

ХІМІЯ ВЫСОКАМАЛЕКУЛЯРНЫХ ЗЛУЧЭННЯЎ

УДК 661.728/ 677.494-96.017.2/7

*В. О. МИРОНЧИК¹, Т. Л. ЮРКШТОВИЧ¹, Л. В. ПОЛОВИНКИН², Н. К. ЮРКШТОВИЧ¹,
В. А. СТЕЛЬМАХ², Н. В. ГОЛУБ¹, В. А. АЛИНОВСКАЯ¹***СИНТЕЗ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИЗКОЗАМЕЩЕННЫХ
ФОСФАТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ**¹*НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета*²*Научно-практический центр гигиены**(Поступила в редакцию 06.04.2014)*

Введение. Интенсивное развитие химии биополимеров обусловлено непрерывно растущим уровнем медицинских технологий и возникающей в связи с этим необходимостью создания изделий и средств на основе синтетических и природных полимеров для восстановления и обеспечения нормальной жизнедеятельности организма.

Одним из основных требований, предъявляемых к биополимерам, является биосовместимость или способность полимера встраиваться в организм, не вызывая при этом побочных клинических проявлений. Биосовместимые полимеры, а также их композиты в настоящее время активно используются в качестве носителей для доставки лекарств [1], имплантатов для восстановления структурной целостности опорно-двигательного аппарата и повышения остеогенного потенциала костной ткани [2], рассасывающегося шовного материала [3] и т. д. Если раньше считалось, что безопасность полимерных имплантатов должна обеспечиваться их биологической и химической инертностью, то в настоящее время предпочтение отдается биоактивным материалам, которые выполняют не только заместительную функцию, но и вступают в специфические взаимодействия с организмом и стимулируют процессы регенерации соединительной, костной и др. тканей. Применяемые в ходе хирургических операций и остающиеся в организме шовные нити, по сути, являются имплантатами и должны соответствовать критериям биосовместимости, биоактивности и биodeградации, а также с учетом специфики их применения обладать достаточной механической прочностью.

Наибольший интерес в качестве биополимеров для изготовления шовных материалов представляют полисахариды и прежде всего целлюлоза, макромолекулы которой состоят из ангидроглюкопиранозных звеньев, соединенных β -гликозидной связью, и не содержат структурных единиц, которые могли бы оказывать токсическое воздействие на организм. Биосовместимость целлюлозы и многих ее производных хорошо известна. Так, окисленная оксидом азота (IV) целлюлоза используется как раневое покрытие [4], а продукты ее взаимодействия с антибиотиками, протеолитическими ферментами, иммуностимуляторами – в качестве имплантатов при проведении хирургических операций на различных органах и тканях с целью достижения гемостаза и профилактики гнойно-септических осложнений [5]. Алюминий-танниновый комплекс окисленной целлюлозы был предложен в качестве рассасывающегося шовного материала [6], который не получил широкого распространения из-за сложности получения и недостаточной стабильности при хранении. Сообщается о хорошей биосовместимости регенерированной целлюлозы, применяемой в качестве имплантата в ортопедической хирургии [7]. Вместе с тем отсутствие биоактивности у данного полимера не позволило достичь полной биологической фиксации или

остеоинтеграции, начальный этап которой связан с обменом ионов и молекул с образованием химической связи между материалом имплантата и окружающей его костью. Это свидетельствует о необходимости целенаправленного модифицирования структуры биополимеров, введения в их состав функционально активных групп, обеспечивающих при имплантации в организм протекание физико-химических и биологических процессов. Авторы работы [7] использовали фосфорилирование в качестве метода повышения биоактивности и экспериментально показали, что имплантаты из высокозамещенных фосфатов регенерированной целлюлозы обеспечивают лучшую остеоинтеграцию. Однако достаточно жесткие условия синтеза таких фосфатов целлюлозы (ФЦ) приводят к потере исходной физической формы и падению механической прочности, что не позволяет применять их, например, в качестве рассасывающегося шовного материала.

Цель данной работы – получение низкозамещенных ФЦ с использованием в качестве фосфорилирующих смесей водных растворов ортофосфорной кислоты и мочевины, изучение их физико-химических, механических и медико-биологических свойств, определение возможности использования в качестве основы для создания рассасывающегося хирургического шовного материала.

