

УДК616.015.152

©Коллектив авторов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕПАРИНА С АМИНОСОДЕРЖАЩИМИ МАТЕРИАЛАМИ.

Е.А.НЕМЕЦ¹, Д.А.КАСАТОВ², В.И.СЕВАСТЬЯНОВ^{1,2}.

¹Государственный центр по исследованию гемосовместимых биоматериалов,
НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ;

²Московский физико-технический институт.

С применением метода флуоресценции полного внутреннего отражения изучено влияние природы аминокрупп, иммобилизованных на поверхности стекла, и условий проведения эксперимента (концентрация, ионная сила и состав модельной среды, сдвиговая скорость) на взаимодействие аминоксодержащих образцов с гепарином. Показано, что при адсорбции гепарина из индивидуального раствора определяющим фактором является природа концевой аминокруппы, а не ее подвижность или количество аминокрупп в основной цепи. В случае одновременной адсорбции гепарина и белков плазмы крови на аминоксодержащую поверхность количество адсорбированного гепарина в отличие от адсорбции из индивидуального раствора, определяется не только природой концевой аминокруппы, но и ее подвижностью. Гепарин, необратимо адсорбированный из индивидуального раствора, не вытесняется белками при последующем контакте с плазмой крови. Наибольшее количество гепарина адсорбируется на поверхность с иммобилизованными третичными аминокруппами.

На основании полученных данных сделаны практические рекомендации по гепаринизации изделий медицинского назначения, изготовленных из аминоксодержащих материалов.

Ключевые слова: аминокруппы, поверхность стекла, гепарин, взаимодействие, гепаринизация медицинского оборудования.

ВВЕДЕНИЕ. Гепаринизация разрабатываемых или существующих медицинских изделий, кратковременно и длительно контактирующих с кровью (гемодиализаторы, оксигенаторы, протезы кровеносных сосудов и т.д.), является перспективным и сравнительно недорогим способом улучшения их медико-биологических свойств [1]. Наибольший интерес представляет подход, основанный на способности гепарина (Гп) образовывать комплекс с

положительно заряженными аминогруппами. Существует целый ряд веществ синтетического (полиамидамины [1, 2], N-замещенная полимочевина [3], полилизин [4]) или природного (протамин сульфат, фибронектин и др. [1, 5]) происхождения, содержащих большое количество аминогрупп. К достоинствам положительно заряженных аминогрупп относится их способность прочно связывать Гп из индивидуального раствора или цельной крови без дополнительной обработки, а также возможность связанного Гп обмениваться со свободным гепарином крови. Иммобилизация таких веществ на поверхность изделий приводит к формированию самогепаринизуемых покрытий, разработка которых интенсивно ведется многими крупными зарубежными фирмами, например, Бакстер, Медтроник, Бард и другими.

Известно несколько примеров экспериментально-клинического использования гепаринизированных аминосодержащих покрытий: разработка новых тромборезистентных материалов [7] и сосудистых протезов малого диаметра [8]; создание фильтров послеоперационного удаления Гп [4, 5].

Количество иммобилизованного Гп зависит от природы аминогрупп (первичных ($-\text{NH}_2$), вторичных ($-\text{NHR}$) или третичных ($-\text{NR}_2$)) и технологии получения конкретного аминосодержащего материала или покрытия. Так в работах [2-4, 7] было показано, что третичные аминогруппы связывают до $1,2 \text{ мг/см}^2$ Гп, а первичные – на два порядка меньше. С другой стороны, большое количество иммобилизованного Гп может являться следствием его сорбции в объем материала. К настоящему времени нет данных по влиянию условий проведения гепаринизации аминогрупп и материала подложки на количество иммобилизованного Гп, не исследована аффинность иммобилизованных аминогрупп относительно обратимо и необратимо адсорбированных молекул гепарина. Поставленные вопросы важны не только с точки зрения выяснения механизма взаимодействия гепаринизированных поверхностей с кровью, но и для оптимизации технологии гепаринизации медицинских изделий.

Первым шагом на пути выяснения поведения иммобилизованного Гп на поверхности аминосодержащих материалов является исследование характера процессов адсорбции и десорбции антикоагулянта в модельных средах.

В связи с этим, целью данной работы явилось изучение влияния природы иммобилизованных аминогрупп и условий проведения эксперимента (концентрация Гп, ионная сила и состав модельной среды, сдвиговая скорость) на взаимодействие антикоагулянта с поверхностью стекла. Для исследования механизма адсорбции Гп на поверхность аминосодержащих материалов был привлечен метод флуоресценции полного внутреннего отражения (ФПВО), часто применяемый при регистрации кинетики адсорбции белков [6]. Метод ФПВО позволяет в реальном масштабе времени и в условиях потока измерять количество как слабо («обратимо»), так и прочно («необратимо») адсорбированных молекул на поверхности оптически прозрачных материалов.

