

УДК 615.224:577.112.385.4

© Коллектив авторов

БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИЗИН-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ ИЗДЕЛИЙ, КОНТАКТИРУЮЩИХ С КРОВЬЮ

***Н.А. Самойлова^{1*}, М.А. Краюхина^{1,2}, С.П. Новикова², Л.И. Мухаметова³,
Р.Б. Айсина³, И.А. Ямсков¹***

¹Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва., ул. Вавилова, 28; тел.: 135-93-59; эл.почта: kmalexster@gmail.com

²Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Изучены биоспецифические свойства тромборезистентных бислойных и многослойных покрытий на основе полиэлектролитных комплексов модифицированного сополимера N-винилпирролидона и малеиновой кислоты (ВПМК) с хитозаном, амфифильным хитозаном или альбумином. ВПМК содержал аффинные лиганды к плазминогену – остатки α -аминосвязанного лизина. В качестве исследуемой поверхности использовали полиэтилен и полистирол до и после нанесения защитных полиэлектролитных покрытий.

Специфическую сорбцию фибринолитического профермента – плазминогена - оценивали в модельных системах с использованием плазминогена-стандарта, а также донорской плазмы крови. Установлено, что все покрытия с внешним контактном слоем из лизин-содержащего аффинного полимера обладали сродством к плазминогену. Тем не менее, многослойные полиэлектролитные покрытия оказались более эффективными, чем бислойные покрытия с однократным нанесением слоев, а также модельные системы с монослойным нанесением на модифицируемую поверхность аффинного полимера.

Снижение степени тромбогенности материалов, модифицированных полиэлектролитными покрытиями, было продемонстрировано в опытах *in vitro* и *ex vivo*.

Предложенная модификация поверхностей призвана улучшить гемосовместимость изделий медицинского назначения.

Ключевые слова: аффинный полимер, лизин, полиэлектролитное покрытие, адсорбция плазминогена, тромборезистентность

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Одной из серьёзных проблем применения искусственных материалов в медицинской практике (в частности, в сосудистой и кардиохирургии) является естественная реакция организма на контакт с инородным материалом, приводящая к тромбозам, гиперплазии, иммунным и воспалительным реакциям, и т.д. В связи с этим, возникает необходимость придания контактирующим с кровью медицинским изделиям новых свойств, таких как неиммунногенность, антимикробность, гемосовместимость, в частности, тромборезистентность [1].

Отсутствие точного знания о процессах, происходящих на границе фаз полимер-кровь, обуславливает применение различных подходов для придания тромборезистентных (гемосовместимых) свойств поверхностям, контактирующим с кровью. С этой целью используются адсорбция или ковалентное связывание веществ, повышающих гидрофильность контактирующей поверхности (например, водорастворимых полимеров – полиэтиленгликоля, поливинилпирролидона и т.д.). Также осуществляют иммобилизацию веществ, способных при контакте с нативной кровью специфически адсорбировать компоненты фибринолитической системы крови и антикоагулянты, что способствует саморегуляции тромборезистентных свойств инородных поверхностей. Кроме того, осуществляют иммобилизацию биологически активных соединений, влияющих на процесс тромбообразования, – фибринолитиков (стрептокиназа, урокиназа и т.д.), антикоагулянтов (гепарин, производные гепарина и др.), антиагрегантов (ацетилсалициловая кислота, дипиридамол и т.д.). Так, в нашей стране успешно применяется в клинической практике синтетический сосудистый протез “БАСЭКС”, обладающий, помимо прочих важных характеристик (антимикробности, нулевой хирургической пористости и т.д.), повышенными тромборезистентными свойствами, которые достигаются модификацией по уникальной технологии синтетической основы комплексом веществ, в состав которых входит известный антикоагулянт гепарин [2].

Помимо перечисленных применяют и биологический подход к созданию гемосовместимого покрытия – с использованием принципов биомиметики. Для этого на защищаемой поверхности иммобилизуют клетки сосудистого эндотелия человека и таким образом имитируют интиму реконструируемого сосуда. В этом случае возникает необходимость предварительной модификации синтетических подложек для улучшения адгезии клеток к ним, повышения клеточной пролиферации и т.д. Предлагается прививать на поверхности специфические белки, пептиды, красные кровяные клетки, лейкоциты и т.д. Например, описаны биосовместимые полиэлектролитные мультислойные плёнки, поверхностные свойства которых благоприятны для заселения эндотелиальными клетками [3]. Показано, что такие пленки улучшают клеточную адгезию к поверхности материала, обработанного ими, промотируют клеточную колонизацию. Описанный подход особенно актуален для обработки сосудистых протезов малого диаметра (меньше 6 мм), которые отличаются высокой степенью тромбогенности.