Материалы и методы исследований. В качестве исходного целлюлозного материала использовали хлопковую нить с линейной плотностью 100 текс и диаметром $0,41 \pm 0,02$ мм производства ОАО «Гронитекс» (г. Гродно, РБ). Для приготовления фосфорилирующих смесей применяли ортофосфорную кислоту марки «х.ч.» ($d^{20} = 1,698$ г/мл, $C = 84,4$ %) и мочевины марки «ч.».

Смеси готовили следующим образом: 199,8 г мочевины растворяли в 500 мл дистиллированной воды, приливали 31,2 мл (смесь № 1) или 41,6 мл (смесь № 2) ортофосфорной кислоты и доводили объем водой до 1000 мл.

Хлопковые нити помещали в предварительно нагретые до 353 ± 5 К фосфорилирующие смеси (в пропорции на 1 г целлюлозы 10 мл смеси), выдерживали в течение 30 мин, отжимали до 100 % привеса и сушили до постоянной массы при 323 ± 5 К. После этого нити термообработывали при температуре 418 ± 5 К в течение 60 мин, четырехкратно промывали горячей (около 353 К), затем холодной дистиллированной водой, выдерживали в течение 120 мин в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, отмывали до исчезновения в промывных водах качественной реакции на Cl^- -ионы и сушили при температуре 323 ± 5 К. Образцы фосфорилированных хлопковых нитей в герметичных полиэтиленовых пакетах стерилизовали радиационным способом (доза облучения 2,5 Мрад).

В полученных образцах определяли содержание фосфора (C_P , ммоль/г) молибдатным методом [8], азота (C_N , ммоль/г) методом Кьельдаля [9], полную обменную емкость (ПОЕ, мг-экв/г) потенциометрическим титрованием [10] с использованием в качестве титранта гидроксида натрия, степень набухания (Q , г/г) гравиметрически [11]. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Thermo Nicolet FT-IR Nexus, используя технологию приготовления таблеток в бромиде калия. Рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре фирмы Carl Zeiss (CuK_{α} , Ni-фильтр, HZGb-4A). Индекс кристалличности рассчитывали методом внутреннего стандарта [12].

Механические свойства исходной (ИЦ) и фосфорилированных целлюлозных (ФЦ) нитей в сухом и мокром состоянии оценивали по величине разрывного напряжения (P , кгс/см²), определяемой согласно методике [13].

Медико-биологические свойства ФЦ, включающие органолептические и санитарно-химические испытания, оценку острой токсичности, стерильности и апиrogenности, местно-раздражающего, потенциального аллергенного, канцерогенного и мутагенного действий, гемолитическую активность, проводили в соответствии с действующими нормативно-методическими документами, регламентирующими подобного рода исследования [14–19]. При этом объектом исследования служили водные вытяжки из нитей ФЦ и кетгута (модельная среда – дистиллированная вода, экспозиция от 3 до 30 сут, температура термостатирования 313 К, соотношение длины изделия к объему модельной среды – 0,4 см : 1 см³).

Эксперименты по оценке биосовместимости (имплантационный тест) и общетоксического действия ФЦ проводили на белых половозрелых крысах обоего пола, которым под ингаляционным наркозом галотаном выполняли лапаротомию и имплантацию нитей в печень, желудок и толстую кишку. Контролем служили белые крысы, которым аналогично имплантировали кетгут. Животных выводили из эксперимента методом мгновенной декапитации на 7-, 14-, 30- и 60-е сутки после имплантации. При этом визуально оценивали изменения тканей в зоне

имплантации, признаки макроскопического разрушения шовного материала. Для оценки общетоксического действия ФЦ к концу эксперимента (60-е сутки) проводили изучение ряда гематологических (лейкоциты, лейкограмма) и биохимических (диеновые конъюгаты, малоновый альдегид, общие липиды и супероксиддисмутаза в гем. крови) показателей.

