

Фероценвмісні епоксиполіуретанові композиції як перспективний матеріал для пластики кісткових уражень

Н.А. Галатенко, Т.В. Руденчик, Р.А. Рожнова, Д.В. Кулеш, І.Б. Демченко

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

Обґрунтована можливість створення імплантаційних матеріалів з покращеними фізико-механічними та біологічними характеристиками на основі епоксиполіуретану, наповненого фероценом. Визначена концентрацію біологічно активної речовини, яка в складі полімерного носія не приводить до токсичного впливу. Гістологічними дослідженнями встановлений вплив наявності фероцену в складі епоксиполіуретанових композицій на прискорення процесів регенерації.

Ключові слова: епоксиполіуретан, фероцен, середовище 199, імплантат.

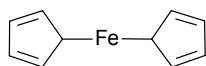
Розвиток реконструктивно-відновлювальної хірургії значно впливає на дослідження, пов'язані зі створенням нових біологічно активних полімерних матеріалів з лікувальною дією для відновлення ушкоджених органів і тканин. Імобілізація біологічно активних речовин на полімерних носіях, пролонговане вивільнення яких спрямовано на зменшення негативних наслідків у місцях імплантації, забезпечує швидке одужання при органо-відновлювальних операціях.

На сьогодні для пластики кісткових уражень широко використовують матеріали на основі епоксиполіуретанів. Відомі поліуретан-епоксидні композиційні матеріали для лікування туберкульозу кісток [1], травматичних переломів у щелепно-лицевій хірургії [2].

Однак, розробка нових біологічно активних епоксиполіуретанових композиційних матеріалів медичного призначення з комплексом покращених властивостей на сьогодні залишається актуальною проблемою хімії високомолекулярних сполук.

Полімерні композиції медичного призначення повинні мати комплекс фізико-хімічних і біологічних властивостей для того, щоб замінювати та лікувати конкретні патологічні ураження.

Одним із найбільш поширених способів покращення функціональних характеристик полімерних матеріалів є введення в полімерні матриці модифікаторів властивостей — наповнювачів різної природи [3, 4]. Як наповнювач нами був використаний фероцен — сандвічева металокомплексна сполука структурної формули:



Відомі роботи [5–7], в яких описано використання

похідних фероцену як протипухлинних препаратів, створення фармацевтичних засобів різнопланової дії з одночасно вираженими протимікробними, десенсибілізуючими та протианемічними властивостями.

Введення наповнювачів приводить до зміни властивостей матеріалу: підвищення термостабільності [8], зростання динамічного модуля пружності та міцності при стисканні [9], підвищення жорсткості [10] та зміни температури склування [11]. Отже, поєднання наповнювача з полімерною матрицею дає змогу отримувати матеріали з покращеними властивостями, а варіюючи його кількість можна отримати полімери з різними характеристиками.

Враховуючи вищевикладене, метою нашої роботи було створення полімерної композиції на основі епоксиполіуретану з фероценом як наповнювачем для отримання матеріалу з покращеними фізико-механічними та біологічними характеристиками.

Об'єкти та методи дослідження.

Об'єкти дослідження — епоксиполіуретанові (ЕПУ) композиційні матеріали, отримані на основі ізоціанатного форполімеру (ІФП), синтезованого за мольного співвідношення олігооксипропіленфумарату та 2,4;2,6-толуїлендіізоціанату, рівного 1:2 та 1,0:2,5 у середовищі N,N'-диметилацетаміду (ДМАА) при постійному перемішуванні реакційної суміші [12]. В ізоціанатний форполімер поступово вводили розраховану кількість епоксидної смоли ЕД-20 за мольного співвідношення ЕД-20 і ІФП, рівного 6:1, і 1,4-бутандіол. Реакцію проводили за температури 50 °С. В реакційну суміш при постійному перемішуванні додавали фероцен у розчині ДМАА (70 %-вий). При формуванні зразків ЕПУ реакційну масу отверджували Л-20. Масове співвідношення ЕПУ:Л-20 становило 2:1. Отриману суміш виливали на тефлонові

підкладки та сушили за температури 80 ± 5 °С до постійної ваги. Композити отримували у вигляді плівок.

