

УДК 615.468.6; 66.095.26; 922.3; 577.12; 615.273.53

МОДИФИКАЦИЯ И СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ГРУПП ГЕПАРИНА НА ПОВЕРХНОСТИ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

Т.Н. Акентьева^{1*}, С.В. Лузгарев², А.С. Лузгарев², М.А. Резвова¹,
Ю.А. Кудрявцева¹

Резюме. Для придания тромбозоустойчивых свойств хирургической нити перспективным является нанесение покрытия с использованием биополимера класса полигидроксиалканоев и нефракционированного гепарина. Для придания прочности и равномерности антитромботическому покрытию использовали химическую реакцию, которая проходила в несколько этапов. Первая стадия заключалась в инициации центров привитой сополимеризации на поверхности материала методом озонирования. На втором этапе создавали дополнительный подслои полиметакрилоилхлорида, имеющий в своем составе активные хлорангидридные группы, которые могут образовывать с гепарином прочные ковалентные связи. Третьей стадией стала химическая прививка гепарина на образованный подслои из его раствора в бикарбонатном буфере при пониженной температуре. Оценку качества присоединения гепарина к шовному материалу оценивали с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния. Полученные результаты показали, что модификация шовного материала с помощью метода химического иницирования позволяет прочно закрепить гепарин на поверхности нити.

Ключевые слова: шовный материал, модификация, биополимер, гепарин.

MODIFICATION AND METHOD OF DETERMINING OF ACTIVE GROUPS OF HEPARIN ON THE SURFACE OF SUTURE MATERIAL

T.N. Akentyeva^{1*}, S.V. Luzgarev², A.S. Luzgarev², M.A. Rezvova¹, Y.A. Kudryavtseva¹

Abstract. The coating with the application of biopolymers of polyhydroxyalkanoate class and unfractionated heparin is perspective for giving thromboresistant properties to a surgical suture. We used a chemical reaction which was performed in several stages to give strength and uniformity to the antithrombotic coating. The first stage was the initiation of the centers of graft copolymerization on the surface of the material by ozonation. At the second stage we created an additional underlayer of polymethacryloylchloride having active acid chloride groups in its content, which can form strong covalent links with heparin. The third stage was a chemical grafting of heparin on the formed underlayer from its solution in bicarbonate buffer at a reduced temperature. Quality assessment of heparin addition to the suture material was evaluated by Raman scattering spectroscopy. The obtained results showed that the modification of the suture material with the help chemical initiation method allows to firmly secure the heparin on the surface of the suture.

Keywords: suture material, modification, biopolymer, heparin.

1 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6

2 – ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

1 – Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6, Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russia

2 – Kemerovo State University, 6, Red str., Kemerovo, 650000, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: t.akentyeva@mail.ru, silikem@list.ru

Тел.: 8 (923) 606 07 07

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большинство оперативных вмешательств проводится с использованием шовного материала, который должен обладать рядом важных свойств: антибактериальной активностью, био- и гемосовместимостью. В арсенале хирургов присутствует большое разнообразие различного шовного материала, в том числе и модифицированного [1–3]. Наиболее широко применяют шовный материал, обладающий собственной антибактериальной активностью [4, 5]. Для сердечно-сосудистой хирургии, и в особенности при реконструктивных операциях на сосудистом бассейне актуально использование шовного материала, обладающего вы-

раженными тромбозоустойчивыми свойствами. Улучшенная гемосовместимость является важным свойством для шовного материала, который будет находиться в контакте с кровью во время клинического применения. С целью повышения степени гемосовместимости синтетических материалов в настоящее время чаще всего проводят гепаринизацию поверхностей изделий различными методами. Гепарин – один из наиболее интенсивно изученных гликозаминогликанов, естественный антикоагулянт, синтезируемый в организме, который ингибирует образование тромбина или некоторых других протеаз коагуляции и предотвращает образование сетей фибрина [6]. Преимуществом гепарина является также наличие в его структуре химически актив-

ных карбоксильных и аминогрупп, благодаря чему возможна ковалентная прививка антикоагулянта к модифицируемой поверхности [7]. Для придания гемосовместимых свойств протезам артерий широко применяют нефракционированный или низкомолекулярный гепарин [6–8]. Подобные шовные материалы имеют серьезные перспективы для клинического применения.