Результаты и их обсуждение. При химической модификации целлюлозных материалов используются, как правило, агрессивные среды, что практически всегда сопровождается потерей механических характеристик, степень которой зависит от условий проведения процесса. Ранее нами было показано [20], что механические свойства фосфорилированных целлюлозных нитей, полученных с использованием водных растворов ортофосфорной кислоты в присутствии мочевины, зависят от концентрации обоих реагентов в растворе и температурных режимов на стадиях пропитки и термообработки. Были определены оптимальные условия получения ФЦ нитей с минимальной потерей механической прочности: концентрация ортофосфорной кислоты и мочевины в растворе 0,3–0,8 и 3,33–4,17 моль/л соответственно; соотношение целлюлозы и объема пропиточной смеси (г/мл) 1 : 10; время и температура на стадии пропитки 0,5 ч и 353 ± 5 К; время и температура на стадии термообработки 1 ч и 418 ± 5 К.

Для изучения медико-биологических свойств и оценки возможности применения ФЦ нитей в качестве основы для дальнейшего модифицирования и создания рассасывающегося шовного материала в указанных условиях были синтезированы образцы ФЦ-1 и ФЦ-2, некоторые характеристики которых приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Химический состав и механические свойства нитей ФЦ

Образец	Концентрация в фосфорилирующей смеси, моль/л		C_P , ммоль/г	C_N , ммоль/г	ПОЕ, мг-экв/г	Q , г/г	IC	P , кгс/см ²	
	H_3PO_4	$(NH_2)_2CO$						сухая	мокрая
ИЦ	–	–	–	–	–	0,3	0,69	1700	1900
ФЦ-1	0,54	3,33	0,25	0,21	0,5	0,3	0,68	800	960
ФЦ-2	0,72	3,33	0,50	0,43	1,0	0,5	0,67	630	720

Наличие фосфорнокислых групп в образцах ФЦ подтверждено появлением на ИК-спектрах (рис. 1) полос поглощения 790 см^{-1} (неплоскостные деформационные колебания групп Р–О–Н), 870 см^{-1} (валентные колебания связей Р–О), 970 см^{-1} (колебания групп С–О–Р), 1200 см^{-1} (полоса поглощения группы Р=О). Полоса поглощения 1720 см^{-1} относится к валентным колебаниям С=О и подтверждает протекание побочного процесса образования карбаматных групп (цел–О–CONH₂), количество которых (табл. 1) сопоставимо с содержанием фосфорнокислых

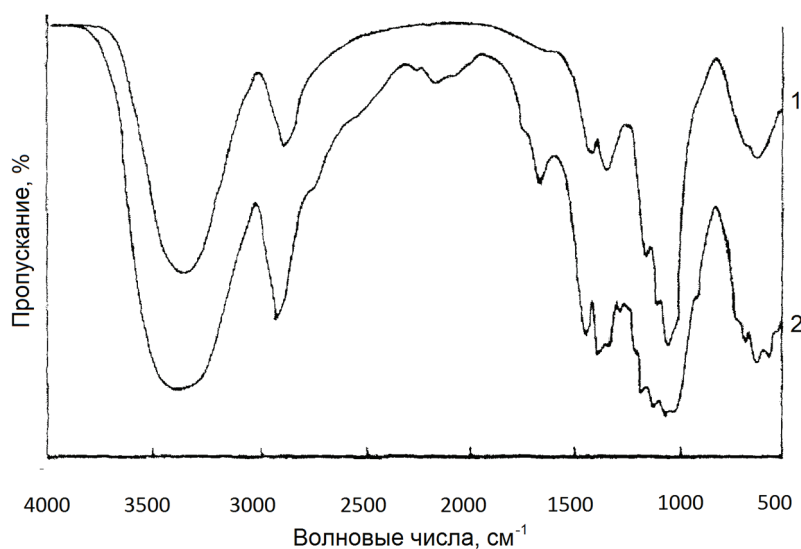


Рис. 1. ИК-спектры исходной (1) и фосфорилированной (2) хлопковой целлюлозы с содержанием фосфора 0,25 ммоль/г

групп. Кривые потенциометрического титрования образцов ФЦ-1 и ФЦ-2 характеризуются двумя точками эквивалентности, а численное значение ПОЕ в 2 раза превышает содержание фосфора. Это однозначно свидетельствует о преимущественном образовании в указанных условиях однозамещенных фосфорнокислых групп цел-O-PO(OH)_2 .

