

**БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА
ДЛЯ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ СВОЙСТВ ТЕКСТИЛЬНЫХ
МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С КРОВЬЮ**

*С. В. Лосева**, *С. П. Новикова**, *Н.Н. Самсонова**, *Д.Ш. Самуилова**,
*Л.Г. Климович**, *М.Г. Плющ**, *Н. М. Анучина**, *В.М. Быкова***, *Е. А. Ежова***

*Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН,
Москва, E-mail: loseva_s@mail.ru
**ВНИРО, Москва

**BIODEGRADABLE COATS BASED ON CHITOSAN FOR IMPROVEMENT OF
PROPERTIES OF MEDICAL TEXTILE CONTACTING WITH BLOOD**

*S.V. Loseva**, *S.P. Novikova**, *N.N. Samsonova**, *D.Sh. Samuilova**,
*L.G. Klimovich**, *M.G. Plyshch**, *N.M. Anuchina**, *V.M. Bykova***, *E.A. Ezhova***

*Bakoulev Scientific Center for cardiovascular surgery RAMS,
Moscow, E-mail: loseva_s@mail.ru
**VNIRO, Moscow

ABSTRACT

Biodegradable coats based on chitosan and drugs were produced. Physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan coats were investigated.

Проблема создания и использования искусственных органов и устройств – одна из важнейших для медицины, поскольку от ее успешного решения зависит максимальная эффективность хирургических операций, сокращение реабилитационного периода, повышение качества жизни больных. Это особенно важно при хирургических вмешательствах на сердце и сосудах, когда применяется большое количество медицинских изделий, находящихся в кратковременном (инфузионные катетеры, оксигенаторы, гемодиализаторы и др.) или длительном контакте с кровью (синтетические протезы клапанов сердца, сосудистые протезы, заплаты для хирургического лечения аневризм сердца и др.). По мере накопления опыта по использованию этих изделий становилась ясной необходимость улучшения не только конструктивных особенностей каждого изделия, но и придания им таких специфических свойств, как: биосовместимость, тромборезистентность, антимикробность, а протезам кровеносных сосудов (ПКС) и заплатам для хирургического лечения аневризм сердца – еще и нулевой хирургической пористости [1,2].

Одним из направлений усовершенствования функциональных свойств этих изделий является химическое модифицирование их поверхности биodeградируемыми композициями на основе природных полимеров в сочетании с различными биологически активными и лекарственными веществами [1].

В настоящее время для модифицирования текстильных медицинских изделий, контактирующих с кровью, используют биodeградируемые композиции на основе коллагена, желатина и альбумина. Однако эти вещества помимо достоинств обладают рядом недостатков, обусловленных их белковой природой (могут вызывать аллергическую реакцию и неустойчивы к воздействию микроорганизмов). Поэтому поиск новых модифицирующих материалов, способных заменить применяемые белковые биополимеры, несомненно, целесообразен [3,4].

Нами была проведена работа по поиску представителей других классов природных полимеров, пригодных для модификации текстильных медицинских изделий, контактирующих с кровью. В связи с рядом привлекательных для использования в медицине свойств в качестве нового модифицирующего агента был выбран природный полисахарид хитозан (ХТ). Он обладает биосовместимостью, биodeградируемостью (разрушается до нетоксичных для организма веществ: N-ацетилглюкозамин или глюкозамин), хорошими пленкообразующими свойствами, способностью к адсорбции различных лекарственных препаратов и, что особенно важно, – собственной бактериостатичностью, что является несомненным преимуществом перед веществами белкового происхождения [5].

Материалы и методы

В работе использовали образцы хитозана двух видов квалификации “ч” производства ВНИРО, Москва:

ХТ-1: $MM=2 \cdot 10^5$ Да, зольность 0,4%, степень дезацетилирования 87%;

ХТ-2: $MM = 3,0 \cdot 10^5$ Да, зольность 0,4%, степень дезацетилирования 90%.

Хитозановые пленки получали методом полива из 1–5 мас.% растворов полимера в уксусной кислоте, нанесенных на полиэтиленовую (ПЭ) подложку при комнатной температуре в течение 5 суток. Для перевода хитозановых пленок в водонерастворимое состояние применяли термообработку при различных температурах (100 и 120 °С) в течение заданного времени, в результате получали термообработанную С-форму (солевую) и обработку щелочью (NaOH) – перевод из солевой С-формы в форму основания – О-форму.

Деформационно-прочностные характеристики пленок определяли в условиях одноосного растяжения при 20–22 °С и скорости растяжения 10 мм/мин на приборе “Instron-1122”. По деформационным кривым рассчитывали величины максимального напряжения σ_p и деформации ϵ_p при разрыве. Перед определением деформационно-прочностных характеристик проводили пластификацию пленок 30 масс.% раствором глицерина в воде.

В модифицирующие композиции вводили лекарственные препараты (ЛП) антимикробного и антиагрегантного действия. Сорбционную емкость по лекарственным препаратам определяли на спектрофотометре “Shimadzu UV1240”.

