

УДК: 616.13-005.6-089:615.273.53

ВЫБОР ГЕПАРИНА ДЛЯ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ СОСУДИСТЫХ БИОПРОТЕЗОВ

И. Ю. ЖУРАВЛЕВА, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА, М. В. НАСОНОВА,
В. В. БОРИСОВ, Л. С. БАРБАРАШ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, Россия

Цель. Оценить количественные параметры иммобилизации на биоматериале нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов и их влияние на гемосовместимость протезов в эксперименте.

Материалы и методы. Были использованы ксеноартерии, консервированные диглицидиловым эфиром этиленгликоля. Модификацию образцов проводили в растворе нефракционированного гепарина (НПО «Синтез», Россия) и низкомолекулярного эноксапарина натрия «Клексан» (Санофи, Франция). Количество иммобилизованного гепарина оценивали тремя независимыми методами. Влияние гепарина на гемосовместимость биоматериала исследовали *in vitro*.

Результаты. Количество эноксапарина, связанного с биоматериалом, определили достоверно меньше, чем нефракционированного гепарина. В то же время этого количества достаточно для сглаживания рельефа поверхности материала и снижения максимума агрегации тромбоцитов на 24 %. Модификация биоматериала как нефракционированным, так и низкомолекулярным гепарином достоверно уменьшает адсорбцию белков крови.

Заключение. Эноксапарин натрия наиболее перспективен для антитромботической модификации эпоксиобработанных биопротезов артерий.

Ключевые слова: тромбоз, биопротезы артерий, антитромботическая модификация, гемосовместимость.

CHOICE OF HEPARIN FOR VESSEL BIOGRAFTS ANTITHROMBOTIC TREATMENT

I. Y. ZHURAVLEVA, Y. A. KUDRYAVTSEVA, M. V. NASONOVA,
V. V. BORISOV, L. S. BARBARASH

Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases» under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, Russia

Purpose. Extra treatment of biomaterial with heparin is a promising method of artery xenograft hemocompatibility increase.

The study was aimed at experimentally assessing quantitative parameters of unfractionated and low molecular weight heparins immobilization on the biomaterial and their impact on graft hemocompatibility.

Materials and methods. Xenoarteries treated with ethylene glycol diglycidyl ether were used. Unfractionated heparin (UFH) by NPO «Synthet» (Russia) and low molecular weight heparin (LMWH) – enoxaparin sodium by «Clexane» (France) were used to treat the biomaterial. The amount of immobilized heparins was assessed using three independent methods. The impact of heparin on biomaterial hemocompatibility was assessed *in vitro*.

Results. The amount of immobilized enoxaparin was significantly lower than that of UFH. However, this amount of LMWH was enough for having a smoothing effect on xenografts surface and decreasing platelet aggregation by 24 %. Biomaterial treatment with both UFH and LMWH significantly decreased blood protein adsorption.

Conclusion. Based on the obtained data we can suggest that enoxaparin sodium has a greater potential for antithrombotic modification of epoxy-treated arterial grafts.

Key words: biografts, thrombosis, antithrombotic treatment, heparin, hemocompatibility.

Введение

В России ежегодно увеличивается количество реконструктивных операций на артериях нижних конечностей [8]. Для восстановления кровотока используют различные сосудистые заменители [3, 5], однако тромбоз протеза остается одним из ведущих осложнений протезирования сосудов [3, 4, 10].

Непосредственные и отдаленные результаты реконструктивных операций во многом определяются выбором пластического материала. Одним из методов повышения гемосовместимости кардиоваскулярных протезов является дополнительная модификация материала протеза прямым антикоагулянтом – гепарином [2,11,15]. В настоящее время в клинике, помимо нефракционированного гепарина

(НФГ), широко применяют низкомолекулярные гепарины (НМГ) [9,10]. Более высокая антикоагулянтная эффективность низкомолекулярных гепаринов объясняется тем, что они блокируют процесс свертывания крови на более ранней стадии, преимущественно ингибируя фактор Ха, а не Па, в отличие от НФГ [7, 14].

Кроме того, НФГ и НМГ обладают различной длиной сульфатированных гликозаминогликанов и, как следствие, различной молекулярной массой [14]. Данные параметры могут оказывать влияние на количественные и качественные характеристики иммобилизации гепарина, которые определяют гемосовместимые свойства биоматериала и в конечном итоге отдаленные результаты оперативного вмешательства.