МЕТОДИКА. В качестве объектов исследования были выбраны шлифованные предметные стекла (ТУ 26-76), модифицированные органосилоксанами, содержащими аминогруппы в боковой цепи, по ранее описанной методике [9]. Образцы исходного и модифицированного стекла (Ст) обозначены, соответственно, как Ст, Ст- R_1 ($\text{R}_1 = -\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$), Ст- R_2 ($\text{R}_2 = -\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$) и Ст- R_3 ($\text{R}_3 = -\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$). В случае R_2 концевая функциональная

группа удалена на большее расстояние от поверхности подложки по сравнению с R_1 и R_3 , следовательно, подвижность ее выше. Кроме того, плотность положительного заряда поверхности $Ст-R_2$ выше, чем $Ст-R_1$, так как в первом случае «ножка» содержит дополнительно две вторичных аминогруппы в основной цепи (суммарно три аминогруппы: две вторичные в середине и первичная аминогруппа на конце «ножки»). Углеводородные «ножки» $-R_3$ и $-R_1$ имеют одинаковую длину. Таким образом, исследуемые аминосодержащие поверхности отличались подвижностью концевой функциональной группы (за счет длины углеводородной «ножки»), общей плотностью положительного заряда поверхности (за счет изменения количества аминогрупп в боковой цепи) и электроположительностью концевой аминогруппы. В отличие от $Ст-R_1$ и $Ст-R_2$ поверхность $Ст-R_3$ содержит не первичные, а третичные концевые аминогруппы, электроположительность которых выше [10].

Адсорбцию Гп (гепарин сухой, активность 181 ед/мг, «Sigma», США), меченого флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ, изомер 1, «Sigma», США) по стандартной методике, изучали методом ФПВО [6].

Измерения изотерм и кинетических кривых адсорбции Гп-ФИТЦ на поверхности образцов из фосфатного буфера (ФБ) проводили при комнатной температуре на субнаносекундном спектрофлуориметре СЛМ-4800 (SLM Instruments, Urbana, IL, USA) при разных сдвиговых скоростях модельной среды и при $pH=7,4$. Значения сдвиговой скорости изменяли от 5 с^{-1} до 3000 с^{-1} , что соответствовало условиям взаимодействия Гп с поверхностью в условиях кровотока: $0 - 5\text{ с}^{-1}$ в областях застоя; $30 - 150\text{ с}^{-1}$ в венах; $400 - 450\text{ с}^{-1}$ в артериях и капиллярах и до 3000 с^{-1} , например, в полых волокнах гемодиализаторов.

При системной гепаринизации во время операции в кровоток пациента вводят от $2 - 20$ Ед/мл Гп, что соответствует примерно $0,01 - 0,1$ мг/мл. С другой стороны, при поверхностной иммобилизации Гп используют рабочие растворы с концентрацией антикоагулянта порядка $1,0$ мг/мл [1]. В связи с этим при измерении изотерм необратимо адсорбированного Гп его концентрацию в растворе варьировали в пределах от $0,1$ до $1,0$ мг/мл.

Кинетику десорбции Гп-ФИТЦ с поверхности образцов измеряли после его адсорбции в течение 1000 с , замещая в кювете ФПВО раствор с Гп-ФИТЦ на раствор аналогичного состава без Гп в течение последующих 200 с .

Пример типичной кинетической кривой адсорбции приведен на рис. 1. На этом рисунке обозначены обратимо (смываемая при десорбции) и необратимо адсорбировавшиеся (несмываемая при десорбции) составляющие адсорбционного слоя.

При определении абсолютного количества иммобилизованного Гп обычно применяют толуидиновый синий (ТС) [11]. Однако для исследуемых образцов калибровка сигнала флуоресценции по связыванию ТС с иммобилизованным Гп оказалась невозможной из-за высокого неспецифического связывания красителя с поверхностью исходного и модифицированного стекла. В связи с этим результаты представляли в относительных единицах поверхностной концентрации Гп-ФИТЦ, пропорциональных интенсивности сигнала флуоресценции. Доверительный интервал на графиках приведен в единицах среднего квадратического отклонения результатов трех измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Количество Гп, необратимо адсорбированного из ФБ ($[Гп]_{\text{необр адс.}}$), полностью совпадают в пределах

чувствительности метода для образцов Ст-R₁ к Ст-R₂, несмотря на большую подвижность концевой аминогруппы и увеличение плотности поверхностного заряда в случае Ст-R₂ (рис. 2). В то же время замена концевой аминогруппы с первичной на третичную (Ст-R₃) сопровождается многократным повышением $[Гп]_{\text{адс.}}^{\text{необр.}}$.

