

ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЭМБОЛИЗИРУЮЩИХ НОСИТЕЛЕЙ

Е.В. Коверзанова – ст. науч. сотр.¹

С.В. Усачев – к.х.н., ст. науч. сотр.¹

К.З. Гумаргалиева – д.х.н., профессор, зав. лабораторией

М.И. Титова – д.м.н., профессор²

Л.С. Коков – член-корр. РАМН, зав. отд.РХМБил³

¹Учреждение Российской академии наук
Институт химической физики им. Н.Н. Семенова,

²ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздравсоцразвития РФ,

³НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Москва

Введение

С середины 70-х годов прошлого века неуклонно растет интерес к полимерам биомедицинского назначения, широко и успешно используемым в медицине и фармакологии, которые должны удовлетворять ряду общих требований (безвредность для организма, устойчивость к воздействию биологической среды и др.) [1, 2]. Одни из представителей большого класса таких полимеров – трехмерные (сетчатые) гидрогели на основе 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА). Их основные преимущества – большая пористость, набухаемость в водных растворах (до 65%), нетоксичность, эластичность и устойчивость к воздействию внешней биологической среды [3]. Именно эти свойства определяют высокую биосовместимость материала с тканями организма, что позволяет использовать его для целенаправленной окклюзионной эмболизации сосудов [4].

Так, эмболизирующие средства (ЭС) из поли-ГЭМА с успехом применяют при лечении некоторых новообразований (ишемизация опухолей печени, почки, миоматозных узлов и т. п.). Высокая пористость гидрогелей на основе

поли-ГЭМА положительно влияет на совместимость материала с тканями организма и способствует росту соединительной фиброзной ткани в порах гидрогеля, что приводит к устойчивой фиксации в кровеносном сосуде [3].

Другое несомненное преимущество пористости – возможность использования гидрогелевых эмбол как носителей лекарственных средств с регулируемым выходом лекарства [5]. Традиционно в качестве сшивающего агента используют этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМА). Возможность применения разных по качественному или количественному составу сшивающих агентов дает возможность варьировать физико-химические свойства получающихся синтезированных гидрогелей при сохранении функциональных характеристик.

С целью расширения номенклатуры ЭС на основе поли-ГЭМА для использования при различных патологиях с возможностями регулирования скоростей организации тромба, врастания капилляров в объеме полимерного материала, а также введения лекарственного препарата были разработаны условия поли-

меризации поли-ГЕМА с применением в качестве сшивающего агента триэтиленгликольдиметакрилата (ТриЭГДМА) и тетраэтиленгликольдиметакрилата (ТетраЭГДМА).

Создание и использование в клинической практике эндопротезов-имплантатов в качестве ЭС на основе поли-ГЕМА прежде всего требует разработки простых, доступных и надежных методов оценки биосовместимости полимерного материала с клетками крови, а также изучения генеза его гемостатического эффекта. Анализ изменений показателей донорской крови при воздействии синтезированных поли-ГЕМА с различными типами сшивающих агентов должен включать обязательную программу исследования – определение количества лейкоцитов, эритроцитов, уровня Hb и тромбоцитов и оценку степени гемолиза крови.

Целью работы было исследование возможности применения в качестве сшивающего агента ТриЭГДМА и ТетраЭГДМА, а также изучение морфологической структуры полученных полимеров, их биосовместимости и гемостатического эффекта.

Материалы и методы

Цилиндрические эмболы синтезировали в водном растворе под действием иницирующей системы: персульфат аммония – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин при 20⁰ С [6], при постоянном соотношении мономер – сшивающий агент (СА) 46,7 : 1 моль/моль. В качестве СА использовали ЭГДМА, ТриЭГДМА и ТетраЭГДМА. Полимеризацию проводили в трубках длиной 12–15 см и диаметром 1 мм. По окончании полимеризации гидрогелевые заготовки разрезали на части длиной 1 см и промывали при 80⁰ С в течение нескольких часов с заменой воды для удаления непрореагировавшего мономера. Отмытые эмболы помещали в стерильные емкости с изотоническим раствором хлорида натрия и хранили при комнатной температуре до дальнейших исследований.