Дифрактограммы образцов ФЦ-1 и ФЦ-2 (рис. 2) и рассчитанные по ним значения индексов кристалличности (IC) практически не отличаются от дифрактограммы и значения IC для исходного целлюлозного образца, что свидетельствует о полном сохранении кристаллической структуры полисахарида и протекании химических процессов исключительно в аморфных областях. Имеющее место уменьшение разрывной нагрузки нитей ФЦ-1 и ФЦ-2 в сухом и мокром виде по сравнению с нитью ИЦ связано, вероятно, с деполимеризационными процессами. Известно гидролизующее действие разбавленных водных растворов минеральных кислот на целлюлозу, сопровождающееся резким уменьшением степени полимеризации (СП) вследствие образования промежуточного комплекса между глюкозидным кислородом и протоном с последующим разрывом β -глюкозидной связи. Например, в 4,5%-ном растворе хлористоводородной кислоты при температуре 358 К за 15 мин СП хлопковой целлюлозы уменьшается в ~ 3 раза [21] с одновременным значительным сокращением длины целлюлозных волокон. Гидролизующее действие ортофосфорной кислоты в используемых в данной работе фосфорилирующих смесях в значительной степени нейтрализовано мочевиной, однако полностью исключить его воздействие на хлопковые нити на стадии пропитки невозможно. Результатом является уменьшение разрывной нагрузки с 1700 до 800 (ФЦ-1) и 630 (ФЦ-2) кгс/см², что, однако, является достаточным для хирургических шовных материалов.

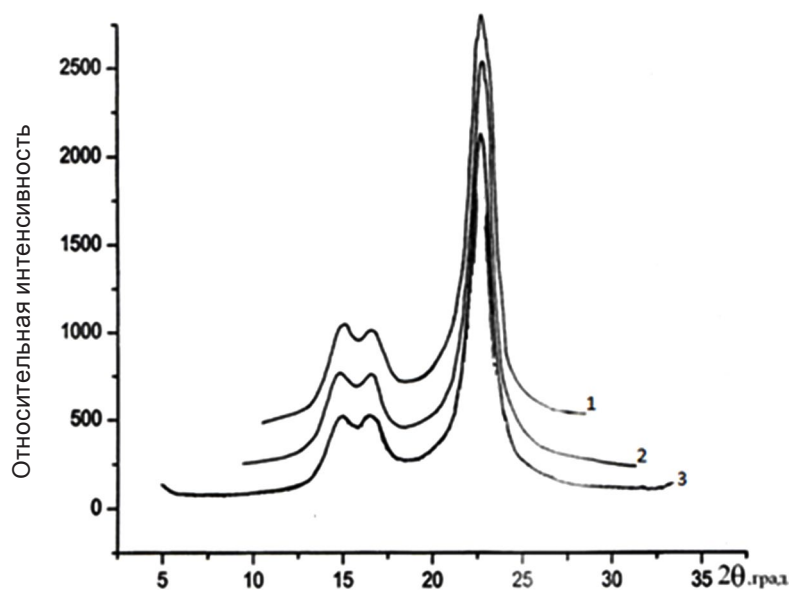


Рис. 2. Дифрактограммы исходной (1) и фосфорилированной хлопковой целлюлозы (2, 3) с содержанием фосфора (ммоль/г) 0,25 (2); 0,5 (3).

Экспериментальными исследованиями по оценке медико-биологических свойств нитей ФЦ установлено, что водные вытяжки из них не изменяют органолептических показателей модельной среды и по санитарно-химическим показателям (окисляемость, бромируемость, разница рН) отвечает требованиям, предъявляемым к подобного вида изделиям. Нити ФЦ стерильны и апиrogenны, не содержат гемолитически активных веществ, способных выделяться в модельную среду в количествах, вызывающих разрушение эритроцитов выше допустимого уровня, в условиях острых экспериментов не вызывают гибели животных и не инициируют симптомов интоксикации организма, не обладают раздражающими и сенсибилизирующими свойствами. Вытяжки из нитей ФЦ не обладают потенциальной мутагенной и канцерогенной активностью в отношении тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA-100 и в опытах *in vitro* на ДНК фага λ .

