики межфазных слоев воды на границах частиц с биополимерами.

Целью настоящей работы было изучение строения эмульсий двух типов силиконов, различающихся по плотности и вязкостным характеристикам при их диспергировании в концентрированных растворах биополимеров — гиалуроновой кислоты (ГК), сывороточного альбумина человека (САЧ) и желатина (Жел.).

Методика исследований. В качестве исходных материалов исследовали ПДМС-1000 и ПДМС-5700 (Oxane 1000, Bausch&Lomb, США). Использовались 10%-е водные растворы САЧ, ГК и Жел., которые служат хорошими объектами для моделирования составляющих сред разных отделов глаза. Эмульсификация осуществлялась в стеклянных бюксах объемом 10 мл, куда помещался водный раствор соответствующего биополимера объемом 1 мл и ПДМС. Полученную смесь подвергали ультразвуковой обработке (УЗДН-1, 5–7 мин, 293 К). Образовавшиеся эмульсии выдерживали 1–2 сут при комнатной температуре. Эмульсии ПДМС в растворах САЧ и ГК оставались стабильными, тогда как в Жел. — расслаивались на водную и силиконовую фазы. Однако некоторая часть силикона все же

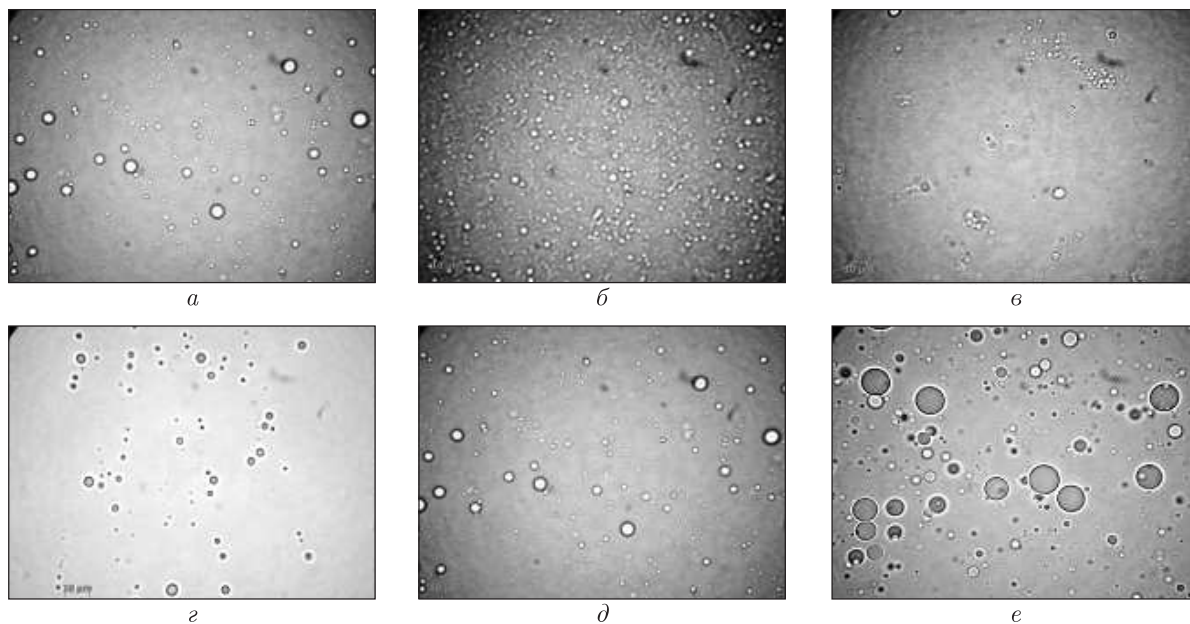


Рис. 1. Микрофотографии эмульсий полидиметилсилоксанов в концентрированных водных растворах биополимеров: 3% ПДМС-1000: *a* – 10% ГК, *б* – 10% САЧ, *в* – 10% желатин; 3% ПДМС-5700: *z* – 10% ГК, *д* – 10% САЧ, *е* – 10% желатин

оставалась в среде желатина. При этом концентрацию ПДМС определяли по соотношению интенсивностей сигналов метильных групп силикона и воды в спектрах ^1H ЯМР.