Цель

Оценить количественные параметры иммобилизации на биоматериале нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов и их влияние на гемосовместимость сосудистых биопротезов в эксперименте.

Материалы и методы

Внутреннюю грудную артерию крупного рогатого скота консервировали раствором диглицидилового эфира этиленгликоля (ДЭЭ) [12]. Для антитромботической модификации биоматериала использовали нефракционированный гепарин (НПО «Синтез», Россия) и низкомолекулярный гепарин – эноксапарин натрия («Клексан») (Aventis, Франция). Модификацию образцов биоматериала выполняли в растворе антикоагулянта в течение 16 ч [12]. В качестве контроля использовали немодифицированные сегменты ксеноартерий, консервированные ДЭЭ.

Для количественной оценки иммобилизованного гепарина применяли три метода. Одним из наиболее простых и легко воспроизводимых является способ, разработанный проф. С. П. Новиковой (НЦССХ им. А. Н. Бакулева, Москва) [4]. После антитромботической модификации каждый образец биоматериала отмывали от несвязанного гепарина и заливали раствором о-толуидинового синего (ТС) с концентрацией 0,01 г/л. Образцы сорбировали краситель 24 ч, после чего в опытных ($n = 60$) и контрольных пробах ($n = 20$) определяли оптическую плотность раствора красителя на спектрофотометре UV/Vis Ultraspec Plus (LKB-Pharmacia) ($\lambda = 630$ нм). Количество гепарина рассчитывали по формуле [84]:

$$A = \left(\frac{D_{TC} - D_{TP}}{m_{TP}} - \frac{D_{TC} - D_K}{m_K} \right) \cdot \frac{V}{\varepsilon} \cdot 1000,$$

где A – концентрация гепарина (мкг/г), D_{m_c}, D_{m_n}, D_K – оптическая плотность раствора ТС опытной и контрольной пробы соответственно, V – объем пробы (мл), m_{TP} и m_K – массы опытного и контрольного образца (г), ε – коэффициент экстинкции, равный:

$$\varepsilon = \frac{D}{c \cdot l},$$

где D – оптическая плотность, c – концентрация раствора ТС (г/л), l – длина оптического пути (см).

Второй метод определения количества гепарина основан на использовании радиоактивной метки. Высокая чувствительность и специфичность изотопных индикаторов позволяют наиболее точно проследить за ними в сложных процессах [6]. Для проведения эксперимента использовали лиофилизированные и меченные тритием (^3H) гепарины (активность 0,4 mCi/ml), полученные в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). После инкубации в растворе меченого $[\text{H}]^{3+}$ гепарина образцы биоматериала ($n = 45$) трижды отмывали в дистиллированной воде, затем растирали в фарфоровой ступке с добавлением кварцевого песка. Далее гомогенную смесь соединяли с дистиллированной водой, после чего 500 мкл супернатанта смешивали с 4 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8. Детекцию общей радиоактивности проб измеряли на счетчике «Mini-Beta» (Pharmacia/LKB) с перерасчетом на сухую массу образца.

Третий способ определения количества гепарина основан на разности содержания серы в образцах биоматериала до и после модификации. Образцы опытной ($n = 45$) и контрольной ($n = 15$) групп высушивали в термостате ТС-80 при $t = 37$ °С до постоянного веса. Затем навески биоматериала сжигали в анализаторе SC-432 (LECO, США), при $t = 1350$ °С в токе кислорода с дальнейшим определением количества серы в продуктах сгорания методом ИК-сорбции. Дополнительно сжигали навеску лиофилизованного гепарина для дальнейшего расчета концентрации иммобилизованного гепарина.

Оценку гемосовместимых свойств ксенососудов проводили *in vitro*. Для этого образцы всех групп ($L = 6$ см, $d = 4$ мм) закрепляли на штуцерах магистралей многоканального перистальтического насоса 2054U/CA24 (Watson – Marlow, Великобритания). Магистралы с фиксированными образцами заполняли свежей цитратной донорской кровью. Скорость циркуляции крови составила 0,04 л в мин при температуре 37 °С, время контакта зависело от метода исследования.