Повысить биосовместимость нити возможно путем создания на ее поверхности дополнительного слоя, состоящего из биodeградируемых полимеров природного происхождения, которые распадаются в организме человека с образованием простых нетоксичных соединений. Наибольший интерес представляет биополимер микробиологического происхождения – полигидроксibuтират (ПГБ), представитель класса полиоксiалканoатoв [9, 10]. Благодаря гемо- и биосовместимости, высоким прочностным характеристикам, ПГБ апробирован в качестве сырья для производства различных медицинских изделий. Кроме того, ПГБ выдерживает необходимые условия стерилизации без ухудшения исходных свойств и хорошо растворяется в доступных органических растворителях. В исследованиях, проведенных ранее, было доказано, что ПГБ обеспечивает прочное и равномерное покрытие полипропиленовой нити, данная модификация не оказывает отрицательного влияния на основные компоненты крови – тромбоциты и эритроциты [9].

Однако в настоящее время такой шовный материал отсутствует на рынке.

Цель исследования: разработка технологии нанесения биоактивного покрытия на поверхность шовного материала с целью повышения тромборезистентных свойств нити.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовали нить на основе полипропилена Serapren 3,0. Для последующей модификации на поверхность шовного материала наносили слой биodeградируемого полимера – 3-полигидроксibuтирата (ПГБ) с молекулярной массой 2591000 Да, синтезированного в институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино, Московская область).

Модификацию шовного материала нефракционированным гепарином «Биохими» (Biochemie, Австрия) проводили в три стадии. Первая стадия заключалась в инициации центров привитой сополимеризации на поверхности материала методом озонирования. На втором этапе создавали дополнительный подсло́й полиметакрилоилхлорида, имеющий в своем составе активные хлорангидридные группы, которые могут образовывать с гепарином прочные ковалентные связи. Для его создания использовали метакрилоилхлорид (хлорангидрид метакриловой кислоты) квалификации «ч» (ТУ 6-09-14-2270-89, очищен перегонкой при пониженном давлении). Прививка метакро-

илхлорида к ПГБ проводилась из газовой фазы при нагревании. На третьем этапе проводили химическую прививку гепарина на образованный подсло́й из его раствора в бикарбонатном буфере при пониженной температуре.

Исследование полноты присоединения гепарина к субстрату проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии) с применением прибора Т64000 (Horiba, Япония) путем сканирования поверхности образца. Для расшифровки и интерпретации полученных результатов использовали литературные справочные данные по рамановской спектроскопии [11–15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сердечно-сосудистой хирургии наиболее часто применяют нити на основе полипропилена, однако несмотря на все преимущества данного вида шовного материала, его био- и гемосовместимые свойства далеки от идеала.

С целью модификации подобных шовных материалов и придания им специфических свойств применяют различные технологии [5, 8, 16]. В литературе приведены сведения о возможности химической прививки гепарина к поверхности различных полимеров [6, 7]. Для этого полимерный субстрат модифицируют с помощью привитой сополимеризации с метакрилоилхлоридом, который в последующем реагирует с гепарином с образованием прочных ковалентных сложноэфирных связей. Однако используемый для привитой сополимеризации радиационный метод с применением γ -излучения является технически сложным, небезопасным и малоприменимым для крупного производства. Наиболее перспективным представляется изучение возможности химического иницирования привитой сополимеризации. Для данной цели перспективным является озонирование несущего полимера (субстрата), позволяющее образовать на его поверхности активные группы, которые могут в дальнейшем иницировать прививку мономера по радикальному механизму. Метод озонирования является альтернативным способом иницирования процесса прививочной полимеризации и имеет свои преимущества перед радиационным и химическими способами.