В выбранном диапазоне концентраций 0,1-1,0 мг/мл для всех образцов Ст-R₁, Ст-R₂ и Ст-R₃ количество $[Гп]_{\text{адс.}}^{\text{необр.}}$ не зависит от его концентрации в растворе (рис. 2). По-видимому, при поверхностной гепаринизации изделий нет необходимости применять растворы с высокими концентрациями антикоагулянта.

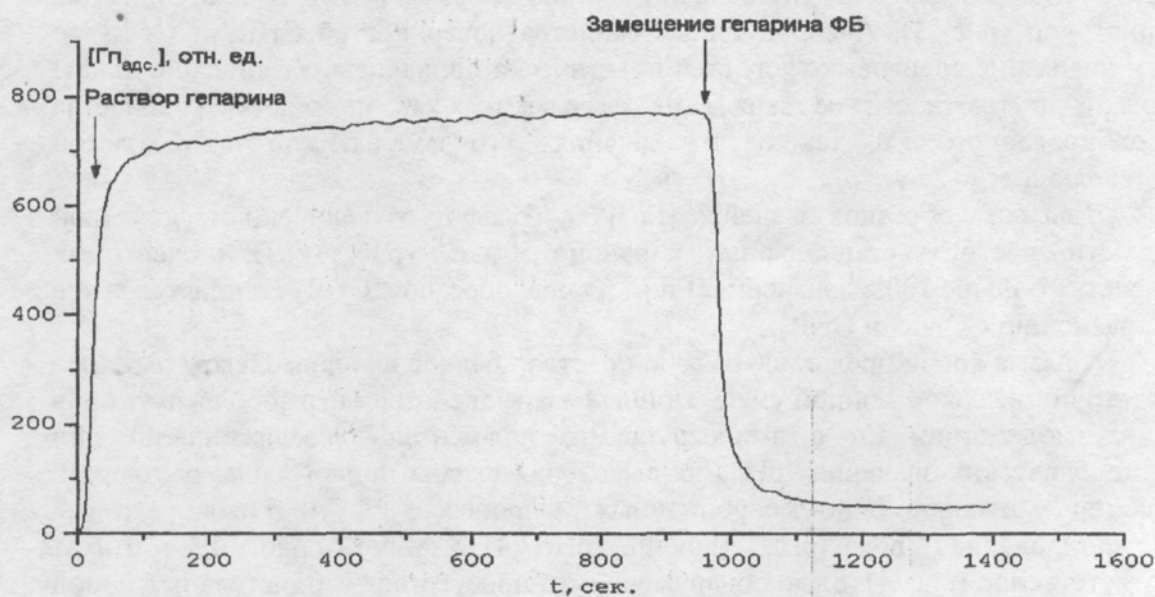


Рисунок 1.

Типичная кинетическая кривая адсорбции и десорбции Гп на аминоксодержащей поверхности.

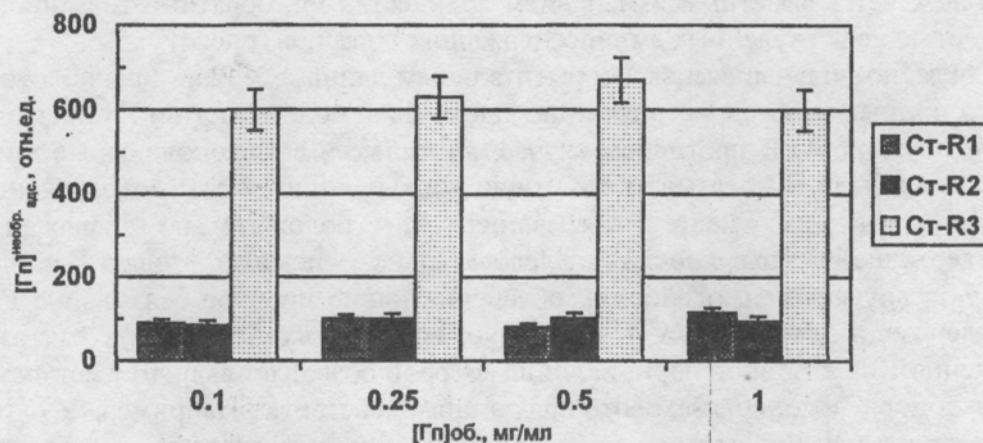


Рисунок 2.

Зависимость количества необратимо адсорбированного Гп от его объемной концентрации в ФБ (сдвиговая скорость - 50 с^{-1}).