Спектры ЯМР получали на ЯМР спектрометре высокого разрешения (Varian “Mercury”) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали 90° зондирующий импульс длительностью 3 мкс. Температура в датчике регулировалась термоприставкой “Bruker VT-1000” с точностью ± 1 град. Интенсивности сигналов определяли путем измерения площади пиков с использованием (при необходимости) процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации его нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5%, а для перекрывающихся сигналов – $\pm 10\%$. Для предотвращения переохлаждения жидкостей в исследуемых объектах, измерения концентрации проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры 210 К. Методика ЯМР-измерений подробно описана в научных публикациях [3–6].

Микрофотографирование эмульсий осуществляли с помощью микроскопа “Primo Star” (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 1000 с использованием иммерсии.

Результаты и их обсуждение. В гелях САЧ и ГК (рис. 1) размер капель составляет 0,5–5 мкм. В желатине наблюдаются отдельные микрокапли (ПДМС-1000) либо система микрокапель, которые достаточно быстро увеличиваются в размерах, а затем выделяются в виде отдельной фазы.

На примере эмульсии ПДМС-1000 в растворе ГК (*a*, *б* на рис. 2) показан характер изменения сигналов воды и метильных групп ПДМС в широком диапазоне изменения температур, снятых при разной чувствительности ЯМР-спектрометра. Аналогичные результаты получены и для других эмульсий, поэтому на рис. 2 (*б–ж*) показаны только те спектральные особенности, которые регистрируются для разных типов эмульсий.