Для изучения морфологии поверхности и пористой структуры цилиндрических эмбол использовали сканирующий электронный микроскоп фирмы «Jeol» YSM-5300 LV (Япония). Контрастирование образцов проводили напылением золотом на установке «Jeol» YFC-1100 E Ion sputtering devise. Толщина напыления – 40Е.

Для оценки сохранности клеток крови к 0,1 мл

донорской крови добавляли 0,1 мл раствора, в котором хранились цилиндрические эмболы (0,08 г ПМ в 10 мл). В окрашенных мазках крови по Романовскому – Гимзе изучали морфологию белой крови, эритроцитов и тромбоцитов, характеризующих степень сохранности и интактности крови при ее контакте с ПМ. Повышение уровня гемолиза (> 20%), лейкопения, анемия и резкая тромбоцитопения, а также признаки морфологического повреждения клеток крови (лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов) – показатель биологической несовместимости ПМ с кровью, исключающий возможность его применения в клинической практике [3].

Результаты и обсуждение

Процесс трехмерной полимеризации имеет микрогетерогенный характер [7]. Первичные гелевые структуры появляются уже на самых ранних стадиях полимеризации, причем концентрация таких микрогелей с некоторого момента перестает увеличиваться.

Реакционная система состоит из набора локальных микрореакторов, в которых процесс полимеризации (ППМ) находится на разных стадиях. Одновременно с процессом сшивки и ППМ в микрореакторах протекают и циклизация, замыкание на себя свободных реакционных групп мономера. ППМ происходит на поверхности отдельных микрореакторов (глобул) путем наращивания новых слоев. В результате укрупнения глобул происходят их соприкосновение и агрегация. Дальнейший ППМ протекает в зонах соприкосновения и в пространстве вне этих зон.

Совокупность процессов сополимеризации, циклизации и агрегации с образованием новой фазы определяет структурные и морфологические особенности образующихся ЭМ. Формирующаяся полимерная структура имеет неоднородное строение, в которой присутствуют как плотносшитые глобулярные образования, так и слабосшитые гибкие межглобулярные связи.

Для эмболизирующего материала (ЭМ) – поли-ГЭМА-ЭГДМА размер глобул колеблется в диапазоне 2–10 мкм, упаковка рыхлая, линейно-цепочечные агрегаты глобул организуют многослойные тяжи, приводящие к организации макрочаеистой структуры. В свою очередь последние создают макропоры размером до нескольких десятков мкм (рис. 1).