Изучение агрегационной активности тромбоцитов проводили при помощи анализатора АРАСТ 4 (American Labor, Германия). Длительность контакта с кровью составила 5 мин. Кровь от каждого образца собирали в отдельную пластиковую пробирку. Агрегацию тромбоцитов индуцировали раствором АДФ (1,25 мкг/мл). Измеряли скорость агрегации тромбоцитов V (%/min), максимум МАХ (%) и длительность агрегации T (с). В качестве контрольных служили показатели адгезии тромбоцитов, не контактировавших с биоматериалом.

Для оценки количества протеинов, сорбированных на образцах, выполняли их десорбцию раствором мочевины. Время контакта с кровью составило от 5 до 90 мин. Полученные растворы подвергали диализу против 0,9 % р-ра NaCl, после чего растворы концентрировали. Суммарное количество сорбированных белков крови оценивали по методу Бредфорда при помощи спектрофотометра UV/Vis Ultraspec Plus (LKB-Pharmacia) ($\lambda = 595$ нм). Количество белка рассчитывали по формуле: $C = KV$, где C – количество белка в пробе в мкг, K – концентрация белка, определяемая по калибровочной кривой (мкг/мл), V – объем пробы белка (мл).

Рельеф поверхности ксеноартерий до и после модификации гепарином оценивали методом сканирующей электронной микроскопии (S3400N (Hitachi, Япония)).

Обработку результатов проводили общепринятыми методами статистики при помощи программы «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., USA). Все данные представлены как средние значения (M) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$). Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке количества гепарина в реакции с ТС была отмечена максимальная сорбция артериями НФГ – $6,64 \pm 0,96$ мкг/мг сухой ткани (рис. 1), что в два раза превышает показатель сорбции низкомолекулярного эноксапарина натрия – $3,58 \pm 0,54$ мкг/мг ($p < 0,05$). Результаты, полученные с применением радиоактивной метки (3H) в отношении НФГ, соответствуют данным, полученным при использовании метода с ТС. Вместе с тем количество иммобилизованного эноксапарина на 52 % превышает результат, полученный при использовании толуидинового метода ($p < 0,05$). Следует признать, что результаты, полученные с применением радиоактивной метки, более корректны, поскольку применение изотопных индикаторов позволяет максимально точно измерить общее количество иммобилизованного вещества [6], в данном случае – гепарина.

Содержание гепарина можно определить по количеству серы, содержащейся в молекуле антикоагулянта в составе сульфо- и сульфатированных аминокислот. В тканях животного происхождения также содержится до 0,3 % серы, которая входит в структуру серосодержащих аминокислот – метионина, цистина и цистеина [1]. При исследовании артериальных сегментов было показано, что количество иммобилизованного гепарина, рассчитанное по содержанию серы, практически совпадает ($p > 0,05$) с результатами, полученными при связывании антикоагулянта с ТС. В группе образцов, модифицированных эноксапарином, показатели были достоверно ($p < 0,05$) меньше, как и при использовании метода с ТС.

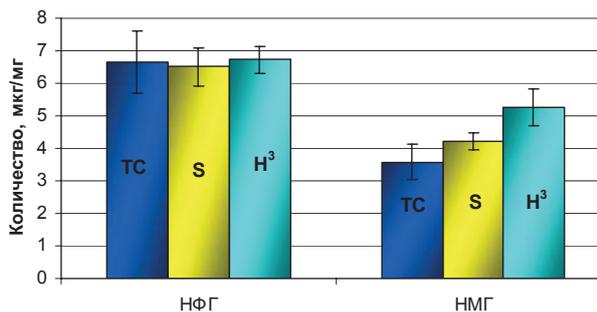


Рис. 1. Количество иммобилизованного гепарина (НФГ) и эноксапарина натрия (НМГ) в зависимости от метода определения: ТС – толуидиновый синий, S – по количеству серы, H³ – радиоактивный метод

Более высокое содержание низкомолекулярного гепарина, обнаруженное с применением радиоактивной метки, возможно, обусловлено особенностями структуры молекулы эноксапарина. Известно, что толуидиновый синий реагирует с карбоксильными и сульфогруппами гликозаминогликанов [16]. Нефракционированный гепарин содержит в структуре две карбоксильные и три сульфогруппы, что в сумме составляет пять групп, взаимодействующих с красителем. В структуре низкомолекулярного эноксапарина количество данных групп на 20–25 % меньше [14], поэтому метод, основанный на реакции ТС с карбоксильными и сульфогруппами, возможно, не позволяет оценить истинное количество эноксапарина.