Вміст вільних NCO-груп контролювали титриметричним методом [13].

Вміст наповнювача фероцену в ЕПУ становив 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 і 10,0 % мас.

Фізико-механічні показники визначали за ГОСТ 14236 на модернізованій машині 2166 Р-5 зі швидкістю розширення захватів 50 ± 10 мм/с і швидкістю фіксації результатів 0,01 с.

Метод культури тканин використовували для дослідження біологічної активності малих концентрацій фероцену. Як джерело клітин використовували підшкірну клітковину білих лабораторних щурів, що за умов культивування викликає ріст фібробластичних і фібробластоподібних елементів.

Культури були досліджені методом експлантації в згустку плазми у флаконах Карреля. Були досліджені такі розчини фероцену:

№ 1 (Ф1) – співвідношення ваги фероцену та об'єму середовища 199 – 0,1 мг : 10 мл (0,001 %-вий розчин);

№ 2 (Ф2) – співвідношення ваги фероцену та об'єму середовища 199 – 5 мг : 10 мл (0,05 %-вий розчин);

№ 3 (Ф3) – співвідношення ваги фероцену та об'єму середовища 199 – 10 мг : 10 мл (0,1 %-вий розчин).

Як контроль була культивована підшкірно-жирова тканина білих щурів. Як модельне використовували середовище 199 для культур тканини [14].

З метою стандартизації характеру росту культур їхні зони класифікували на компактну, сіткоподібну і зону мігруючих клітин, критерієм для виділення яких був характер розташування зростаючих фібробластичних елементів.

Внесення розчинів фероцену проводили на 3-ю добу культивування, коли починалася міграція фібробластичних елементів у флаконах. Дослідження росту і розвитку клітинних елементів підшкірної клітковини білих щурів проводили на 5, 7, 10 та 14-у добу культивування.

Гістологічні дослідження. Експеримент виконували на 40 білих лабораторних щурах (масою 180–220 г). Під наркозом, за умов асептики щурам субкутально імплантували зразки: №1 – ЕПУ (контроль), №2 – ЕПУ-1,0Ф розміром 5x5 мм. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування ефіром на 7, 14, 30 і 90-у добу після операції. Для морфологічного аналізу після стандартної гістологічної обробки полімерного матеріалу з оточуючою сполучною тканиною були виготовлені зрізи товщиною 10–12 мкм, які забарвлювали гематоксиліном та еозином. Для аналізу гістологічних препаратів використовували мікроскоп “Мікмед-2” та Carl Zeiss Primo Star зі збільшенням

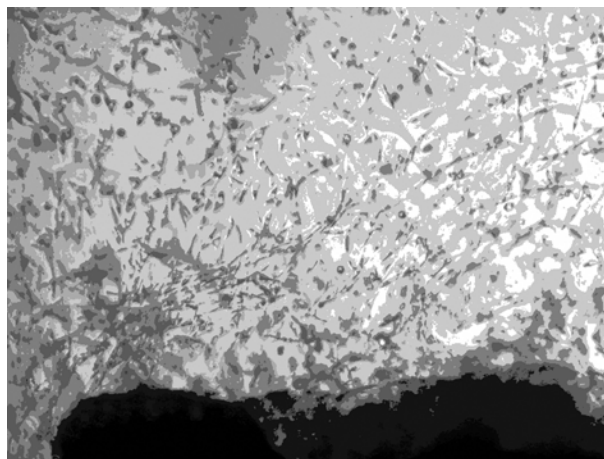


Рис. 1. Формування компактної, сіткоподібної та зони мігруючих фібробластичних елементів на 5 добу культивування. Мікро фото на рис. 1–7 зі збільшенням X 100

x100, x150.

Результати досліджень та їх обговорення.