В настоящей работе исследованы биоспецифические свойства гидрофильных аутоselectивных тромборезистентных бислойных (БП) и мультислойных полимерных покрытий (МП) на основе полиэлектролитных комплексов (ПЭК), предназначенных для повышения гемосовместимых свойств изделий, контактирующих с кровью. Нами были модифицированы поверхности изделий из полиэтилена и полистирола – одних из наиболее гидрофобных и сложных для модификации полимеров. В качестве сополиэлектролитов использованы: поликатионы – известный полиаминосахарид хитозан (его модифицированное производное – амфифильный хитозан) и белок-полиамфолит (альбумин); полианион – синтетический аффинный полимер. В качестве такого

биоспецифического полимера нами предложен сополимер N-винилпирролидона с малеиновой кислотой (ВПК), несущий остаток α -аминосвязанного L-лизина, который является специфическим лигандом для зимогена фибринолиза - плазминогена. Получение таких покрытий было описано нами ранее [4]. Подобная модификация нацелена на то, что плазминоген из плазмы (крови) будет аффинно связываться с поверхностью и превращаться под действием эндогенных активаторов плазминогена - тканевого (t-PA) или урокиназного типа (scu-PA) - в плазмин - фермент, специфически лизирующий фибрин сгустка и тем самым обеспечивающий тромборезистентность полимерного материала.

Ранее были описаны тромборезистентные материалы на основе полиуретана с фотохимически присоединенным полиакриламидом, который содержал связанный по α -аминогруппе лизин [5, 6], а также декстран с ковалентно присоединенным лизином через дипептид L-цистеинил-L-лизин, таким образом, чтобы ε -аминогруппы лизина были доступны [7].

Предлагаемый нами вариант гидрофильного тромборезистентного покрытия отличается дешевизной, технологической простотой модификации поверхностей, доступностью и нетоксичностью используемых полимеров и растворителей.

Эффективность предложенных гидрофильных тромборезистентных покрытий была показана в системе *in vitro* с использованием раствора плазминогена-стандарта и цитратной плазмы крови, а также в системах *in vitro* (при контакте с донорской кровью) и *ex vivo* (при динамическом контакте с кровью лабораторного животного(собаки)).

МЕТОДИКА. Метод нанесения полиэлектролитных слоев на полиэтилен и полистирол был описан нами ранее [4]. Перед размещением защитных слоев поверхность подложки гидрофилизовали, таким образом получая гидрофильный полиэтилен (ГПЭ) или полистирол (ГПС). Бислойное покрытие (БП) представляло собой полиэлектролитный комплекс, состоящий из внутреннего слоя – хитозана или альбумина, и наружного слоя – аффинного полимера (АП). Мультислойное покрытие (МП) получали трехкратным чередованием внутреннего и наружного слоев. Использовали аффинный полимер двух типов: I тип (АП-1) содержал остатки как специфического лиганда (преимущественно) - лизина со свободной ε -аминогруппой (α -аминосвязанный лизин), так и некоторое количество неспецифического ε -аминосвязанного лизина; II тип полимера (АП-2) содержал только специфический лиганд. Соотношение α/ε -аминосвязанных остатков лизина в полимерах АП-I варьировалось в пределах 1,3-2,8. Количество α -аминосвязанного лизина в полимере АП-I варьировало в пределах 4,6-13,5 %мол., а в полимере АП-II – 7,6 - 21,3% мол., содержание неспецифического ε -аминосвязанного лизина находилось в пределах 5,9 – 10,1 %мол. Таким образом, в АП-I специфическим лигандом замещалось (при максимальной нагрузке) каждое 15 звено, а в АП-II – каждое 10 звено полимерной цепи.

Для биохимических исследований использовали: 96-луночные полистирольные микропланшеты производства “Biomedical” (Россия); плазминоген – фирмы “Sigma-Aldrich” (США); урокиназу (50 IU/ml) – “Green Cross” (Ю. Корея). Цитратная плазма крови человека была предоставлена Научным центром сердечно-сосудистой хирургии РАМН (Россия).

Адсорбция плазминогена на модифицированных поверхностях. Эксперимент проводили на однократно и многократно (МП) модифицированных бислойными покрытиями (БП) полистирольных плашках с использованием раствора плазминогена-стандарта (для БП) и цитратной донорской плазмы (для МП). Количество адсорбированных (иммобилизованных) полимеров АП-I и АП-II, несущих специфический лиганд, было одинаковым при единых условиях сорбции. АП-I и АП-II различались по содержанию специфического лиганда. Результаты измерений активности плазмина для исследуемых материалов были соотнесены с контролем и представлены в таблице 1 (а, б).