Оценивая перспективность исследуемых антикоагулянтов для антитромботической модификации биопротезов, следует принимать во внимание не только количество иммобилизованного гепарина, но и его влияние на гемосовместимые свойства биопротезов. По литературным данным, НМГ по сравнению с НФГ гораздо эффективнее тормозят каскад свертываемости, блокируя его на уровне фактора Ха, и в меньшей степени активируют тромбоциты [7, 14].

Значительное влияние на гемосовместимые свойства биопротезов оказывает рельеф поверхности биоматериала: чем грубее и неоднороднее рельеф, тем выше его избирательная сорбционная активность в отношении фибриногена и высокомолекулярных иммуноглобулинов, провоцирующих тромбообразование, а также адгезию и активацию тромбоцитов. Луминальная поверхность ксеноартерий, модифицированных различными гепаринами, имеет выраженные визуальные различия. Нефракционированный гепарин формирует линейные упорядоченные структуры, похожие на длинные тяжи, а низкомолекулярный эноксапарин обеспечивает более выраженный эффект сглаживания, образуя ровный «ячеистый» рельеф (рис. 2). Можно предполагать, что эноксапарин образует более компактное, ровное покрытие на поверхности биоматериала благодаря меньшему размеру молекул.

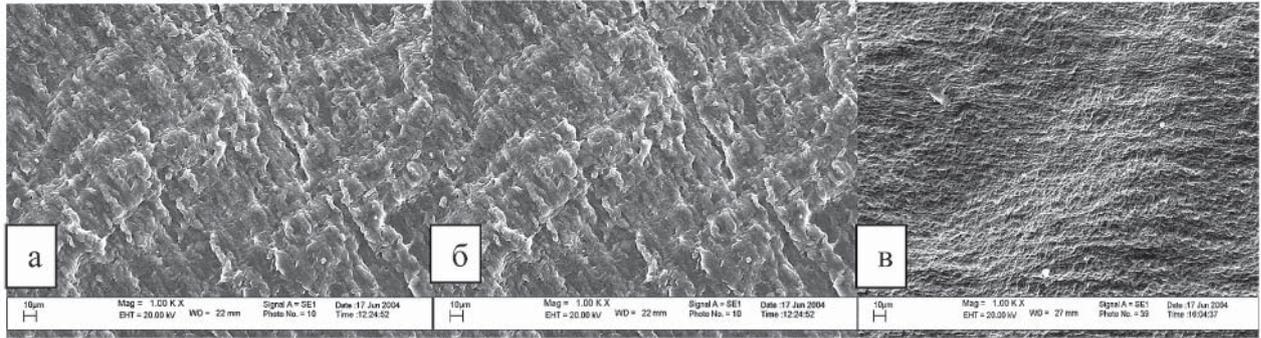


Рис. 2. Электронная сканирующая микроскопия поверхности ксеноартерий:

а – базовая обработка ДЭЭ, б – обработанные ДЭЭ и модифицированные НФГ, в – обработанные ДЭЭ и модифицированные НМГ

Адгезия и морфологические изменения тромбоцитов приводят к активации системы свертывания [13]. Для придания гемосовместимых свойств биоматериалу крайне важно, чтобы модифицированная поверхность оказывала минимальное негативное воздействие на тромбоциты.

Было установлено, что контактная активация тромбоцитов имеет различную степень выраженности в зависимости от способа обработки. Скорость агрегации тромбоцитов достоверно ($p < 0,05$) повышается после контакта с немодифицированными образцами (рис. 3а). В то же время после контакта с гепаринизированными поверхностями данный показатель достоверно ниже ($p < 0,05$). Модификация образцов эноксапарином позволяет максимально снизить скорость агрегации тромбоцитов. Показатель максимума агрегации после контакта с образцами, обработанными НФГ и эноксапарином (рис. 3б), был практически одинаков ($p > 0,05$), но на 24 % ниже ($p < 0,05$) по сравнению с неcodифицированными образцами.

Уменьшение времени достижения максимума агрегации тромбоцитов можно рассматривать, как показатель тромбогенности исследуемого материала: чем «агрессивнее» поверхность, тем ниже данный показатель (рис. 4). В группе образцов, модифицированных эноксапарином натрия, данный показатель был на 10 % выше ($p < 0,05$), чем в группе НФГ. Учитывая показатели скорости агрегации тромбоцитов, можем сказать, что эноксапарин более

эффективен в плане повышения гемосовместимости биопротезов по сравнению с НФГ.