В ЭМ на основе поли-ГЭМА-ТриЭГДМА

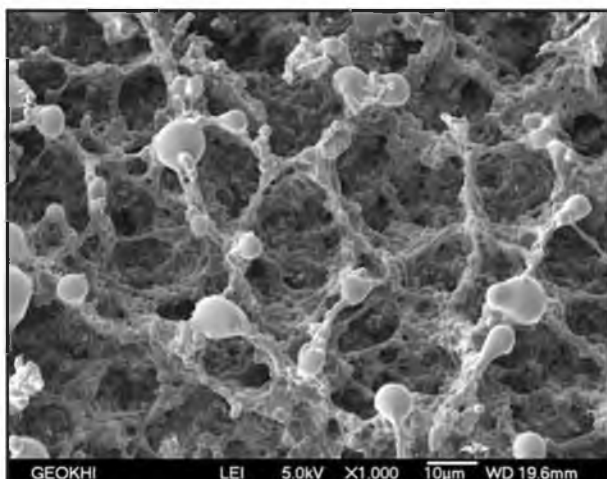


Рис. 1. Структура поли-ГЭМА-ЭГДМА

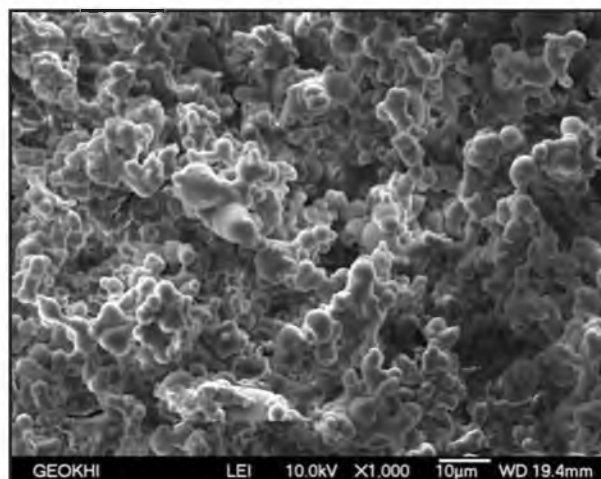


Рис. 2. Структура поли-ГЭМА-триЭГДМА

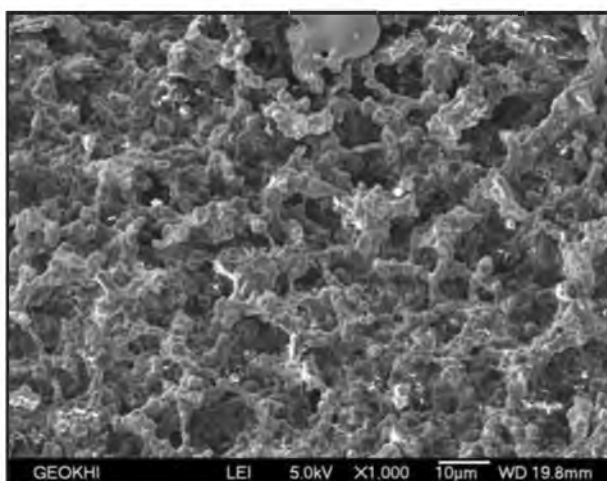


Рис. 3. Структура поли-ГЭМА-тетраЭГДМА

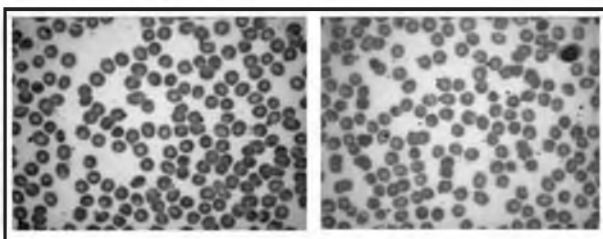


Рис. 4. Структура поли-ГЭМА-триЭГДМА Морфология клеток донорская крови

практически отсутствуют межглобулярные связи, упаковка более плотная, размер глобул варьируется в интервале 2–10 мкм (рис. 2). Структура поли-ГЭМА-ТетраЭГДМА еще более упорядоченная, межглобулярные связи отсутствуют, наблюдаются «ненагруженные» цепочечные агрегаты. Размер глобул – 1–2 мкм (рис. 3). Как и в случае с поли-ГЭМА-ЭГДМА наблюдается тенденция к организации крупноячейной структуры, но без объемных пустот.

Ранее было показано [2, 8]:

- при контакте донорской крови с поли-ГЭМА-ЭГДМА после серии отмывок от остаточного количества низкомолекулярных веществ ПМ вызывает минимальное повреждение клеток крови и пригоден по этим показателям для эндоваскулярного использования;
- уровень Hb изменялся в пределах $11,5 \pm 12$ г/л;
- гемолиз крови не превышал 11 мг%;
- количество эритроцитов – не ниже $3,5 \times 10^{12}$ л⁻¹. В среднем это снижение составляло 10–15% по отношению к уровню эритроцитов донорской крови. При этом не наблюдалось морфологических изменений эритроцитов;
- количество лейкоцитов снижалось в пределах 15–18% , то есть от $(6,2 \pm 0,4) \times 10^9$ л⁻¹ до $(5,1 \pm 0,3) \times 10^9$ л⁻¹, $p < 0,05$;
- морфологическая сохранность клеток белой крови (в среднем 4 артефага на 200 клеток).