СВОЙСТВА ЛИЗИН-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ ПОКРЫТИЙ

Таблица 1. Количество адсорбированного плазминогена на полиэлектролитных покрытиях.

Промежу- точный слой	Аффинный плазменный слой	Содержание специфичес- кого лиганда в полимере, % М	Количество адсорбиро- ванного аффинного полимера, мкг/см ²	Плотность специфи- ческого лиганда на поверхности, нмоль/см ²	рН сорбции плазменного слоя	Количество адсорбированного плазминогена, нмоль/см ²	
а) бесслойное покрытие							
Хитозан	АП-I	18,4	2,0±0,3	1,83±0,55	5 7 11	2,09±0,05 1,29±0,03 0,86±0,07	
			0,01±0,005	0,09±0,02	5 7	1,30±0,06 1,26±0,04	
	АП-II	8,3	2,0±0,3	0,77±0,23	5 7 11	2,50±0,05 1,71±0,08 0,94±0,07	
			0,01±0,005	0,04±0,02	5 7	1,39±0,06 1,22±0,03	
	Контроль*	0	2,0±0,3 0,01±0,005	0	-	0,64±0,05 0,49±0,06	
	Альбумин	АП-I	18,4	2,0±0,3	1,83±0,55	5 7 11	5,08±0,03 5,11±0,07 4,06±0,06
				0,01±0,005	0,09±0,02	5 7	6,82±0,05 5,75±0,05
		АП-II	8,3	2,0±0,3	0,77±0,23	5 7 11	6,45±0,06 5,75±0,08 5,33±0,03
0,01±0,005				0,04±0,02	5 7	5,98±0,04 4,83±0,05	
Контроль*		0	2,0±0,3 0,01±0,005	0	-	3,06±0,03 3,49±0,03	
б) многослойное покрытие							
Поли- стирол (без промежу- точного слоя)		АП-I	18,4	7,4±0,7	6,8±0,6	5	1,61±0,05
		Контроль*	0	7,4±0,7	0		0,20±0,02
	АП-II	8,3	7,4±0,7	2,8±0,3	5	11,51±0,08	
			1,2±0,3	0,5±0,1	5	0,68±0,03	
	Контроль*	0	7,4±0,7 1,2±0,3	0		0,20±0,02	
Хитозан	АП-I	18,4	7,4±0,7	6,8±0,6	5	11,03±0,06	
			1,2±0,3	1,1±0,3	5	23,50±0,08	
	Контроль*	0	7,4±0,7 1,2±0,3	0	5	3,62±0,05	
Альбумин	АП-I	18,4	7,4±0,7	6,8±0,6	5	11,22±0,06	
			1,2±0,3	1,1±0,3	5	27,82±0,05	
	Контроль*	0	7,4±0,7 1,2±0,3	0	5	4,12±0,03	

Примечание: * - в качестве контрольных использовали поверхности, модифицированные полимером, не содержащим аффинных лигандов (ВПМК).

Лунки полистирольных микропланшет (за исключением контрольных) после гидрофилизации были модифицированы БП или МП, как было описано нами ранее [3]. В каждую лунку добавляли по 250 мкл 0,1 М трис-HCl буфера (0,15 М NaCl, pH 7,4) и инкубировали ночь при 4°C. Затем буфер удаляли и наносили в лунки по 200 мкл раствора 2 мкМ плазминогена в буфере или

цитратную плазму. После 3-х часов инкубации при комнатной температуре раствор плазминогена (или плазму) удаляли, и лунки трижды промывали 0,05 М трис-НСl буфером, содержащим 0,15 М NaCl (pH 8,3) для удаления несвязанного белка. Далее в каждую лунку помещали по 200 мкл раствора 50 IU/ml урокиназы (UK) и выдерживали 30 мин при комнатной температуре (для полного превращения плазминогена в плазмин). После удаления раствора UK лунки трижды промывали 0,05 М трис-НСl буфером (0,15 М NaCl pH 8,3). Затем в лунки добавляли по 200 мкл 0,6 мМ раствора субстрата плазмина H,D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251, "Serva", Германия) в том же буфере и регистрировали увеличение оптической плотности при 405 нм через каждые 60 сек в течение часа при комнатной температуре. Из тангенсов углов наклона кривых $A_{405} - t$ вычисляли скорость гидролиза субстрата плазмином. Концентрацию сорбированного плазмина определяли по калибровочной зависимости скорости гидролиза субстрата от концентрации стандартного плазмина. На основании полученных данных рассчитывали количество сорбированного на поверхности плазминогена. Результаты эксперимента представлены в таблице 1 (а, б) и на рисунке.