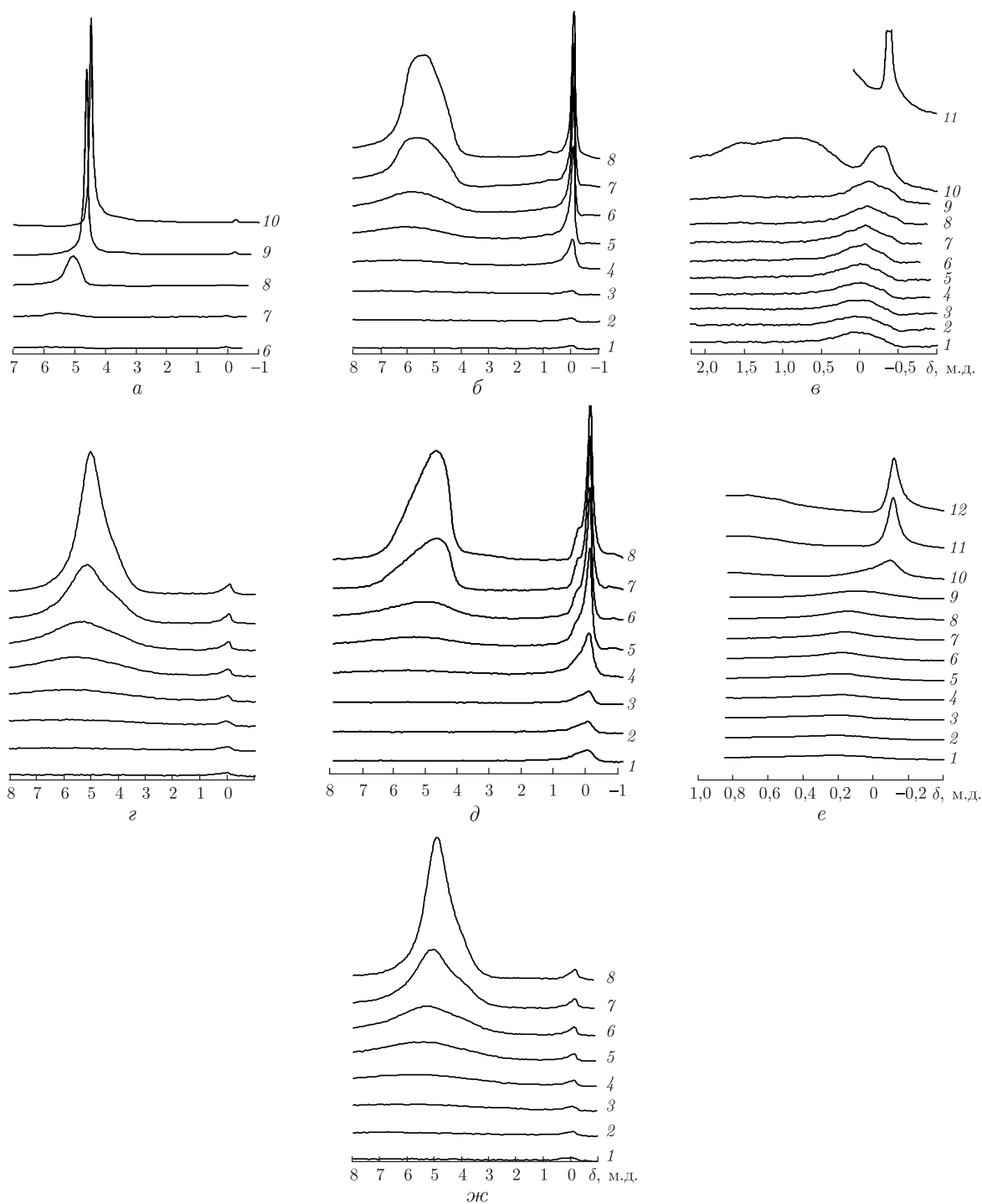


Рис. 2. Снятые при разных температурах ^1H ЯМР-спектры полидиметилсилоксанов, диспергированных в гелях:
 3% ПДМС-1000: а, б – 10% ГК, в – 10% САЧ, г – 10% Жел.; 3% ПДМС-5700: д – 10% ГК, е – 10% САЧ, ж – 10% Жел.
 Температура спектров, К: 1 – 200, 2 – 210, 3 – 220, 4 – 230, 5 – 240, 6 – 250, 7 – 260, 8 – 265, 9 – 270, 10 – 273, 11 – 280, 12 – 290

Как видно из данных рис. 2 (*a, б*), спектры воды представляют собой одиночный сигнал, химический сдвиг (δ_H) которого при понижении температуры от 280 до 200 К увеличивается от 4,5 до 5,5 м. д. В соответствии с классификацией, приведенной в публикациях [3, 4], это сильноассоциированная вода, в которой среднее число водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды (n) при 280 К практически такое же, как и в жидкой воде. С понижением температуры ширина спектра увеличивается, ввиду уменьшения подвижности молекул межфазной воды [6], а интенсивность уменьшается по мере ее замерзания.

Сигнал метильных групп исследованных силиконов (ПДМС-1000 и ПДМС-5700) имеет химический сдвиг $\delta_H = 0$ м. д. При низких температурах полидиметилсилоксаны способны кристаллизоваться в виде молекулярных кристаллов, в которых молекулы ПДМС связаны вандерваальсовыми взаимодействиями. При этом, ввиду малой подвижности молекул твердого силикона, они перестают регистрироваться в спектрах ЯМР и интенсивность сигнала метильных групп с понижением температуры уменьшается. На основе данных рис. 2 (*б*) можно заключить, что при охлаждении эмульсий до 200 К полного замерзания ПДМС-1000 не происходит. В процессе его оттаивания значительный рост интенсивности сигнала метильных групп наблюдается только при $T > 260$ К, а полное оттаивание — при $T = 273$ К.

Для эмульсий ПДМС-1000 в 10%-м растворе САЧ характер изменения интенсивности сигнала воды аналогичен приведенному на рис. 2 (*a*). Однако вблизи $T = 273$ К в спектрах фиксируется дополнительный сигнал с химическим сдвигом $\delta_H = 0,5\text{--}1,5$ м. д., который может быть идентифицирован как сигнал слабоассоциированной воды ($n < 1$ [3, 4]). Интенсивность сигнала этого типа воды быстро возрастает с ростом интенсивности сигнала метильных групп. Вероятно, этот тип связанной воды обусловлен водой в гидрофобных полостях глобул САЧ [3, 7, 8], которые могут сорбировать ПДМС в виде одиночных молекул или небольших кластеров. Следует отметить, что полного таяния ПДМС-1000 в геле САЧ не происходит даже в случае его нагревания до 280 К.