Для створення біологічно активних полімерних композицій особливу увагу слід приділяти концентрації лікарської речовини, що вводиться в полімер. При використанні полімерних матеріалів як імплантатів лікарська речовина повинна проявляти пролонгований лікувальний ефект і в той же час не чинити токсикологічної дії на навколишні тканини.

Для підбору оптимальної концентрації фероцену в полімерних композиціях нами були проведені дослідження впливу самого фероцену на клітини тканинної культури, яка є модельною тест-системою у токсикологічному експерименті [14].

Як показали проведені дослідження, на 5-у добу спостереження в контролі відбувалося формування сіткоподібної зони, зони мігруючих фібробластичних елементів і початок формування компактної зони

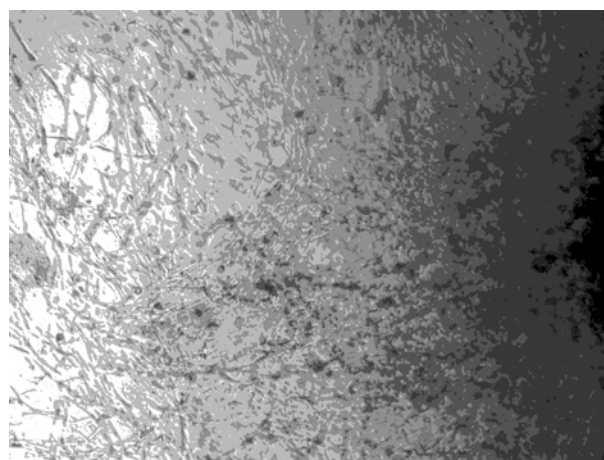


Рис. 2. Тканиноподібний ріст фібробластичних елементів на 5 добу культивування зразка № 1 (Ф1)



Рис. 3. Дегенерація клітинних елементів на 5 добу культивування зразка № 2 (Ф2)

(рис. 1).

Для зразка № 1 (Ф1) було характерне значне збільшення росту клітинних елементів. Зони росту, особливо компактна, в порівнянні з контролем, були більші за площею (рис. 2).

Для зразка № 2 (Ф2) спостерігали формування зон росту, як і в контролі, але відбувалася значна дегенерація клітинних елементів (рис. 3).

Для зразка № 3 (Ф3) відзначали значну затримку в рості клітин, спостерігали їх заокруглення, з'являлися виражені дегенеративні зміни у клітинах (рис. 4).

На 7-у добу дослідження для контролю та зразка № 1 (Ф1) відбувалося значне збільшення площ зон росту, спостерігали тканиноподібний ріст. Тоді, як для зразків № 2 (Ф2) і № 3 (Ф3) росту фібробластів не спостерігали, клітинні елементи перебували на стадії дегенерації.

На 10-у добу дослідження для зразка № 1 (Ф1) були характерні менш виражені дегенеративні зміни в порівнянні з контролем (рис. 5). Для зразків № 2 (Ф2) і № 3 (Ф3) клітинна популяція перебувала на стадії дегенерації.

На 14-у добу відбувалася повна дегенерація клітинних елементів у всіх флаконах. Отже, можна зробити висновок про те, що зразок № 1 (Ф1) мав стимулюючу дію на ранніх стадіях культивування, в порівнянні з контролем, а також сповільнював процес

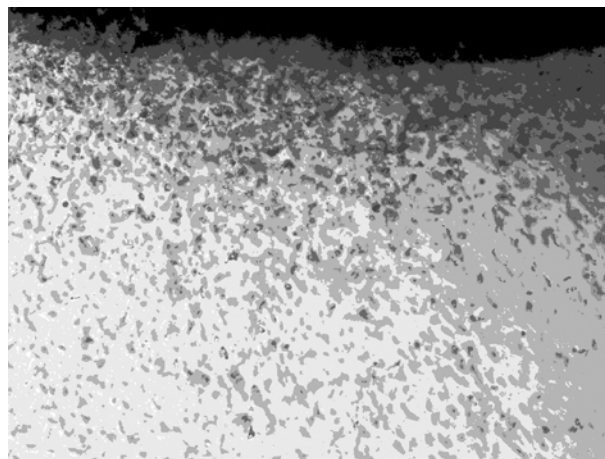


Рис. 4. Дегенеративні зміни зон росту фібробластичних елементів на 5 добу культивування зразка № 3 (Ф3)