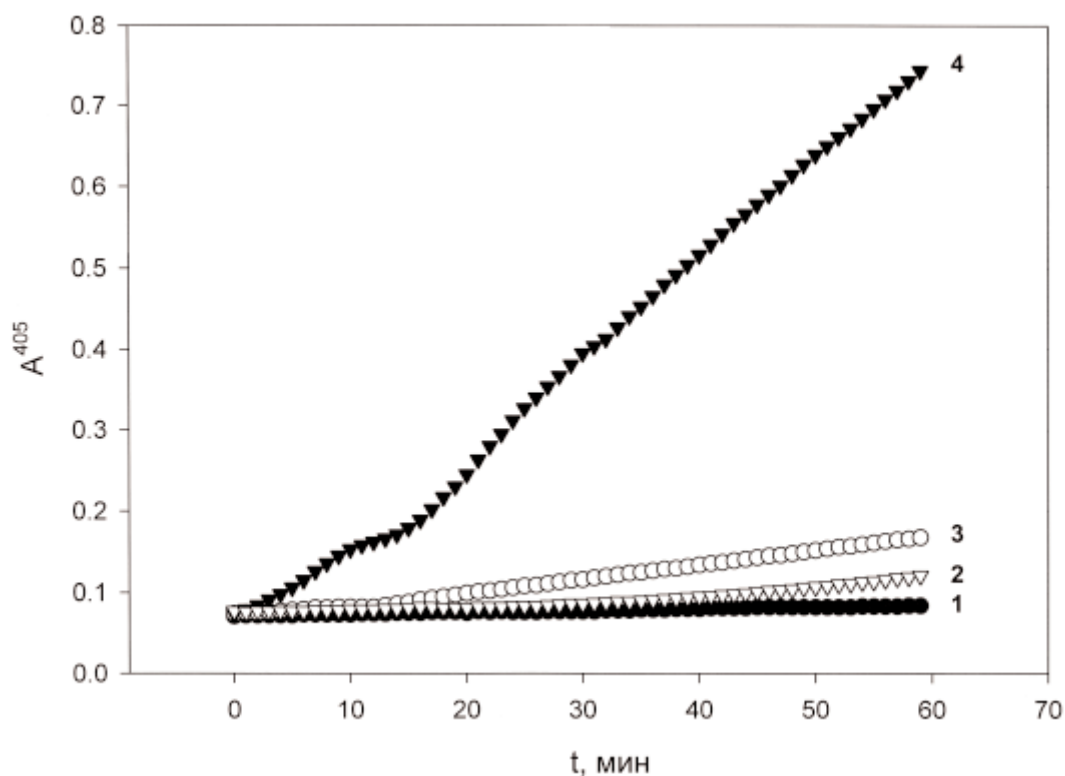


Рисунок.

Энзиматическая активность плазминогена, адсорбированного из плазмы, после обработки урокиназой:
 1 – ГПС-ВПК (контроль); 2 – ГПС-АП-II ($0,5 \pm 0,1$ нмоль/см² специфического лиганда);
 3 – ГПС-АП-I ($6,8 \pm 0,6$ нмоль /см² специфического лиганда); 4 – ГПС-АП-II ($2,8 \pm 0,3$ нмоль /см² специфического лиганда)

Экспресс-метод оценки степени тромбогенности покрытий (in vitro и ex vivo).
 Для определения тромборезистентности (степени тромбогенности) материалов, модифицированных БП, применяли специальное устройство, разработанное в лаборатории химии и технологии материалов НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН [8]. В основе экспресс-методики лежит сравнительная оценка количества тромботических масс, адсорбировавшихся на поверхности полимерных трубок при различных временах контакта с кровью.

Конструкция устройства позволяла экспериментальным образцам находиться в одинаковых гидродинамических условиях перфузии. В опытах *in vitro* через устройство прокачивали донорскую кровь со скоростью 350 мл/мин с помощью перистальтического насоса. В острых экспериментах *ex vivo* устройство подключали по типу экстракорпорального артерио-венозного шунта к кровотоку экспериментального животного (собаки). Гравиметрически оценивали количество тромботических масс, адсорбированных на стенках модифицированных и контрольных материалов. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием *t*-распределения Стьюдента ($p=0,05$; $n=3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Гидрофильное тромборезистентное покрытие, обладающее аффинным сродством к плазминогену, исследовали с помощью биохимических методов в системе *in vitro* и *ex vivo*.