Прививку гепарина к ПГБ-модифицированной поверхности проводили в три стадии. Первая стадия заключалась в озонировании субстрата. При этом на его поверхности ПГБ образуются активные группы –ОООН и –ООН, которые являются инициаторами привитой сополимеризации (рисунок 1).

Данная стадия проводилась путем выдержки субстрата в токе озонно-воздушной смеси (0,14% об. озона) со скоростью 1 л/мин в течение часа при комнатной температуре (25 °С).

На втором этапе методом привитой сополимеризации проводили нанесение активного подсло́я, име-

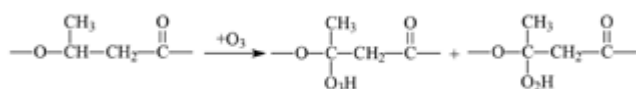


Рисунок 1. Образование активных групп –ОООН и –ООН на поверхности ПГБ

ющего в своем составе хлорангидридные группы (рисунк 2).

Реакция проводилась при выдерживании субстрата в парах хлорангидрида метакриловой кислоты при температуре 80–90 °С в течение 3 ч с предварительным вакуумированием до остаточного давления 5 мм рт. ст. для удаления воздуха.

Третьей стадией стала химическая прививка гепарина к подслою (рисунок 3).

Химическая прививка проводилась при выдерживании субстрата в растворе гепарина (0,5%) в бикарбонатном буферном растворе (0,1 моль/л NaHCO_3) при температуре 0–5 °С в течение 10 ч при комнатной температуре.

Использование метода спектроскопии комбинационного рассеяния позволило определить изменения в поверхностном составе и установить, прошла ли прививка. Как видно из полученных данных, в спектре обработанного образца наблюдалось большое количество отличий от исходного шовного материала и нити, покрытой только ПГБ. Области спектра, где имеются наиболее заметные изменения, выделены красными фигурными скобками (рисунки 4).

Данный метод позволяет выявить изменения, полученные после нанесения модифицирующего слоя.

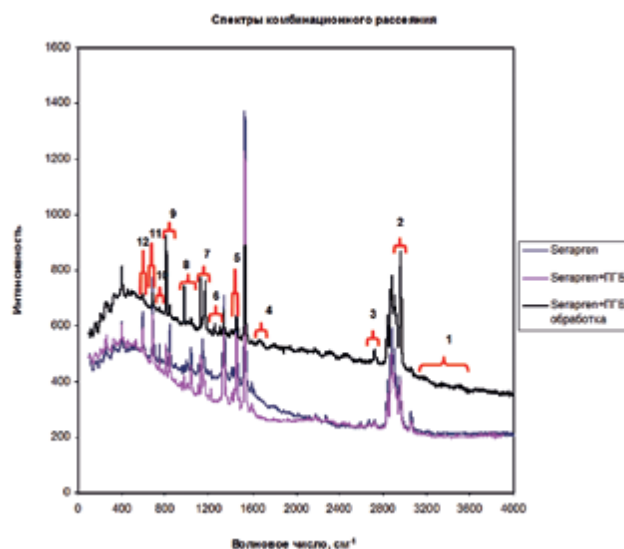


Рисунок 4. Области спектра, иллюстрирующие наиболее заметные изменения после нанесения модифицирующего слоя

При исследовании образцов полипропиленовой нити без модификации были обнаружены скелетные колебания, характерные для химического состава полипропилена, с волновым числом 748 см^{-1} . После модификации шовного материала раствором ПГБ появились волновые пики, характерные для -C-O-C- (841 см^{-1}) и $\text{-CH}_2\text{OH}$ (593 см^{-1}) групп ПГБ (таблица 1).