Известно, что при контакте крови с чужеродной поверхностью происходит адсорбция ее белковых компонентов на этой поверхности с последующей активацией системы комплемента и, как следствие, свертывающей системы крови. Таким образом, чем меньше протеинов крови сорбируется на поверхности биоматериала, тем меньше вероятность тромбообразования. Исследование адсорбции белков крови показало, что уже через 5 мин контакта на поверхности биоматериала определяются белковые депозиты. На немодифицированных образцах количество сорбированных протеинов было максимальным – $7,3 \pm 0,8$ мкг/см² (рис. 5). После модификации ксеноартерий гепаринами количество сорбированных белков значительно снижается: в группе НФГ количество белковых отложений уменьшается в 1,7 раза ($p < 0,01$), а при использовании эноксапарина – в 3,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с немодифицированными образцами.

В целом динамика сорбции протеинов свидетельствует, что дополнительная обработка биоматериала гепаринами достоверно ($p < 0,01$) снижает количество сорбированных белков в 1,2–1,4 раза к 90-й минуте наблюдения. Различия при использовании нефракционированного и низкомолекулярного гепарина недостоверны ($p > 0,05$). Полученные результаты показали, что модификация эпоксиобработанного биоматериала как нефракционированным, так и

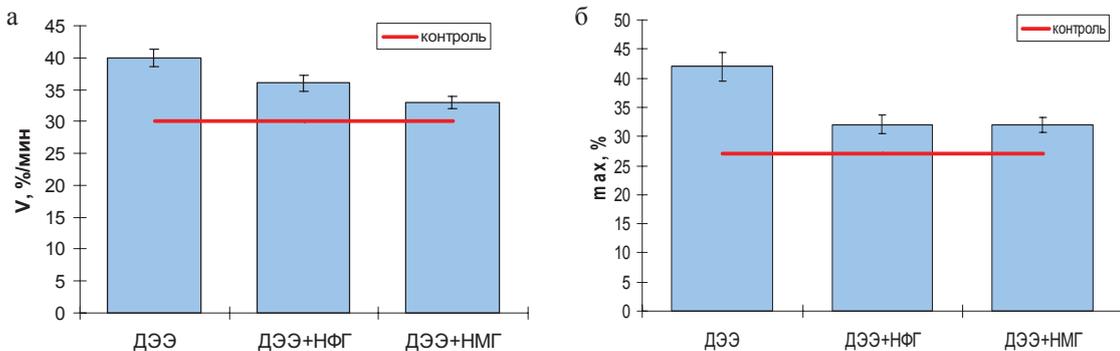


Рис. 3. Показатели активации тромбоцитов после контакта с образцами:

а – скорость агрегации (V/мин), б – максимум агрегации (%)

низкомолекулярным гепарином значительно снижает сорбцию белков крови на его поверхности.

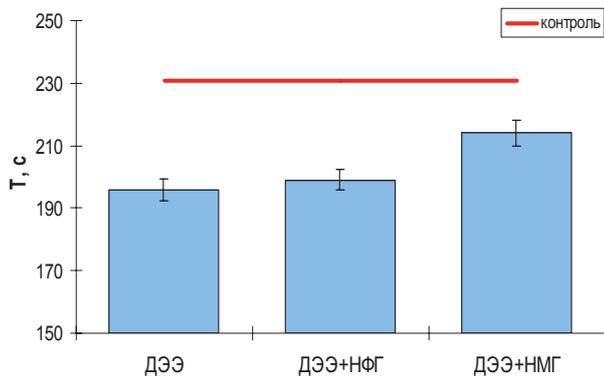


Рис. 4. Время достижения максимума агрегации тромбоцитов после контакта с образцами