Были сделаны микрофотографии исходной донорской крови (рис. 4) и крови после взаимодействия со средой, в которой хранились ЭС (рис. 5–7). На них представлены сохраненные клетки крови, в основном эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. При взаимодействии донорской крови с жидкой средой поли-ГЭМА-ЭГДМА нет признаков гемолиза, морфология элементов крови хорошая, присутствуют небольшие агрегаты тромбоцитов, отдельные нейтрофильные лейкоциты, эритроциты и их агрегаты (рис. 5). При этом контакт жидкой среды поли-ГЭМА-ЭГДМА с донорской кровью продолжал вызы-

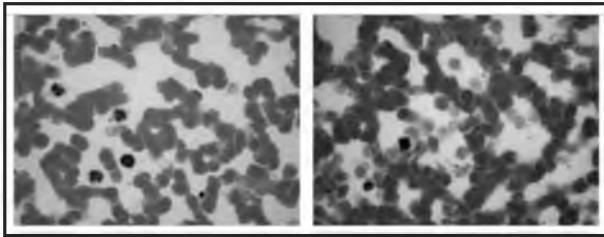


Рис. 5. Морфология клеток после взаимодействия со средой, в которой хранилось эмболизирующее средство поли-ГЭМА-ЭГДМА

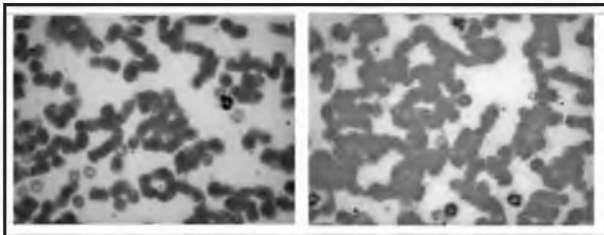


Рис. 6. Морфология клеток после взаимодействия со средой, в которой хранилось эмболизирующее средство поли-ГЭМА-ТриЭГДМА

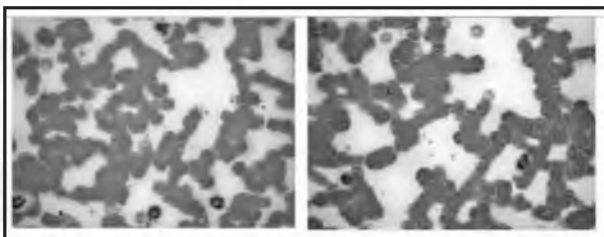


Рис. 7. Морфология клеток после взаимодействия со средой, в которой хранилось эмболизирующее средство поли-ГЭМА-ТетраЭГДМА

вать тромбоцитопению за счет повышенного формирования тромбоцитарных агрегатов, что отражает специфическое свойство поли-ГЭМА, связанное с выделением остаточного мономера в концентрации 10^{-5} г/г, ускоряющего процесс агрегации тромбоцитов [2, 8]. Их количество снижалось в среднем в 3 раза – с $(22,1 \pm 0,5) \times 10^9$ л⁻¹ до $(7,5 \pm 0,3) \times 10^9$ л⁻¹. Таким образом, эмболы из поли-ГЭМА-ЭГДМА представляют собой гемостатически активный материал, который первично активизирует адгезивно-агрегативные свойства тромбоцитов посредством десорбции остаточного мономера в указанной концентрации. Активация факторов плазменного гемостаза носит вторичный характер и развивается на 1–3-й день постэмболизационного периода, сохраняется до 10–15 дней и зависит от скорости и объема введенного эмбологенного материала в сосудистое русло при рентгеноэндоваскулярной окклюзии.

Испытания вновь синтезированных ЭС с сшивающими агентами ТриЭГДМА и ТетраЭГДМА по предлагаемой схеме показало такие результаты.