В дальнейших исследованиях при измерениях кинетических кривых адсорбции Гп была выбрана концентрация Гп в модельных средах, равная 0,1 мг/мл. Заметим, при данной концентрации сигнал флуоресценции достаточно интенсивен, а количество Гп в растворе (0,1 мг/мл или 15-18 Ед/мл) соответствует максимальным значениям концентрации Гп, применяемым при системной гепаринизации.

Наибольшее количество Гп адсорбируется на поверхности с третичной концевой аминогруппой (Ст- R_3) с преобладанием в адсорбционном слое необратимо связанного Гп (рис. 3). В то же время количество $[Гп]^{необр}_{адс}$ практически не зависит от величины сдвиговой скорости для всех типов аминогрупп (рис. 3). Адсорбционные свойства поверхностей Ст- R_1 и Ст- R_2 во всем диапазоне сдвиговых скоростей практически одинаковы. Увеличение длины «ножки» и плотности ее заряда не сказывается как на общем количестве адсорбированного Гп, так на и значениях его необратимой и обратимой составляющих.

Для всех образцов значения $[Гп]^{обр}_{адс}$ падают с увеличением сдвиговой скорости, достигая стационарных в районе 500 с^{-1} (рис. 3). При сдвиговых скоростях больше 100 с^{-1} значения $[Гп]^{обр}_{адс}$ для образцов Ст- R_3 становятся выше по сравнению с Ст- R_1 и Ст- R_2 .

Плазма крови представляет собой раствор белков в водносолевом растворе достаточно высокой ионной силы. Ионные взаимодействия играют важную роль во взаимодействии Гп с аминогруппами, положительно заряженными при физиологических значениях pH. Для выяснения вклада ионной силы раствора в характер адсорбционно-десорбционных процессов Гп были взяты дистиллированная вода (pH=7,4) и ФБ (pH=7,4) с ионной силой 0,5 и 1,0 М соответственно (рис. 4). Было обнаружено, что присутствие отрицательных ионов малого размера (Cl^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) не только не снижает, но даже повышает количество Гп, прочно связанного с аминоксодержащей поверхностью (рис. 4). Данный эффект проявляется в случае образцов с первичной концевой аминогруппой (Ст- R_1 и Ст- R_2). В то же время увеличение ионной силы раствора не сопровождается заметным изменением количества Гп, обратимо связанного с поверхностью всех изученных аминоксодержащих образцов (рис. 4).

Согласно полученным экспериментальным данным, можно предположить, что чисто ионные взаимодействия аминоксодержащей поверхности и Гп не играют определяющую роль. В противном случае, активные и высокоподвижные малые ионы должны были бы оказывать заметную конкуренцию высокомолекулярному полианиону Гп за места связывания на положительно заряженной аминоксодержащей поверхности. Следовательно, помимо чисто ионных существуют другие взаимодействия, обеспечивающие прочное связывание Гп с аминоксодержащими образцами. Здесь следует вспомнить о наличии у атома азота не поделенной электронной пары, наличие которой позволяет аминам выступать в качестве донора в донорно-акцепторных взаимодействиях. Например, в случае реакции кватернизации за счет присоединения к атому азота иона водорода, имеющего свободную орбиталь, образуется положительно заряженный ион четвертичного аммония. Первоначально для связывания Гп и применяли материалы, содержащие положительно заряженные атомы кватернизованного азота [1]. В отличие от первичного, вторичного или третичного азота, атом четвертичного аммония не имеет свободной электронной пары. Поэтому

взаимодействие между ним и Гп носит чисто ионный характер. В результате необходима дополнительная ковалентная фиксация ионно-связанного Гп (например, с помощью глутарового альдегида [1]) для достижения достаточной устойчивости его на поверхности биоматериалов при их контакте с кровью.