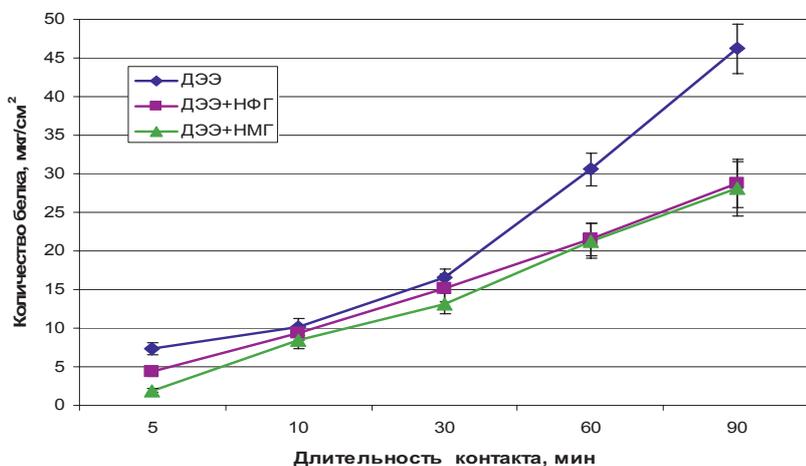


Рис. 5. Количество сорбированных белков крови на образцах ксеноартерий, обработанных различными способами.

НФГ – нефракционированный гепарин, НМГ – низкомолекулярный эноксапарин

Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что количество иммобилизованного на биоматериале гепарина зависит от структуры и молекулярной массы антикоагулянта. Количество эноксапарина, связанного с биоматериалом, достоверно меньше, чем нефракционированного гепарина. В то же время этого количества достаточно для более эффективного по сравнению с нефракционированным гепарином сглаживания рельефа поверхности материала и снижения максимума агрегации тромбоцитов. Модификация биоматериала исследуемыми антикоагулянтами значительно снижает адсорбцию белков крови. Низкомолекулярный эноксапарин натрия наиболее перспективен для антитромботической модификации эпоксиобработанных биопротезов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с.

2. Бокерия Л. А., Новикова С. П. Протезы кровеносных сосудов и кардиохирургические заплаты с тромборезистентными, антимикробными свойствами и нулевой пористостью // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. 2008. Т. 9, № 4. С. 5–20.

3. Максимов А. В., Галиуллин О. Ф., Плотников М. В. Отдаленные результаты применения протезов «Экофлон» при синдроме Лериша // Ангиология и сосудистая хирургия. 2010. Т. 16, № 2. С. 81–85.

4. Новикова С. П. Повышение тромборезистентности искусственных органов иммобилизацией интерполимерных конъюгатов биологически активных веществ: дис. ... д-ра мед. наук. М., 1988. 435 с.

5. Опыт применения сосудистых биопротезов «КемАнгиопротез» в реконструктивной хирургии магистральных артерий нижних конечностей / В. А. Сафонов [и др.] // Ангиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2009. № 2. С. 103–106.

6. Основы применения радиоиндикаторного метода в биологии / Г. В. Косова [и др.]. М.: Изд-во МГУ, 2004. 166 с.

7. Оценка эффективности гепаринов различной молекулярной массы и длительности их применения в лечении больных с острым венозным тромбозом / А. И. Кириенко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. 2004. Т. 10, № 1. С. 18–28.

8. Покровский А. В., Харазов А. Ф. Состояние сосудистой хирургии в России в 2010 году // Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. М., 2011. 41 с.

9. Применение низкомолекулярных гепаринов в реконструктивной хирургии аневризм восходящего отдела аорты / М. А. Алиев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. 2004. Т. 10, № 3. С. 25–28.

10. Профилактика тромботических осложнений в реконструктивной хирургии с использованием низкомолекулярных гепаринов / В. Н. Гончаренко [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. 2008. Т. 3, № 2. С. 102–105.

11. Пути и перспективы совершенствования инфраингвальных артериальных биопротезов / И. Ю. Журавлева [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2005. № 1. С. 78–83.

12. Способ консервирования биоткани для протезирования клапанов сердца и сосудов: пат. 2008767 Рос. Федерация. № 5024513/14; заявл. 23.01.1992; опубл. 15.03.1994, Бюл. № 5.

13. Capila I., Linhardt R. J. Heparin-protein interactions // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2002. Vol. 41, № 3. P. 390–412.

14. Casu B., Torri G. Structural characterization of low-molecular weight heparins // Semin. Thromb. Hemost. 1999. Vol. 25, suppl. 3. P. 17–25.

15. Covalently-bound heparin makes collagen thromboresistant / J. Keuren [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2004. № 24. P. 613–617.

16. Smith P. K., Mallia A. K., Hermanson G. T. Colorimetric Method For Assay of Heparin Content in Immobilized Heparin Preparation // Analytical Biochem. 1980. Vol. 109, № 2. P. 466–473.

Статья поступила 20.08.2012.