Наиболее важные изменения в спектре субстрата отображены в новых волновых пиках, которые характерны для OH^- и COO^- – группы гепарина и групп гидролизованного привитого полиметакрилоилхлорида с волновым числом $3150\text{--}3600$ и 1680 см^{-1} соответственно. Также и пики SO_2 (1306 см^{-1}) – сульфамидных,

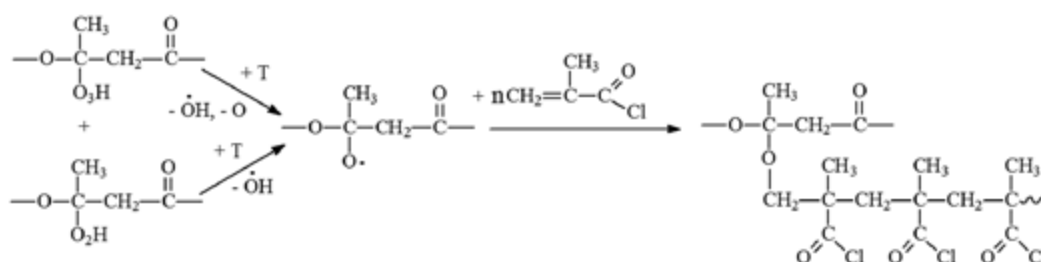


Рисунок 2. Нанесение активного подслоя, имеющего в своем составе хлорангидридные группы

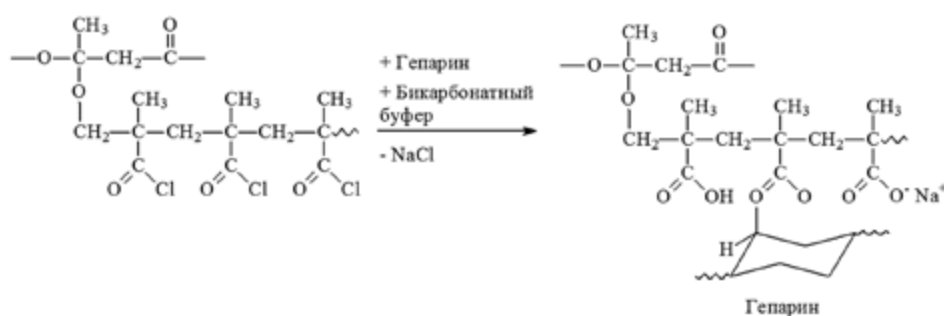


Рисунок 3. Химическая прививка гепарина к подслою

CO–NH– (1254 см⁻¹) – ацетамидных групп гепарина и C–C (973 см⁻¹) – связи циклогексановых колец гепарина свидетельствуют об эффективной прививке гепарина к полимеру (таблица 2).

Таблица 1.

Появление волновых пиков после модификации шовного материала раствором ПГБ

№	Волновое число, см ⁻¹	Возможное соотношение
		Изменения в данных областях спектра комбинационного рассеяния характеризуют закрытие поверхности субстрата привитым продуктом от зондирующего света спектрометра
1	1453	–CH ₂ – – группы полипропилена, ПГБ и полиметакрилоилхлорида
2	1143	–C–O–C– – группы ПГБ
3	841	–C–O–C– – группы ПГБ
4	748	Скелетные колебания полипропилена
5	593	–CH ₂ OH – концевые группы ПГБ

Таблица 2.

Эффективная прививка гепарина к полимеру

№	Волновое число, см ⁻¹	Возможное соотношение
1	3150–3600	ОН – группы гепарина и карбоксильных групп гидролизованного привитого полиметакрилоилхлорида
2	1680	COO– – карбоксилатные группы гепарина и гидролизованного привитого полиметакрилоилхлорида
3	1306	SO ₂ – сульфамидные группы гепарина
4	1254	CO–NH– – ацетамидные группы гепарина
5	1168	SO ₂ – сульфамидные группы гепарина
6	973	C–C – связи циклогексановых колец гепарина

Увеличение интенсивности пиков, характерных для C–H-связи групп –OCH– привитого гепарина, в дополнение к группам ПГБ –OCH₂–, с волновым числом, равным – 2962 см⁻¹, также говорят о химическом присоединении гепарина к покрытию из ПГБ (таблица 3).

Таблица 3.