дегенерації клітин на 10-у добу дослідження. При цьому екстракти зі зразків № 2 (Ф2) і № 3 (Ф3) інгібували ріст і розвиток клітинної культури.

Враховуючи процеси міграції речовин з полімерних матеріалів, можна спрогнозувати відсотковий вміст фероцену в полімерній композиції для надання їй біологічної активності.

Відомо, що кожен імплантативний матеріал, зазвичай від галузі застосування, повинен мати певні



Рис. 5. Початок дегенеративних змін на 10 добу культивування зразка № 1 (Ф1)

Таблиця. Залежність фізико-механічних властивостей епоксиполіуретанових композиційних матеріалів від вмісту фероцену

Фізико-механічні показники	Склад композицій						
	ЕПУ	ЕПУ-0,1Ф	ЕПУ-0,5Ф	ЕПУ-1,0Ф	ЕПУ-3Ф	ЕПУ-5Ф	ЕПУ-10Ф
ООПФ:ТДІ=1:2							
σ , МПа	33,7	27,11	49,73	23,95	8,63	31,61	30,58
ε , %	10	17	8,4	13,4	3	14	11,5
ООПФ:ТДІ=1,0:2,5							
σ , МПа	13,69	36,33	28,94	31,38	23,3	18,39	29,49
ε , %	25	16	24	15	29	12	13

фізико-механічні характеристики, тому було доцільно дослідити вплив різних концентрацій фероцену на фізико-механічні властивості ЕПУ композиційних матеріалів.

При проведенні фізико-механічних випробувань було встановлено, що залежність руйнуючої міцності наповненого полімеру має нелінійний характер з вираженими максимумами (таблиця). Для ЕПУ композиційних матеріалів з фероценом першої серії (ООПФ:ТДІ = 1:2) максимальне значення міцності при розриві спостерігали для матеріалу, в якому вміст наповнювача 0,5 % мас., і становить 49,73 МПа. Для композиційних матеріалів другої серії на основі ізоціанатного форполімеру, отриманого з надлишком ізоціанатних груп (ООПФ:ТДІ = 1,0:2,5) спостерігали максимум розривної міцності за концентрації 0,1 % мас., який становить 28,94 МПа.

Отже, введення фероцену до складу ЕПУ композиційних матеріалів (ООПФ:ТДІ = 1,0:2,5) приводить до підвищення міцності на розрив у 1,3–2,7 раза та у 0,3–1,5 раза для ЕПУ (ООПФ:ТДІ = 1,0:2,0). Відносне подовження полімерів теж зазнає змін щодо співвідношення компонентів ІФП. ЕПУ другої серії (ООПФ:ТДІ = 1,0:2,5) характеризуються більш високими значеннями відносного подовження, порівняно з ЕПУ першої серії (ООПФ:ТДІ = 1:2), що можна пояснити більшим вмістом уретанової складової у композиціях другої серії.

Нелінійна з вираженими максимумами зміна міцності композиційних матеріалів залежно від вмісту фероцену може бути пояснена ефектом малих добавок, фізичною взаємодією наповнювача з одним із компонентів полімерної системи, що спричиняє утворення бездефектної полімерної матриці (покращує властивості матеріалу) [15].