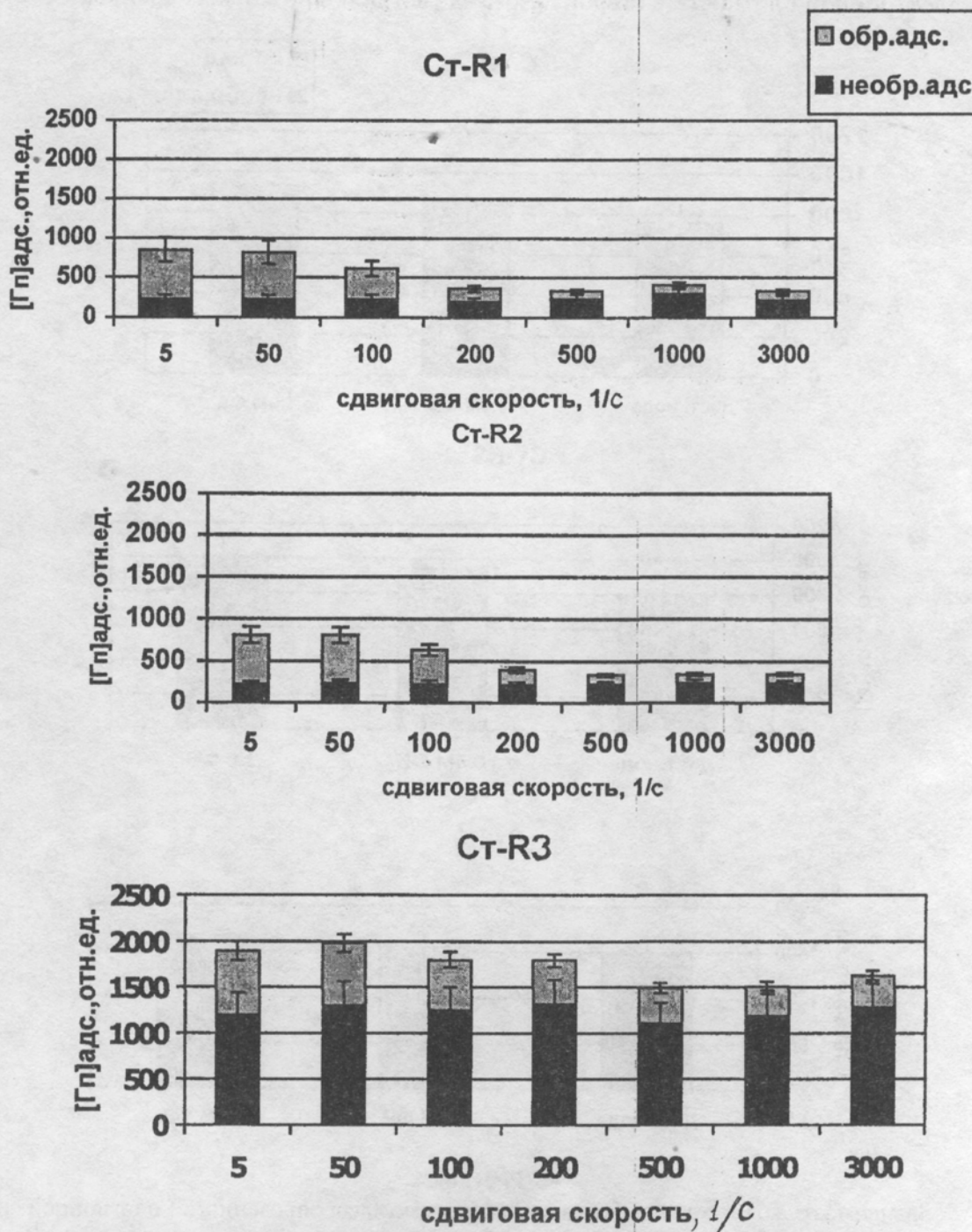


Рисунок 3.

Зависимость количества Гп, обратимо и необратимо адсорбированного из ФБ, от сдвиговой скорости модельной среды (концентрация Гп в растворе - 0,1 мг/мл).

Абсолютное количество Гп, прочно связанного с поверхностью (см. рис. 4), гораздо выше в случае образцов с третичной концевой аминогруппой (Ст-Р₃). По-видимому, не поделенная электронная пара азота концевой третичной аминогруппы $\{-N(C_2H_5)_2\}$ оказывается более доступной для донорно-акцепторных взаимодействий, чем первичной ($-NH_2$), благодаря сдвигу электронной плотности в сторону азота за счет дополнительных алкильных