Контакт донорской крови с жидкой средой, в которой хранились эмболы из поли-ГЭМА-ТриЭГДМА, также вызывает минимальное повреждение клеток крови, сохранность элементов крови хорошая (рис. 6).

В поле зрения попадают лейкоциты (нейрофильные лейкоциты), палочкоядерный нейтрофил, макроформа тромбоцита. Уровень Hb изменялся в этих испытаниях в пределах $11,6 \pm 12$ л⁻¹. Гемолиз крови не превышал 10 мг%. Количество эритроцитов не снижалось $< (3,35 \pm 0,6) \times 10^{12}$ л⁻¹ и в среднем составляло 10–14% по отношению к уровню эритроцитов донорской крови. Признаков морфологических повреждений клетки также не наблюдалось.

Количество лейкоцитов снижалось в пределах 15–20%, то есть от $(6,2 \pm 0,6) \times 10^9$ л⁻¹ до $(5 \pm 0,4) \times 10^9$ л⁻¹, $p < 0,05$. Морфологическая сохранность белой крови была хорошей. Повышенное формирование тромбоцитарных агрегатов вызывает ускоренную тромбоцитопению, соответственно количество тромбоцитов снижалось в $1,5 \pm 2,5$ раза – от $(21,5 \pm 0,7) \times 10^9$ л⁻¹ до $(8,6 \pm 0,2) \times 10^9$ л⁻¹, $p < 0,01$.

При этом в отличие от поли-ГЭМА-ЭГДМА наблюдалось повышение агрегационных свойств эритроцитов, которые мгновенно организовались в микро- и макроагрегаты, к которым в свою очередь могли адгезировать лейкоциты и тромбоциты.

При контакте с жидкой средой, в которой хранились эмболы из поли-ГЭМА-ТетраЭГДМА с донорской кровью, наблюдалось незначительное повреждение клеток крови (артефакты не были выявлены), сохранность форменных элементов была удовлетворительной (рис. 7).

В поле зрения наблюдаются плотно организованные агрегаты эритроцитов, нейтрофильные лейкоциты, лейкоцит с примыкающим к его поверхности тромбоцитом. Характерная особенность при этом контакте – примыкание отдельных тромбоцитов или их групп к агрегатам эритроцитов. Уровень Hb изменялся в пределах от 11 ± 12 л⁻¹, гемолиз крови не превышал 12–13 мг%. Количество эритроцитов не снижалось $< (3,1 \pm 0,4) \times 10^{12}$ л⁻¹ и в среднем составляло 15–16% по отношению к уровню эритроцитов донорской крови. Кроме того, наблюдалось усиление агрегационной активности эритроцитов, что выражалось в органи-

Таблица 1.

**Изменение клеточных элементов донорской крови
при взаимодействии с ЭМ в зависимости от СА**

Элемент крови	СА		
	ЭГДМА	ТриЭГДМА	ТетраЭГДМА
Гемоглобин (г/л)	11,5 ± 12,0	11,6 ± 12,0	11,0 ± 12,0
Гемолиз (мг%)	не >11	не > 10	не > 12–13
Эритроциты (г/л)	не < 3,51 × 10 ¹² снижение на 10–15%	(3,35 ± 0,6) × 10 ¹² снижение на 10–14%	(3,1 ± 0,4) × 10 ¹² снижение на 15–16%
Морфологическое изменение эритроцитов	не вызывает	не вызывает	морфологическая сохранность белой крови удовлетворительная
Лейкоциты (г/л)	от (6,2 ± 0,4) × 10 ⁹ до (5,1 ± 0,3) × 10 ⁹ снижение на 15–18%	от (6,27 ± 0,6) × 10 ⁹ до (5,0 ± 0,4) × 10 ⁹ снижение на 15–20%	от (6,1 ± 0,5) × 10 ⁹ до (5,05 ± 0,3) × 10 ⁹ снижение ≈ 20%
Тромбоциты (г/л)	от (22,1 ± 0,5) × 10 ⁹ до (7,5 ± 0,3) × 10 ⁹ снижение в 3 раза	от (21,5 ± 0,7) × 10 ⁹ до (8,6 ± 0,2) × 10 ⁹ снижение в 2,5 раза	от (21,5 ± 6,7) × 10 ⁹ до (7,1 ± 0,3) × 10 ⁹ снижение в 3 раза