Гель желатина плохо стабилизирует эмульсии полидиметилсилоксанов. Однако в водной среде желатина фиксируется сигнал ПДМС-1000, интенсивность которого слабо зависит от температуры (см. *г* на рис. 2). Можно предположить, что с биополимерными цепями коллагена, который в желатиновой форме присутствует в виде статистического клубка [9], взаимодействуют отдельные молекулы ПДМС, которые при охлаждении не могут сформировать молекулярный кристалл ПДМС ввиду их пространственной разделенности.

Для эмульсий ПДМС-5700 общие закономерности в температурных изменениях спектров ^1H ЯМР воды и метильных групп ПДМС сохраняются такими же, как и в случае эмульсий ПДМС-1000: при диспергировании в водном растворе ГК максимальная интенсивность сигнала СН₃-групп достигается при 273 К (см. *д* на рис. 2); в САЧ, наряду с сильноассоциированной водой, при $T > 270$ К наблюдается некоторое количество слабоассоциированной воды (см. *e* на рис. 2); сигнал ПДМС в желатине слабо зависит от температуры, а его интенсивность значительно меньше, чем для эмульсий в растворах ГК и САЧ (см. *ж* на рис. 2).

Вид температурных зависимостей концентрации незамерзающей воды (C_{uw}) и ПДМС (в относительных единицах, рассчитанных по соотношению интенсивности сигналов воды и метильных групп) приведены на рис. 3 (*a* и *б* соответственно). На рисунке *в* для сравнения показаны зависимости интенсивности сигнала метильных групп от температуры для жидких ПДМС-1000 и ПДМС-5700. Вертикальная линия (см. *a* на рис. 3) разделяет области, относящиеся к сильно- и слабосвязанной воде (SBW и WBW соответственно). Характеристики слоев связанной воды — концентрации SBW (C_{uw}^s) и WBW (C_{uw}^w) воды, а также