Результаты и их обсуждение

Возможность использования полимерных композиций для модифицирования текстильных медицинских изделий помимо био- и гемосовместимости определяется деформационно-прочностными (прочность, эластичность) и физико-химическими (степень набухания, сорбционная емкость по выбранным ЛП, срок полной биодеструкции) характеристиками этих композиций.

Для выбора композиций с оптимальными характеристиками в качестве ориентира использовали прочностные характеристики композиций на основе желатина, применяемые в настоящее время для модификации протезов кровеносных сосудов (ПКС).

Как и следовало ожидать, помимо молекулярной массы наиболее сильное влияние на физико-механические свойства оказывает химическая форма хитозана в композиции и режимы термообработки (табл. 1).

Таблица 1. Влияние режимов перевода в водонерастворимое состояние на деформационно-прочностные характеристики хитозановых пленок

УСЛОВИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ*	ПРОЧНОСТЬ ПРИ РАЗРЫВЕ, σ_p , МПа	ОТНОСИТЕЛЬНОЕ УДЛИНЕНИЕ, ϵ_p , %
ХТ-2, ММ= 2,9·10 ⁵ Да, С-форма		
Термообработка 100°С		
Время термообр. 1 ч	2,5±0,3	102±21
Время термообр. 2 ч	3,8±0,4	85±17
ХТ-2, ММ= 2,9·10 ⁵ Да, О-форма		
1М NaOH, 1 ч 30 мин.	28,3±2,9	118±23,5
1М NaOH, 10 ч 30 мин.	19,3±2	125±25
0,5М NaOH, 1 ч 30 мин.	19,5±2	100±20
ЖЕЛАТИН	3±0,5	110±22

*Пластификатор – глицерин.

Как видно из представленных данных (см. табл. 1), наиболее подходящими для использования в качестве модифицирующих покрытий для текстильных медицинских изделий, с точки зрения прочностных свойств (большей эластичности и прочности), являются композиции на основе хитозана в О-форме.

Возможность использования полимерной композиции в качестве депо лекарственных препаратов определяется её способностью к набуханию и сорбционной емкостью по выбранным лекарственным препаратам (ЛП). Несмотря на лучшие механические свойства композиций на основе ХТ в О-форме, мы считали целесообразным исследовать сорбционные свойства полимерных композиций содержащих хитозан как в О-форме, так и в С-форме.

В табл. 2 представлены данные о сорбционных свойствах полимерных композиций относительно антимикробного препарата широкого спектра действия – ципрофлоксацина и антиагреганта – дипиридамола. Для сравнения приведены данные о сорбционной емкости применяемых в настоящее время для модификации ПКС композиций на основе желатина.

Как видно из табл. 2, наибольшей сорбционной емкостью по отношению к выбранным ЛП (ципрофлоксацин, дипиридамола) обладают композиции на основе ХТ ММ=300 кДа в “термообработанной С-форме”. Композиции на основе ХТ в О-форме обладают в 3 раза меньшей сорбционной емкостью, что является их недостатком.

Для оценки эффективности введения ЛП в композиции были проведены бактериологические исследования полученных композиций на основе ХТ и ЛП (ципрофлоксацин, дипиридамола). Антимикробную активность определяли на 4-х штаммах микроорганизмов: *Streptococcus aureas*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudo-*

monas aeruginosa, *Enterococcus*. На агаризованную среду с культурами помещали образцы композиций в виде пленок площадью 1×1 см. Оценивали зону задержки роста микроорганизмов (зону лизиса) через 24 ч, 48 ч и на 5-е сутки. Антибиотическую активность выражали в миллиметрах диаметра зоны лизиса.

Таблица 2. Сорбционная емкость хитозановых композиций по выбранным лекарственным препаратам

СОСТАВ КОМПОЗИЦИИ	КОЛИЧЕСТВО ЛП, мг ЛП/г ХТ
ХТ, ММ= 220 кДа, С-форма	
Время термообработки* 1 ч	13,3±1,5
Время термообработки* 2 ч	12,8±1,4
ХТ, ММ= 300 кДа, С-форма	
Время термообработки* 2 ч	13,4±1,6
ХТ, ММ= 300 кДа, О-форма	6,3±0,8
ЖЕЛАТИН	15,8±1,6

*Термообработка 100°С.

Таблица 3. Антимикробная активность композиций на основе хитозана и ЛП

ВИД МИКРО-ОРГАНИЗМА	Зоны задержки роста микроорганизмов, мм								
	ХТ-1, ММ= 2,2×10 ⁵ Да, С-форма, + ЛП			ХТ-1, ММ= 2,2×10 ⁵ Да, О-форма + ЛП			Контроль ХТ-1, С-форма, О-форма БЕЗ ЛП		
	24 ч	48 ч	5 сут.	24 ч	48 ч	5 сут.	24 ч	48 ч	5 сут.
<i>Enterococcus</i>	21	21	25	20	20	20	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	22	22	20	21	22	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	19	—*	17	13	—*	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	19	19	13	13	13	0	0	0

*На пятые сутки наблюдалась зона вторичного роста.