Примечание: ЭГДМА – этиленгликольдиметакрилат;
ТриЭГДМА – триэтиленгликольдиметакрилат;
ТетраЭГДМА тетраэтиленгликольдиметакрилат;
ЭМ – эмболизирующий материал; СА – сшивающий агент.

зации макроагрегатов в виде эритроцитарного сгустка – тромба. Количество лейкоцитов снижалось в пределах 20%, то есть от $(6,1 \pm 0,5) \times 10^9$ л⁻¹ до $(5,05 \pm 0,3) \times 10^9$ л⁻¹, $p < 0,05$. Были собраны данные по изменению клеточных элементов донорской крови при контакте с ЭМ, синтезированного с разными сшивающими агентами (табл. 1).

Морфологическая сохранность клеток белой крови тоже была удовлетворительной. По-видимому, повышенное формирование тромбоцитарных агрегатов вызывает активацию тромбоцитопении с понижением количества тромбоцитов в 3 раза – с $(21,5 \pm 0,7) \times 10^9$ л⁻¹ до $(7,1 \pm 0,3) \times 10^9$ л⁻¹.

Следует отметить, что в генезе гиперкоагуляционной активности при взаимодействии поли-ГЭМА-ТриЭГДМА и поли-ГЭМА-ТетраЭГДМА специфичным можно

считать повышение агрегативных свойств эритроцитов с образованием макроагрегатов и эритроцитарных сгустков с участием тромбоцитов, что моментально увеличивает площадь окклюзии в сосуде.

Заключение

Результаты исследования показывают, что можно использовать в качестве СА ТриЭГДМА и ТетраЭГДМА для получения ЭМ с регулярной надмолекулярной структурой и усиленным гемостатическим эффектом при сохранении базового свойства – биосовместимости, а наличие микро- и макропористой структуры различной формы способствует активному переносу масс терапевтических средств, что может повысить их лечебные и гемостатические свойства. ■

Список литературы

1. Полимеры медицинского назначения. Под ред. Сэноо Манабу. М.: Медицина. 1981; 248.
2. Gumargalieva K.Z., Zaikov G.E. Biodegradation and Biodeterioration of Polymer. N.-Y.: Nova Science Publishers. 1998: 409.

3. Horak D., Gumargalieva K.Z., Zaikov G.E. Hydrogel in endovascular embolization. Chemical reaction in liquid and solid phase. N.-Y.: Nova Science Publishers. 2003: 11–59.
4. Horak D. et al. Poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) emboli with increased haemostatic effect for correction of haemorrhage of complex origin in endovascular surgery of children. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 2008; 19: 1265–1274.
5. Koverzanova E., Usachev S., Gumargalieva K., Kokov L. Possibility of using embolizing preparation derived from poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA) for chemoembolization. *Chemistry & Chemical Technology.* 2009; 3 (1): 73–76.
6. Адамян А.А., Коков Л.С., Титова М.И. и др. Средство для эмболизации сосудов. Патент РФ № 61120, 2007.
7. Королев Г.В., Могилевич М.М. Трехмерная радикальная полимеризация. Сетчатые и гиперразветвленные полимеры. С.-Пб.: ХИМИЗДАТ. 2006; 344.
8. Horak D. et al. Poly-(HEMA)-based embolic material in endovascular surgery of liver. *Polymer in medicine.* 2002; 32 (3–4): 48–62.

Адрес для корреспонденции:

Коверзанова Елена Витальевна
и Гумаргалиева Клара Зенноновна
Тел.: (495) 939-72-76 (раб.)
E-mail: stusl@chph.ras.ru