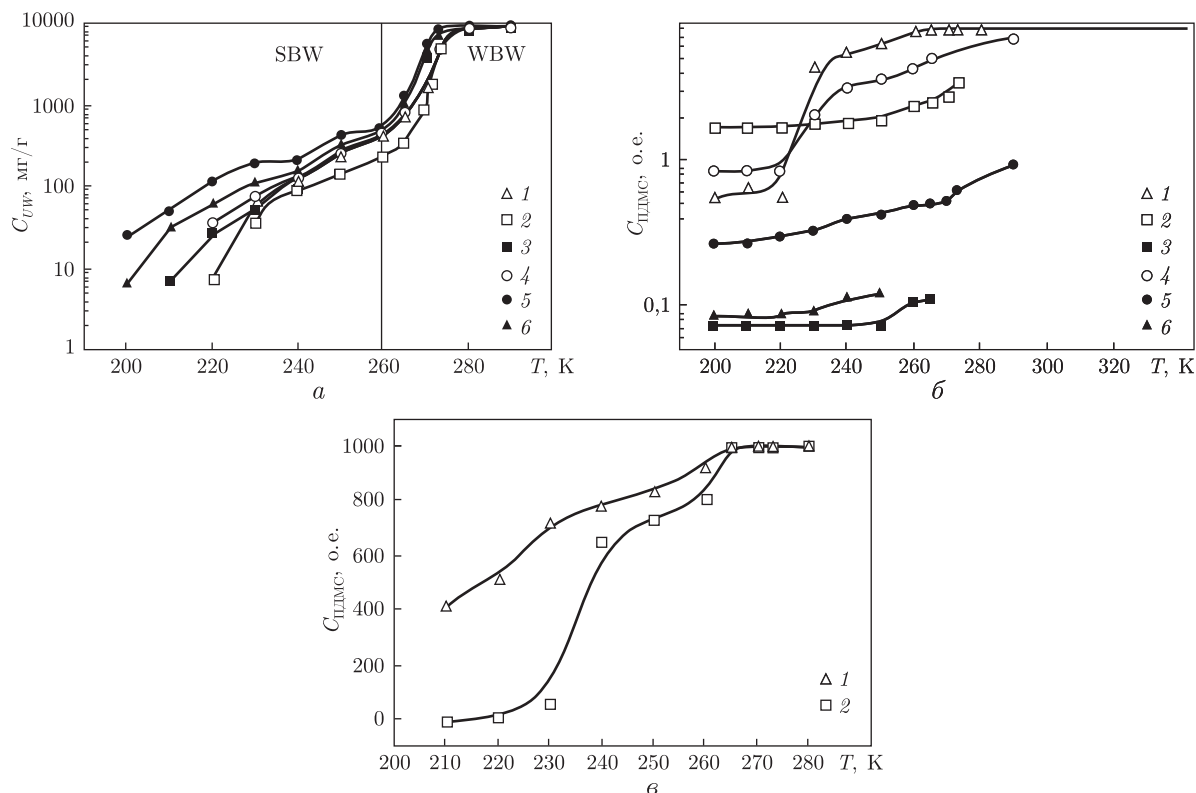


Рис. 3. Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды (а) и концентрации ПДМС (б): [ПДМС-1000: 1 – 10% ГК; 2 – 10% САЧ; 3 – 10% желатин; ПДМС-5700 : 4 – 10% ГК; 5 – 10% САЧ; 6 – 10% желатин], а также жидких полидиметилсилоксанов (в) [1 – ПДМС-1000; 2 – ПДМС-5700]

величина межфазной энергии (γ^s), рассчитанные по зависимостям $C_{uw}(T)$ в соответствии с методикой, подробно изложенной в публикациях [3–5], приведены в табл. 1.

Поскольку величина межфазной энергии характеризует суммарное изменение свободной энергии воды на границе раздела фаз биополимер – вода [3–5], обусловленное наличием межфазной границы, можно заключить, что в гелях ГК замена ПДМС-1000 на ПДМС-5700 сопровождается существенным (почти вдвое) падением величины γ^s , благодаря значительному уменьшению количества сильносвязанной воды, которое происходит на фоне роста количества слабосвязанной воды. Обратная закономерность наблюдается для растворов САЧ и геля желатина, в которых введение ПДМС-5700 приводит к значительному росту величины γ^s за счет роста количества слабосвязанной воды. Следовательно, полидиметилсилоксаны не являются полностью инертными по отношению к белкам, а мо-

Таблица 1

Биополимер	ПДМС	C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	γ^s , Дж/г
ГК	1000	450	3750	77
САЧ	1000	400	4400	48
Жел.	1000	800	3800	33
ГК	5700	200	5600	40
САЧ	5700	400	7600	103
Жел.	5700	250	7750	90

гут оказывать существенное влияние на гидратированность основных типов биополимеров, с которыми контактируют силиконовые импланты. Предполагая, что глубокая конформационная перестройка биополимеров сопровождается изменением, прежде всего, количества сильносвязанной воды, можно заключить, что такой перестройке в присутствии силиконов подвергаются ГК и Жел., в то время как САЧ в значительной степени сохраняет свою структуру.

С другой стороны, частицы силиконов, диспергированных в биополимерных гелях, также испытывают изменение своих физико-химических свойств. Из данных рис. 3 (б, в) следует, что кривая размораживания эмульсий силиконов близка по форме кривой размораживания жидкого силикона только для ПДМС-1000, диспергированного в геле ГК. В случае ПДМС-5700 в геле ГК уже наблюдается существенное повышение температуры размораживания силикона, причем полного его размораживания не наблюдается даже при 290 К (максимальная температура, использованная в процессе проведения экспериментов). Экстраполяция зависимости $S_{\text{ПДМС}}(T)$ в область высоких температур показывает, что полного размораживания силикона следует ожидать лишь при 300 К.

Для дисперсий силиконов в растворах САЧ эти различия оказались еще большими (см. б на рис. 3). Ни один из исследуемых ПДМС полностью не разморозился при 290 К. Как и в случае ГК, максимальный эффект роста температуры размораживания наблюдается для ПДМС-5700 (полного размораживания следует ожидать только при 320 К).