Для повного уявлення про можливість використання розробленого матеріалу як імплантата необхідне вивчення реакції організму з боку оточуючої

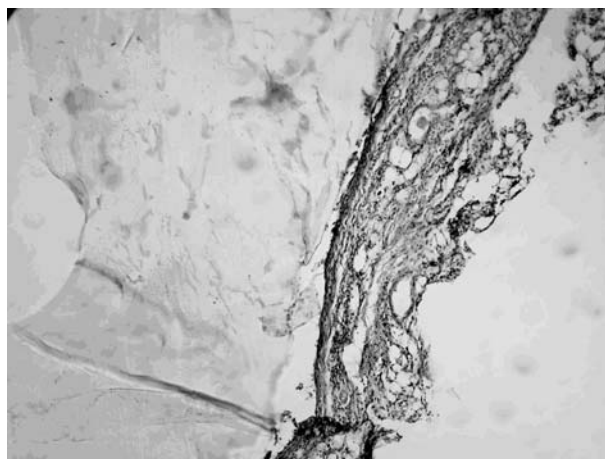
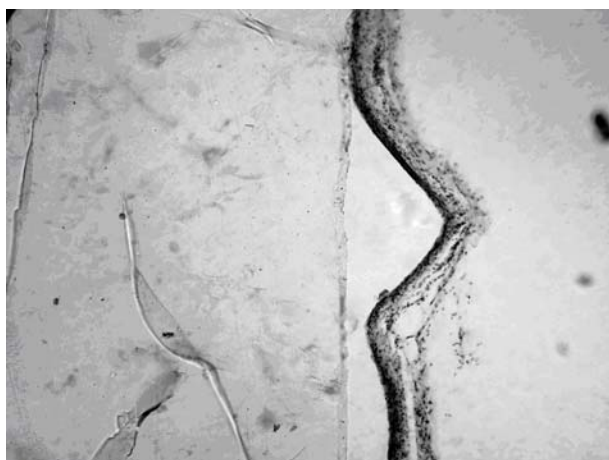


Рис. 6. Сполучнотканинна капсула навколо ЕПУ на 7 добу експерименту. Забарвлення гематоксилін-еозином

її тканини.

Враховуючи результати попередніх досліджень, які дали змогу визначити концентрацію фероцену в полімерній композиції на культурі тканин, а також проведені фізико-механічні дослідження, як полімерні зразки для імплантації експериментальним тваринам нами були обрані епоксиполіуретанові композиційні матеріали другої серії з наповненням фероценом 1 % мас. (ЕПУ-1,0Ф), контроль – ЕПУ.

За результатами гістологічних досліджень встановлено, що навколо імплантованих зразків ЕПУ та ЕПУ з фероценом, починаючи вже з 7-ої доби після операції, виявляли доволі тонку і зрілу, як для такого терміну дослідження, сполучнотканинну капсулу. Основними клітинними елементами капсули були веретеноподібні фібробласти, орієнтовані вздовж полімерного зразка. Навколо всіх імплантованих зразків спостерігали яскраво виражену макрофагальну реакцію, а навколо зразків ЕПУ, на окремих ділянках, була характерна помірна лейкоцитарна та лімфоцитарна



(а)



(б)

Рис. 7. Сполучнотканинні капсули навколо імплантованих зразків: ЕПУ – а; ЕПУ з фероценом – б на 14 добу експерименту. Забарвлення гематоксилін-еозином

інфільтрація (рис. 6). Кровоносні судини навколо зразків ЕПУ були представлені у великій кількості, деякі з них характеризувалися ускладненими мікроциркуляторними процесами, без елементів стазу і тромбозу. Навколо зразків ЕПУ з фероценом ускладнень з боку мікроциркуляторного русла не спостерігали, а самі кровоносні судини були представлені у невеликій кількості.