Химическое присоединение гепарина к покрытию из ПГБ

№	Волновое число, см ⁻¹	Возможное соотношение
1	2962	C–H-связи групп –OCH– привитого гепарина в дополнение к группам ПГБ –OCH ₂ –
2	809	групповые C–C–O-связи гидроксильных групп гепарина в дополнение к аналогичным концевым группам ПГБ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный способ химической модификации хирургического шовного материала замечателен тем, что нанесенный гепарин прочно закрепляется на поверхности полимера. Нанесенное покрытие не бу-

дет слущиваться и вымываться естественной средой организма, а гепарин будет высвобождаться по мере биodeградации полимера достаточно длительный период времени, оказывая необходимый терапевтический эффект.

Полученные результаты доказали, что нанесение гепарина на покрытие ПГБ поверхность полипропиленовой хирургической нити с помощью химической прививки позволяет прочно закрепить гепарин на поверхности полимера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.М. Мохов. Этапы разработки новых биологически активных шовных материалов и результаты их применения в экстренной абдоминальной хирургии // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2009. № 6. С. 25–28.
2. Г.М. Патахов, М.Г. Ахмадулинов. Биоактивные шовные материалы в гепатологии // Фундаментальные исследования. 2011. № 7. С. 124–126.
3. S.I. Shkurenko, T.S. Idiatulina. Nikant Biologically Active Surgical Sutures // Fibre Chemistry. 2002. V. 34. Is. 5. P. 346–349.
4. А.С. Князюк, А.Н. Лызинов, Д.А. Зиновкин и др. Влияние нового антибактериального шовного материала на течение раневого процесса в эксперименте // Проблемы здоровья и экологии. 2015. № 1(43). С. 48–53.
5. J.-C. Harnet, E. Le Guen, V. Ball et al. Antibacterial protection of suture material by chlorhexidine functionalized polyelectrolyte multilayer films // J. Mater Sci.: Mater Med. 2009. № 20. P. 185–193.
6. Q. Bingsong, M. Weizhong, Z. Rong, T. Mei, Z. Jianhao, Z. Zhengang. Microwave-assisted Immobilization of Heparin onto Polyurethane Surface for Improving Blood Compatibility // Journal of Wuhan University of Technology. 2014. V. 29. Is. 5. P. 1071–1077.
7. S. Murugesan, J. Xie, R. Linhardt. Immobilization of Heparin: Approaches and Applications // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2008. № 8. P. 80–100.
8. Патент СССР № 1077251. Способ получения гемосовместимых полимерных материалов / Платэ Н.А., Бурдыгина И.Ф., Чупов В.В., Валуев Л.И., Часовников И.А., Кабанов В.Я.; опубл. 1982.
9. Т.Н. Акентьева, В.В. Борисов, Ю.А. Кудрявцева. Влияние покрытия на основе полиоксикалатов на свойства шовного материала // Ангиология и сосудистая хирургия. 2014. Т. 2. № 4. С. 42–47.
10. Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов, А.В. Горева. Структура и физико-химические свойства гибридного композита полигидроксидобутират/воластонит // Перспективные материалы. 2009. № 1. С. 43–50.
11. А.Х. Купцов, Г.Н. Жижин. Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров. Справочник. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2001. 656 с.
12. P. Adapa, C. Karunakaran, L. Tabil, G. Schoenau. Potential Applications of Infrared and Raman Spectromicroscopy for Agricultural Biomass // Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Manuscript 1081. 2009. V. 9. P. 1–25.
13. D. Lin-Vien, N. Colthup, W. Fateley and J. Graselli. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. – Boston: Academic Press, 1991. 503 p.
14. G. Socrates. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 3rd ed. – NY: John Wiley & Sons, 2001. 347 p.
15. J. Workman Jr. The Handbook of Organic Compounds. Three-Volume Set. Volume 1–3: NIR, IR, R, and UV-Vis Spectra Featuring Polymers and Surfactants. – Boston: Academic Press, 2000. 1493 p.
16. В.Е. Рыкалина, С.И. Шкуренок, Е.В. Монахова и др. Совершенствование функциональных свойств хирургических нитей методом поверхностной модификации полимерными композициями // Химические волокна. 2011. № 1. С. 57–62..