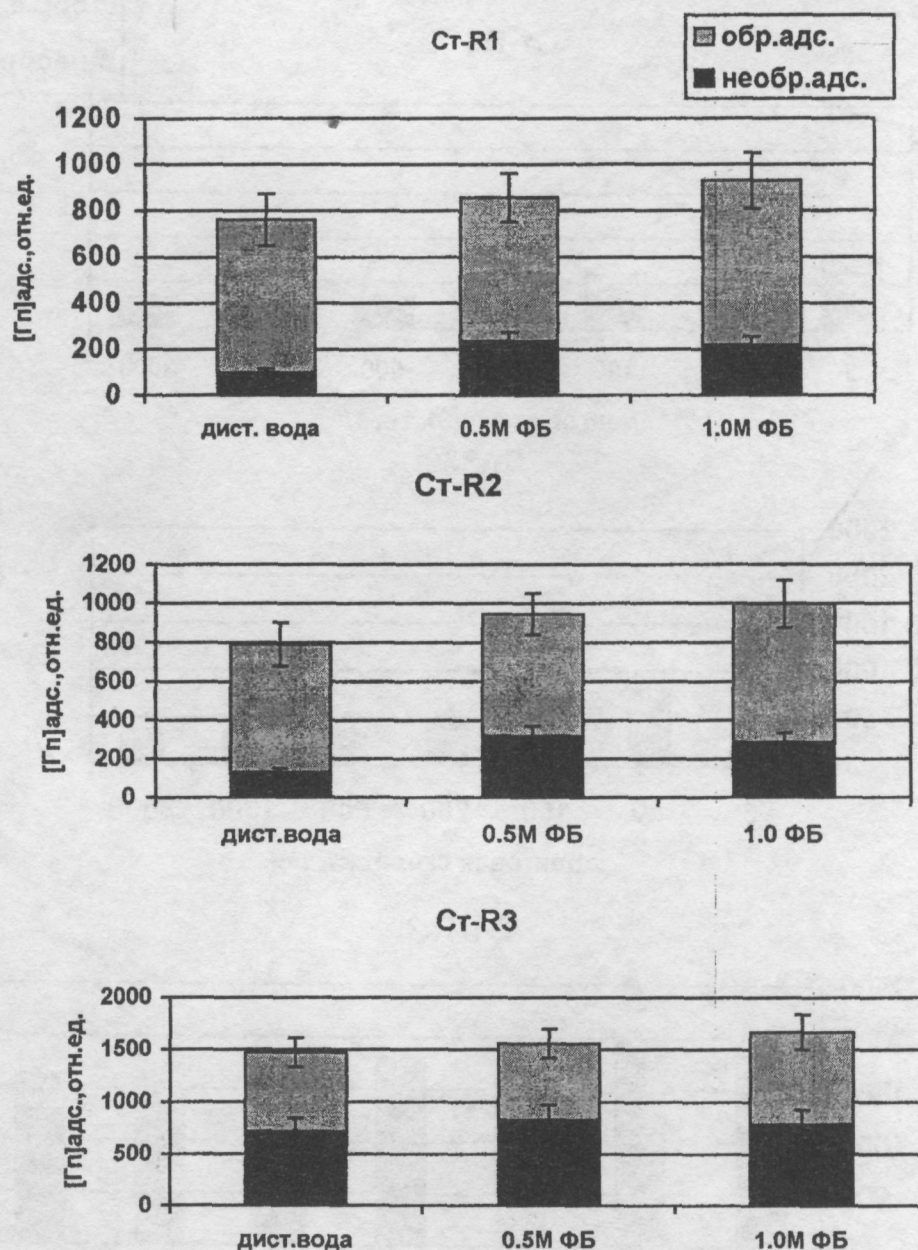


Рисунок 4.

Зависимость количества обратимо и необратимо адсорбированного Гп от ионной силы раствора (объемная концентрация Гп - 0,1 мг/мл, сдвиговая скорость - 50 с⁻¹).

радикалов, несмотря на возникновение дополнительных стерических затруднений. Это подтверждает предположение о том, что устойчивое комплексообразование Гп с аминоксодержащей поверхностью обеспечивается не

столько за счет образования полиионного комплекса, сколько в результате значительного вклада донорно-акцепторных, водородных и других типов взаимодействий.

Таким образом, при исследовании влияния на адсорбцию Гп его концентрации в растворе, сдвиговой скорости и ионной силы поверхность Ст- R_3 проявила большую аффинность к Гп по сравнению с Ст- R_1 и Ст- R_2 , имеющих практически одинаковые адсорбционные свойства. Что же касается активности иммобилизованного на поверхности Гп по связыванию антитромбин III – тромбин комплекса, то по литературным данным [12] для ковалентно иммобилизованного Гп эта активность тем выше, чем больше длина “ножки”.