Одной из главных причин высокотемпературной кристаллизации наносиликонов может быть структурирующее влияние биополимерных цепей, которые создают вокруг наночастиц силиконов упорядочивающее поле молекулярных сил, в котором повышение температуры кристаллизации становится энергетически выгодным.

Таким образом, совокупность полученных экспериментальных результатов показывает, что силиконовые масла ПДМС-1000 и ПДМС-5700 способны образовывать 3%-е микроэмульсии в водных растворах САЧ и гелях гиалуроновой кислоты, стабильные в течение нескольких суток. В гелях желатина стабильные эмульсии не образуются, однако некоторое количество ($\sim 0,2\%$) силиконов может связываться с биополимером, вероятно, путем формирования вандерваальсовых комплексов.

Обнаружен эффект повышения температуры размораживания микроэмульсий силиконов в биополимерных средах, максимальная величина которого зарегистрирована для ПДМС-5700 в растворе САЧ и достигает 50° .

Диспергирование силиконов в биополимерной среде приводит к значительному изменению их гидратных характеристик, что может быть связано с изменением конформации ГК и Жел.

1. Дронов М. М. Рефракционная хирургия глаза: прошлое, настоящее, будущее // Офтальмохирургия и терапия. – 2001. – 1, № 1. – С. 4–11.
2. Chow A. Y., Chow V. Y., Packo K. H. et al. The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa // Archives Ophthalmol. – 2004. – 122. – P. 460–469.
3. Туров В. В., Гунько В. М. Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наук. думка, 2011. – 313 с.
4. Гунько В. М., Туров В. В., Горбик П. П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наук. думка, 2009. – 694 с.
5. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – 118, No 1–3. – P. 125–172.
6. Abragam A. The principles of nuclear magnetism. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1961. – 603 p.
7. Кениг С. Динамика взаимодействия в системе вода — белок. Результаты, полученные из измерений ядерной магнитной релаксации // Вода в полимерах. – Москва: Мир, 1984. – С. 159–182.

8. Shrade P., Klein H., Egly I. et al. Hydrophobic volume effects in albumin solutions // J. Colloid and Interf. Sci. – 2001. – **234**. – P. 445–447.
9. Gelsea K., Pöschlb E., Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2003. – **55**. – P. 1531–1546.

Клиническая офтальмологическая больница
“Центр микрохирургии глаза”, Киев
Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 26.10.2012

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

Емульсії полідиметилсилоксанів у концентрованих розчинах САЛ, желатину та гіалуронової кислоти

Методом низькотемпературної ^1H ЯМР спектроскопії та фазово-контрастної мікроскопії вивчено вплив біополімерних середовищ на стан мікрокрапель силікону та дисперсного силікону на гідратні властивості біополімерних молекул. Виявлено ефект підвищення температури розмерзання мікрокрапель силікону, максимальна величина якого (до 50°) зареєстрована у випадку диспергування ПДМС-5700 у 10% розчині САЛ. Показано, що під впливом дисперсної фази силіконів величина міжфазної енергії межі розподілу фаз біополімер – вода може змінюватися в 2–3 рази, що вказує на конформаційну перебудову біополімерів.

A. N. Ruban, A. I. Kazanets, T. V. Krupskaya, V. V. Turov

Emulsions of polydimethylsiloxanes in concentrated solutions of human serum albumin, gelatin, and hyaluronic acid

The effect of biopolymeric media on the phase state of micro- and nanodroplets of silicon and hydrated properties of biopolymer molecules is studied by low-temperature ^1H NMR spectroscopy and phase-contrast microscopy. The effect of increasing the thawing temperature for micro- (nano) silicon droplets, which is the maximal (up to 50 degrees) for dispersion of PDMS-5700 in 10% human serum albumin, was obtained. It is shown that, under the influence of the dispersed phase of silicones, the interfacial energy for the interface biopolymer–water can vary by 2–3 times, which may be caused by a conformational reorganization of biopolymers.