Бактериологические исследования показали, что антибиотическая активность полученных пленочных композиций на основе ХТ и ЛП сохранялась в течение пяти суток, композиции не содержащие лекарственных препаратов антибиотической активности, не проявились.

Как известно, биосовместимые материалы, предназначенные для контакта с кровью, **не должны**: вызывать образование тромбов, активировать свертывающую систему и систему комплемента, оказывать отрицательное действие на белковые О-форменные элементы крови, нарушать электролитный баланс крови. В данной работе были проведены гематологические (*in vitro* с нативной кровью) исследования композиций на основе ХТ и ХТ с ЛП. Оценивали: биохимические параметры крови (общий белок, альбумин, альбумин-глобулиновое соотношение (А/Г), иммуноглобулины JgG, JgM), степень агрегации тромбоцитов, протромбиновое время (Pt), фибриноген (Fi), активированное частичное тромбопластиновое время – АЧТВ (At) при контакте с образцами пленочных композиций на основе ХТ (1ХТ, 2ХТ) и ХТ с ЛП (3ХТ).

Как видно из данных табл. 4, контакт с кровью всех образцов, кроме ХТ в О-форме (образец 2ХТ), не приводит к значительным изменениям в состоянии белковых фракций. О-форма ХТ (образец 2ХТ) вызывает повышенную реакцию иммуноглобулинов JgG и JgM. Во всех случаях наблюдается снижение агрегации тромбоцитов, индуцированных АДФ, наиболее значительное влияние на состояние тромбоцитов оказывает О-форма ХТ (образец 2ХТ). Ни один из образцов не

оказывает влияния на протромбиновое время (Pt) и активированное частичное тромбопластиновое время At (АЧТВ), но наблюдается заметное влияние на фибриноген (Fi), особенно на 60-й минуте контакта. Таким образом можно сделать вывод, что композиции на основе хитозана не оказывают отрицательного воздействия на параметры крови, наблюдаемое снижение агрегации тромбоцитов и увеличение количества фибриногена свидетельствует об активировании фибринолитической системы. Изучение влияние О-формы хитозана на иммуноглобулины необходимо продолжить.

Таблица 4. Параметры крови при контакте с пленочными композициями на основе хитозана (ХТ)

Параметры	Продолжительность контакта с кровью образцов ХТ, мин											
	до кон-такта	образец 1ХТ			до кон-такта	образец 2ХТ			до кон-такта	образец 3ХТ		
		15	30	60		15	30	60		15	30	60
Общий белок, г/л	61	62	62	62	70	70	71	71	77	75	76	76
Альбумин, г/л	28	28	28	28	47	47	49	49	47	46	47	47
А/Г	0,8	0,8	0,8	0,8	1,3	2,0	2,2	2,2	1,6	1,6	1,6	1,6
JgG, мг/дл	820	819	819	812	785	517	495	478	997	967	1010	1010
JgM, мг/дл	241	235	238	232	109	293	338	337	60,9	60,1	60,2	61,8
Степень агрегации тромбоцитов, %	40	35	31,7	32	53	45	45	31	42	37	34	35,1
Pt, с	18,0	18,1	18,3	18,1	18,0	18,3	18,0	17,8	18,0	18,1	17,8	18,0
Fi, мг%	359	357	377	412	359	379	369	398	359	363	362	411
At	29,7	28,6	29,5	28,2	29,7	29,5	31,1	31,1	29,7	29,5	30,3	29,9

Примечание: 1ХТ – С-форма без ЛП; 2ХТ – О-форма без ЛП; 3ХТ – С-форма с ЛП.

Также были определены сроки деструкции ХТ композиций в модельных средах (в воде (рН = 5,8) и физиологическом растворе (рН= 6,6)) при 37°С. Они составили 23 (вода) и 20 суток (ф.р-р) для композиций на основе ХТ в “термообработанной С-форме”, 31 (вода) и 28 суток (ф.р-р) для композиций на основе ХТ в О-форме, сроки деструкции желатиновых композиций 30 и 25 суток соответственно.

Учитывая комплекс свойств, которыми обладают разработанные нами композиции на основе хитозана, можно считать их перспективными материалами для модифицирования поверхности текстильных медицинских изделий, контактирующих с кровью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова С.П. Пути совершенствования биоматериалов для сосудистой пластики // Биологические протезы артерий. Кемерово, 1996. С. 151-170.
2. Кислиновская Н. В., Новикова С. П., Доброва Н. Б. Композиции на основе биополимеров для модификации сосудистых протезов // Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии. Кемерово: Кемеровский полиграф комбинат. 1996. С. 105-122.
3. Лосева С. В., Новикова С. П. Условия формирования гидрогелевых структур на основе желатина в модифицирующих покрытиях для сосудистых протезов // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева. 2003. Т. 4, № 9. С. 21-28.
4. Yves Marois, Nabil Chakfe. An albumin coated polyester arterial graft: in vivo assessment of biocompatibility and healing characteristics // Biomaterials. 1996. V. 17, № 1. P. 3-14.
5. Скрабин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 365 с.