Известно, что первой стадией взаимодействия чужеродной поверхности с кровью является адсорбция белков [6], которые способны составить конкуренцию Гп за места связывания на аминокислотсодержащей поверхности. На рис. 5 приведены значения обратимой и необратимой составляющей адсорбции Гп для двух модельных сред: ФБ и плазмы крови, разбавленной ФБ в соотношении 1:50. Наличие в растворе белков плазмы крови снижает общее количество адсорбированного Гп во всех образцах. Однако механизм совместной адсорбции антикоагулянта и белков плазмы крови зависит от природы аминокислотных групп. Для поверхности Ст с первичными аминокислотными группами ($-R_1$) присутствие белка уменьшает количество обратимо и необратимо адсорбируемых молекул Гп (см. рис. 5). Адсорбция Гп из разбавленной плазмы на поверхность с первичной аминокислотной группой и большей углеводородной «ножкой» (Ст- R_2) по сравнению с ФБ приводит к уменьшению количества только обратимо адсорбируемого Гп (см. рис. 5). Напротив, для Ст- R_3 влияние белков плазмы крови сказывается только на необратимой составляющей адсорбции Гп. Необратимая составляющая адсорбции связана со взаимодействием адсорбируемых молекул с «жесткими» центрами адсорбции с большими значениями констант скоростей адсорбции и малыми значениями констант скоростей десорбции [6]. Чем больше «жестких» центров, тем выше селективность поверхности к адсорбции той или иной молекулы. Как следует из рис. 5, молекулы Гп имеют наибольшее сродство к адсорбции на поверхность с третичной аминокислотной группой (Ст- R_3) как в ФБ, так и в разбавленной плазме. Наибольшая конкуренция белков плазмы крови с Гп за специфическую адсорбцию на аминокислотные группы обнаружена для поверхностей Ст- R_1 и Ст- R_2 . Количество необратимо адсорбированного Гп в разбавленной плазме по сравнению с ФБ уменьшается в 12 и 3 раза для Ст- R_1 и Ст- R_3 соответственно. Для концевой группы $-R_2$ конкуренция с белками не сказывается на количестве необратимо адсорбированного Гп. В то же время количество обратимо адсорбированного Гп снижается для первичных аминокислотных групп и остается неизменным для третичной.

Для дополнительного доказательства высокой специфичности центров необратимой адсорбции на аминокислотсодержащих материалах к Гп, на модифицированной поверхности Ст формировали слой прочно связанного Гп. Для этого проводили адсорбцию Гп (объемная концентрация Гп в ФБ – 0,1 мг/мл, сдвиговая скорость – 50 с^{-1}) на испытуемые образцы, затем десорбцию буферным же раствором до выхода кривой на плато, оставляя лишь фракцию Гп, прочно связанную с поверхностью. Аналогичная процедура используется при гепаринизации медицинских изделий. Затем моделировали начало функционирования гепаринизированного изделия, замещая ФБ на плазму крови

человека, разведенную 1:50. Ни для одного из образцов вытеснение белками плазмы необратимо связанного Гп не было выявлено, что свидетельствует о высокой прочности комплексообразования Гп с аминокруппами.

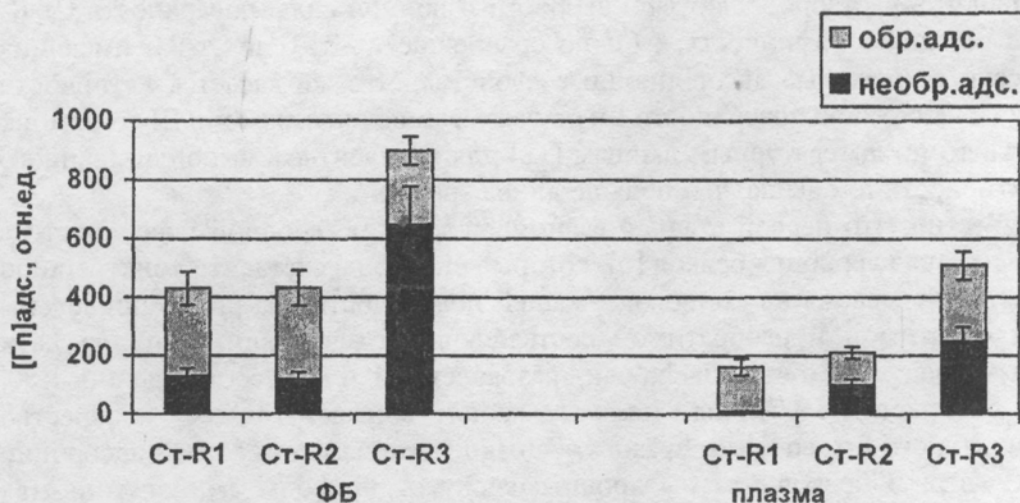


Рисунок 5.

Адсорбция Гп из ФБ и из разбавленной (1:50) плазмы крови человека (концентрация Гп - 0,1 мг/мл, сдвиговая скорость - 50 с^{-1}).

В порядке убывания аффинности исследуемых поверхностей к адсорбции Гп из ФБ и разбавленной плазмы их можно расположить в следующие ряды:

ФБ: Ст- R_3 > Ст- R_2 = Ст- R_1 ; Плазма: Ст- R_3 > Ст- R_2 > Ст- R_1 .