При имплантации нитей ФЦ-1 и ФЦ-2 в печень, желудок и толстую кишку белых крыс в сроки 7-, 14-, 30- и 60-х суток выявлены следующие макроскопические изменения:

7-е сутки – признаки воспаления в зонах имплантации отсутствуют, спаечные процессы выражены незначительно (ФЦ-1) и умеренно (ФЦ-2), прочность нитей сохранена. При имплантации кетгута спаечный процесс в зоне имплантации выражен умеренно, имеются признаки воспаления, прочность нити сохранена;

14-е сутки – признаки воспаления в зонах имплантации отсутствуют. Спаечные процессы в зонах имплантации ФЦ-1 отсутствуют, ФЦ-2 – умеренно выражены. Нити ФЦ-1 и ФЦ-2 инкапсулированы, их прочность сохранена. При имплантации кетгута у большей части животных умеренно выраженный спаечный процесс и признаки воспаления, прочность нити сохранена. У отдельных животных выраженный спаечный процесс, инфильтрация тканей, внутрибрюшинные абсцессы;

30-е сутки – признаки воспаления в зонах имплантации ФЦ-1 и ФЦ-2 отсутствуют, спаечные процессы незначительные, нити инкапсулированы, их прочность сохранена, но отмечается начало протекания деструкционных процессов. При имплантации кетгута интенсивно выраженный спаечный процесс у 9,1 % животных, умеренно выраженный – 27,3, незначительно выраженный – 63,6 %. Выраженная инфильтрация тканей в органах имплантации и окружающих тканях и внутрибрюшинные абсцессы выявлены в 27,3 и 38,4 % наблюдений. Прочность нити сохранена на 64 %;

60-е сутки – признаки воспаления в зонах имплантации ФЦ-1 и ФЦ-2 отсутствуют, спаечные процессы незначительные, нити инкапсулированы, отчетливо видны протекающие процессы деструкции и биодegradации нитей. При имплантации кетгута интенсивно выраженный спаечный процесс, инфильтрация тканей в 30 % наблюдений, полное рассасывание нити в 10 % наблюдений, остатки фрагментированной лигатуры у 29 % животных, у остальных нить сохранена, но прочность ее незначительна.

Анализ результатов, представленных в табл. 2, свидетельствует, что имплантация нитей ФЦ в печень, желудок и толстую кишку не вызывает статистически достоверных изменений со стороны изучаемых биохимических и гематологических показателей к концу эксперимента (60-е сутки) по сравнению с контролем (кетгут). Указанное позволяет сделать заключение об отсутствии общетоксического действия изучаемых нитей ФЦ при их длительной имплантации в организм экспериментальных животных.

Т а б л и ц а 2. Гематологические и биохимические показатели белых крыс через 60 сут нитей ФЦ, $M \pm m$ ($n_1 = n_2 = n_3 = 10$)

Изучаемые показатели	Группы животных		
	Кетгут (контроль)	ФЦ ₁	ФЦ ₂
<i>Гематологические показатели</i>			
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	10,90±1,10	9,40±1,22	10,50±0,98
<i>Лейкограмма</i>			
– палочкоядерные			
%	2,39±0,41	3,90±0,76	2,66±0,60
$10^9/\text{л}$	0,28±0,07	0,29±0,07	0,27±0,05
– сегментоядерные			
%	33,70±2,38	28,40±1,67	28,5±2,62
$10^9/\text{л}$	3,54±0,35	2,71±0,45	3,12±0,53
– эозинофилы			
%	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
$10^9/\text{л}$	0,11±0,11	0,11±0,04	0,12±0,01
– моноциты			
%	1,92±0,38	1,70±0,36	1,20±0,13
$10^9/\text{л}$	0,23±0,06	0,16±0,04	0,13±0,02
– лимфоциты			
%	61,0±2,41	66,1±2,08	66,8±2,87
$10^9/\text{л}$	6,68±0,76	6,05±0,74	6,85±0,53

Изучаемые показатели	Группы животных		
	Кетгут (контроль)	ФЦ ₁	ФЦ ₂
<i>Биохимические показатели</i>			
Диеновые конъюгаты, мкмоль/мл	5,85±0,15	5,72±0,17	5,41±0,23
Малоновый диальдегид, мкмоль/мл	1,34±0,07	1,32±0,10	1,23±0,08
Общие липиды, г/л	2,28±0,11	2,30±0,13	2,29±0,11
Супероксиддисмутаза в гем. крови, мкг/мл крови	41,7±1,41	40,9±1,98	39,9±2,20