Через 14 діб після операції навколо зразків ЕПУ спостерігали сполучнотканинну капсулу, що складалася з пучків зрілих колагенових волокон і фібробластичних елементів веретеноподібної форми між ними, а також великої кількості макрофагів (рис. 7а). На окремих ділянках капсули спостерігали залишкову лейкоцитарну інфільтрацію. Навколо імплантованих зразків ЕПУ з фероценом спостерігали тоншу капсулу, внутрішня поверхня якої складалася, в основному, з макрофагів, кількість яких збільшувалася в порівнянні з попереднім терміном дослідження. Поряд розташовувалися пучки зрілих колагенових волокон і переважно веретеноподібні фібробласти, щільність яких була меншою, ніж навколо зразків ЕПУ (рис. 7б). Кількість кровоносних судин навколо зразків ЕПУ значно зменшувалася в порівнянні з попереднім терміном дослідження. В них не виявили порушень мікроциркуляторних процесів, як і навколо зразків ЕПУ з фероценом.

Через 30 діб після операції товщина сполучнотканинної капсули збільшувалася навколо зразків ЕПУ за рахунок активного синтезу фібробластичними елементами волокнистих структур і компонентів міжклітинної речовини. Навколо імплантованих зразків ЕПУ з фероценом сполучнотканинна капсула характеризувалася високим ступенем зрілості, а її клітинний склад мало чим відрізнявся від складу на попередньому терміні дослідження. Внутрішній шар капсул містив макрофаги, кількість яких дещо збільшувалася у порівнянні з попередніми термінами. Навколо всіх імплантованих зразків спостерігали кровоносні судини з нормальною трофікою та у невеликій кількості.

Через 90 діб після операції сполучнотканинні капсули навколо імплантованих зразків ЕПУ та ЕПУ з фероценом були схожі за клітинним складом, характеризувалися високим ступенем зрілості та наявністю незначної макрофагальної інфільтрації. Пучки зрілих колагенових волокон розташовувалися вздовж полімерного імплантата, між ними веретеноподібні фібробластичні елементи. Спостерігали поодинокі кровоносні судини, які характеризувалися нормальними мікроциркуляторними процесами.

Отримані результати гістологічних досліджень свідчать про те, що навколо імплантованих зразків ЕПУ та ЕПУ з фероценом відбувався нормальний фізіологічний процес з типовими клітинними реакціями, що розвиваються у відповідь на імплантацію чужорідного тіла. Макрофагальні елементи проявляли яскраво виражену фагоцитарну активність навколо всіх досліджуваних зразків, що позначалося на збільшенні їх кількості. Наявність фероцену в складі ЕПУ приводило до зменшення інтенсивності запальних реакцій у місці імплантації, що свідчило про активацію клітинного імунітету щодо ушкоджених тканинних і клітинних структур, що у свою чергу приводило до прискорення процесів регенерації.

Отже, комплексні дослідження при розробці нових біологічно активних полімерних матеріалів дали можливість отримати такий матеріал медичного призначення, який повною мірою відповідає поставленому завданню. Метод культури тканин дав змогу визначити концентрацію біологічно активної речовини, яка в складі полімерного носія не приводить до токсичного впливу. Фізико-механічні дослідження дали змогу встановити залежність міцнісних характеристик від вмісту наповнювача фероцену в композиції, що дає можливість створення полімерних імплантатів із заданими властивостями. Гістологічні дослідження при імплантації полімерних зразків експериментальним тваринам підтвердили ефективність отриманих композиційних матеріалів і дали змогу запропонувати їх для подальшого впровадження в медичну практику.

Література

1. Пат. на корисну модель 59922 Україна, МПК⁸ C08L 63/02, C08L 75/04, A61F 2/18, A61K 31/00. Полімерний композиційний матеріал для остеосинтезу / Галатенко Н.А., Рожнова Р.А., Горбунова Н.О. – Оpubл. 10.06.2011. – Бюл. № 11.
2. Галатенко Н.А., Куксін А.М., Рожнова Р.А., Астапенко О.О. // Доп. НАН України. – 2007. – № 3. – С. 142-147.
3. Старокадомский Д.Л., Телегеев И., Головань С.В. // Пласт. массы. – 2010. – № 7. – С. 35-40.
4. Быков Е. А, Дегтярев В. В. // Пласт. массы. – 2006. – № 1. – С. 32-36.
5. Пат. RU C01G49/00, A61K33/26, A61K31/33. Комплексные соединения железа - ферроценилалкилполифторазолы, обладающие противоопухолевой активностью. / Снегур Л.В.; Бабин В.Н.; Полякова Н.В.; Боев В.И.; Коломиец А.Ф.; Некрасов Ю.С.; Щитков К.Г.; Панкратов А.А.; Морозова Н.Б.; Ильина А.И. – Оpubл. 10.09.1997.
6. Толстанов О.К. Протимікробна активність, токсичність і фармакологічна дія гетероциклічних сполук, що вміщують фрагменти металоценів: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків: Ін-т мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН

України, 2004. – 19 с.

7. Кучма І.Ю., Лебедева Н.Ю., Толстанов О.К., Іщенко Т.І., Волинська Н.П. // Архів клінічної та експериментальної медицини. – 2008, – 17, № 2. – С. 159-162.

8 Горбунова Н.О., Рожнова Р.А., Галатенко Н.А., Левенець Є.Г. // Полімер. журн. – 2011. – 33, № 1. – С. 82-88.

9 Роголєв А. В. Дис. ... канд. техн. наук: спец. 05.02.01 «Материаловедение». – Барнаул, 2007. – 121 с.

10. Галатенко Н.А., Куксін А.М., Рожнова Р.А., Астапенко О.О. // Полімер. журн. – 2008. – 30, № 2. – С.168-172.

11. Беев А.А., Беева Д.А., Абаев А.М., Козлов Г.В., Микитаев А.К. // Современные наукоемкие технологи.

– 2006. – № 3. – С. 60-61.

12. Руденчик Т.В., Рожнова Р.А., Бондаренко П.О., Демченко І.Б., Кісельова Т.О. // Доп. НАН України. – 2012. – № 5. – С.146-151.

13. Сигиа С., Ханна Д. Г. Количественный анализ по функциональным группам. – Москва: Химия, 1983. – 671 с.

14. Лебедев Є.В., Константинов Ю.Б., Галатенко Н.А., Яценко В.П., Рожнова Р.А., Максименко В.Б. Токсиколого-гігієнічні та доклінічні дослідження полімерних матеріалів і виробів на їх основі медичного призначення. - К.: Наук. думка, 2009. - 98 с.

15. Липатов Ю.С. Физическая химия наполненных полимеров. – М.: Химия, 1997, -304 с.

Надійшла до редакції 25 грудня 2012 р.

Ферроценсодержащие эпоксиполиуретановые композиции как перспективный материал для пластики костных поражений

Н.А. Галатенко, Т.В. Руденчик, Р.А. Рожнова, Д.В. Кулеш, І.Б. Демченко

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины
48, Харьковское шоссе, Киев, 02160, Украина

Обоснована можливість створення імплантационних матеріалів з улучшеними фізико-механичними і біологічними характеристиками на основі епоксиполіуретана, наповненого ферроценом. Визначено концентрація біологічно активної речовини, яка в складі полімерного носія не призводить до токсичного впливу. Гістологічними дослідженнями встановлено вплив наявності ферроцену в складі епоксиполіуретанових композицій на прискорення процесів регенерації.

Ключевые слова: эпоксиполиуретан, ферроцен, среда 199, имплантат.

Ferrocene-containing epoxy-polyurethane compositions as perspective material for the plastics of bone defeats

N.A. Galatenko, T.V. Rudenychk, R.A. Roznova, D.V. Kulesh, I.B. Demchenko

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine
02160, Kharkivske shausse 48, Kyiv, Ukraine

The possibility to create of grafting materials with improved physical-mechanical and biological characteristics on the basis epoxy-polyurethane filled by ferrocene were substantiated. The concentration of the biologically active substance in within the polymer does not lead to toxic effects. The influence of the presence of ferrocene in within epoxy-polyurethane compositions on the acceleration of regeneration was established by histological researches.

Key words: epoxy-polyurethane, ferrocene, biological medium 199, the implant.