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что поверхность Ст- R_3 обладает повышенным сродством к необратимой адсорбции Гп по сравнению с Ст- R_1 и Ст- R_2 . Адсорбция Гп, обратимо адсорбирующегося на Ст- R_3 , в меньшей степени подвержена влиянию таких факторов как сдвиговая скорость, ионная сила раствора и белки плазмы крови. Существенное различие в адсорбционных свойствах Ст- R_1 и Ст- R_2 проявляется только при адсорбции Гп в условиях конкуренции за места связывания с белками плазмы крови. По-видимому, большая подвижность концевой аминокруппы - R_2 по сравнению с - R_1 и - R_3 за счет увеличенной «ножки» позволяет иммобилизованному Гп специфически взаимодействовать с некоторыми компонентами крови.

Согласно полученным данным можно сделать следующие практические рекомендации по гепаринизации изделий медицинского назначения, изготовленных из аминоксодержащих материалов:

1. Материалы, содержащие третичные аминокруппы, наиболее перспективны для создания самогепаринизируемой поверхности.

2. Иммобилизацию Гп на поверхность изделий целесообразно проводить в статических условиях из буферных растворов при физиологических значениях pH и концентрации Гп в растворе около 0,1 мг/мл.

Выводы.

1. При адсорбции гепарина из индивидуального раствора на аминоксодержащую поверхность определяющим фактором является природа концевой аминокруппы, а не ее подвижность или количество аминокрупп в

основной цепи. Наибольшее количество гепарина адсорбируется на поверхность с иммобилизованными третичными аминогруппами.

2. Показано, что количество необратимо адсорбированного из индивидуального раствора гепарина увеличивается при увеличении ионной силы раствора и не зависит от концентрации гепарина в растворе, а также от сдвиговой скорости раствора.

3. Гепарин, необратимо адсорбированный из индивидуального раствора на поверхности аминокислосодержащих материалов, не вытесняется белками при последующем контакте с плазмой крови.

4. При одновременной адсорбции гепарина и белков плазмы крови на аминокислосодержащую поверхность количество адсорбированного гепарина в отличие от адсорбции из индивидуального раствора определяется не только природой концевой аминогруппы, но и ее подвижностью.

5. Установлена зависимость между характером снижения адсорбированного гепарина в присутствии плазмы крови белков, природой аминогрупп и их подвижностью.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Севастьянов В.И., Немец Е.А., (1999) в кн.: Биосовместимость, М., с.295-346.
2. Barbucci R., Benvenuti M., Maso G.D., Nocentini M., Tempesti F., et al., (1989) *Biomaterials*, **10**, 299-308.
3. Nemets E., Karelskaya E., Sevastianov V., Anderson J., Harasaki H., Kim S.W. (1993) *ASAIOTransaction*, **39**, 731-733.
4. Ma X., Mohammad S.F., Kim S.W. (1992) *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 530-536.
5. Teng C-L. C., Kim J-S., Port F. K., Till G. O., Yang V.C., et al., (1988) *Trans. Am. Soc. Artif.Organs*, **34**, 743-746.
6. Севастьянов В.И. (1999) в кн.: Биосовместимость, М., с. 88-173.
7. Barbucci R., Albanese A., Magnani A., Tempesti F. (1991) *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1259-1274.
8. Ninomiya J., Tanaka S., Shoji T., Noishiki Y. (1995) *Artif. Organs*, **19**, 46-50.
9. Немец Е.А., Порунова Ю.В., Беломестная З.М., Севастьянов В.И. (1999), *Перспективные Материалы*, № 6, 36-41.
10. Неницеску К.Д. (1963) *Органическая химия*, М., Иностранная литература, **1**, 541.
11. Smith P.K., Malia A.K., Hermanson G.T. (1980) *Anal. Biochem.*, **466-473**.
12. Kim S.W., Feijen J. (1985) *CRC Crit. Rev. Biocomp.*, **1**, 229-260.

Поступила 22.09.00.

HEPARIN INTERACTION WITH AMINO GROUP-CONTAINING MATERIALS.

E.A. NEMETS¹, D.A. KASATOV², V.I. SEVASTIANOV^{1,2}.

¹Institute of Transplantology and Artificial organs, Moscow.

²Moscow Physical-Technical Institute.

The influence of the glass surface immobilized aminogroups nature and the experiments conditions on the interactions between heparin and aminogroups containing surface was studied using total internal reflections fluorescence. It was shown, that the nature of the terminating aminogroup, but not its mobility or the amount of the aminogroups in the main chain, is the major factor influencing the heparin adsorption from individual solution. Both the nature of terminating aminogroup and its mobility determine heparin adsorption on the aminogroups containing surfaces from the blood plasma proteins containing solution. Heparin irreversibly adsorbed from individual solution is not replaced by blood plasma proteins. The tertiary aminogroups containing surface adsorbs maximal quantity of the heparin.

Key words: amino groups, glass surface, heparin, interaction, heparinization of medical equipment.