Заключение. Таким образом, проведенными исследованиями показано соответствие нитей на основе низкозамещенных фосфатов целлюлозы, синтезированных с использованием в качестве этерифицирующей смеси водных растворов ортофосфорной кислоты в присутствии мочевины, медико-биологическим критериям безопасности, в том числе по показателям биосовместимости и биодegradации. Нити ФЦ в имплантационном тесте сохраняют свои прочностные свойства в сроки, превосходящие сроки заживления операционных ран, инкапсулируются, не оказывают общетоксического действия. В зоне имплантации во все периоды наблюдения практически полностью отсутствуют спаечные процессы и признаки воспаления, что обеспечивает существенные преимущества нитей ФЦ по сравнению с традиционно используемым в медицинской практике кетгутом.

Литература

1. Dutta R. C. // *Curr. Pharm. Des.* 2007. Vol. 13, N7. P. 761–769.
2. Кирилова И. А., Фомичев Н. Г., Подорожная В. Т., Трубников В. И. // Хирургия позвоночника. 2007. №2. С. 66–70.
3. Мохов Е. М., Хомулло Г. В., Сергеев А. Н., Александров И. В. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2012. №3. С. 391–396.
4. Galgut P. N. // *Biomaterials.* 1990. N 11. P. 561–564.
5. Капуцкий Ф. Н., Юркитович Т. Л. Лекарственные препараты на основе производных целлюлозы. Минск: Университетское, 1989. С. 111.
6. Кузин И. М., Адамян А. А., Винокурова Г. И. // Хирургия. 1990. №9. С. 152–157.
7. Fricain J. C., Granja P. L., Barbosa M. A., Jeso B. de, Barthe N., Baquey C. // *Biomaterials.* 2002. N23. P. 971–980.
8. Бусев А. И. Колориметрические (фотометрические) методы определения неметаллов / Пер. с англ. М.: ИЛ, 1963. С. 17.
9. Губен-Вейль. Методы органической химии / Пер. с англ. М.: Химия, 1967. С. 1032.
10. Полянский Н. Г., Горбунов Г. В., Полянская Н. Л. Методы исследования ионов. М.: Химия, 1976.
11. Heinze U., Klemm D., Under E., Piescher F. // *Starch / Stärke.* 2003. Vol. 55. P. 55–60.
12. Иослович М. Я., Веверис Г. П. // *Химия древесины.* 1983. №2. С. 10.
13. Лабораторный практикум по текстильному материаловедению. М.: Легпромбытиздат, 1987.
14. Санитарные нормы и правила «Требования к изделиям медицинского назначения и медицинской технике» (Утв. Постановлением МЗ РБ 16.12.2013 №128).
15. Гигиенический норматив «Показатели безопасности изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления» (утв. Постановлением МЗ РБ 16.12.2013 №128).
16. Инструкция 1.1.10-12-41-2006. «Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления».
17. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на «Salmonella» / Метод. указания. М.: МЗ СССР, 1985.
18. Руководства по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. ВОЗ: Женева, 1989.
19. Абилев С. К., Порошенко Г. Г. // *Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Токсикология.* 1986. Т. 14. С. 171.
20. Юркитович Н. К., Юркитович Т. Л., Капуцкий Ф. Н., Голуб Н. В., Костерова Р. И. // *Химические волокна.* 2007. №1. С. 26–30.
21. Хакимова Ф. К., Носкова О. А., Ковтоун Т. Н. // *Лесной журн.* 2002. №2. С. 71–77.

V. O. MIRONCHIK, T. L. YURKSHTOVICH, L. V. POLOVINKIN, N. K. YURKSHTOVICH, V. A. STEL'MAKH,
N. V. GOLUB, V. A. ALINOVSKAYA

SYNTHESIS AND MEDICO-BIOLOGICAL PROPERTIES OF LOW-SUBSTITUTED CELLULOSE PHOSPHATES

Summary

The process of cellulose fiber esterification by dilute (0.3–0.8 mol/dm³) orthophosphoric acid water solutions in presence of urea under various conditions has been investigated. Low-substituted cellulose phosphates containing 0.25–0.5 mmol/g of phosphorus, have been prepared. Physical, chemical and medico-biological properties of cellulose phosphates obtained have been studied. It has been shown that they fit the medico-biological safety criteria, including biocompatibility indicators and possibility of use as medicine materials.