Сорбция плазминогена. А. Бислойное покрытие (БП). Из приведённых данных (табл. 1) видно, что количество адсорбированного плазминогена зависело от условий нанесения полиэлектролитных слоев. Наибольшая сорбция плазминогена (табл. 1а) достигалась при формировании аффинного слоя при pH 5 как на промежуточном слое хитозана, так и на альбумине. Такой результат согласуется с ранее полученными нами данными по исследованию образования полиэлектролитных комплексов [9], которые показали, что в диапазоне pH 4-6 степень ионизации сополиэлектролитов максимальна, вследствие чего в этой области происходит наиболее полное связывание ионогенных групп макромолекул друг с другом. В данном случае, по-видимому, наружный аффинный слой сорбировался в такой конформации, при которой специфический лиганд стерически более доступен лизин-связывающим участкам молекулы плазминогена, расположенным на кринглах его тяжелой цепи.

В случае формирования наружного слоя из АП-II по сравнению с АП-I (как для хитозана, так и для альбумина использованных в качестве промежуточных слоев), несмотря на меньшее количество специфического лиганда, достигалась лучшая адсорбция плазминогена. То есть, лучшие результаты были получены при использовании внешнего покрытия из полимера, содержащего только активную форму лиганда – α -аминосвязанный лизин, чем из полимера, содержащего в своём составе также неактивную форму лизина.

Бислойное покрытие с промежуточным слоем альбумина оказалось эффективным, чем с промежуточным слоем хитозана, как при большем ($2,0 \pm 0,3$ мкг/см²), так и при меньшем ($0,01 \pm 0,005$ мкг/см²) содержании аффинного полимера (АП) на поверхности.

Мы предполагаем, что, по-видимому, покрытие на подложках адсорбируется неравномерно как в объеме, так и на плоскости. Ранее [10], при изучении плёнок хитозана, полученных из растворов уксусной кислоты, было замечено, что частицы хитозана на поверхности имеют такую же форму надмолекулярных образований, как и в растворе – сферическую. Известно также, что модификация альбумином происходит в таких условиях, что белковые макромолекулы на поверхности имеют фибриллярную структуру [11-13]. Вследствие этого наружный слой АП, адсорбируется, по-видимому, согласно “рисунку” поверхности промежуточного слоя, а также собственным конформационным особенностям. В результате дизайн поверхности БП с промежуточным слоем из альбумина позволял адсорбироваться наибольшему количеству плазминогена. К тому же, альбумин – транспортный белок крови и, согласно своей природе, имеет сродство к плазминогену. Поэтому большие величины активности плазмينا, наблюдаемые нами, можно объяснить ещё и возможной фоновой сорбцией плазминогена на непокрытых АП участках альбуминового слоя, которую трудно дифференцировать.

Структура поверхности промежуточного слоя хитозана, по-видимому, соответствует типу “dilute nonoverlapping “mushrooms”” [14], в результате активные сайты адсорбированного АП доступны лишь на выступающих наружных частях “mushrooms”. Этот фактор, по-видимому, также влияет на более низкую сорбцию плазминогена на этих образцах БП в сравнении с образцами БП с промежуточным слоем альбумина.

Б. Мультислойное покрытие (МП). Для последующих исследований мы получали модифицированные аффинными полимерами и аффинными полиэлектролитными комплексами планшеты с многократным нанесением полимерных слоев (МП) и рассчитывали количество неактивного профермента плазминогена, сорбированного из донорской плазмы, посредством измерения активности его активированной формы – плазмина. Результаты приведены в таблице 1(б) и на рисунке.

На рисунке представлены кинетические кривые гидролиза S-2251 плазмином, сорбированным на контрольной (наружный слой – ВПМК без аффинного лиганда) и модифицированных АП-I и АП-II полистирольных поверхностях. Из графика видно, что значительная плазминовая активность наблюдалась только в случае АП-II (содержащего только активную форму лизина) с большим содержанием аффинного слоя на поверхности ($7,4 \pm 0,5$ мкг/см²).

Эффективность биоспецифических покрытий на основе мультислойных ПЭК возрастала по сравнению с вышеописанными БП, а также многократно нанесенным на подложку АП без промежуточных слоев хитозана или альбумина (табл. 1 а, б). Данный эффект, по-видимому, можно объяснить более полным покрытием исходной подложки полимерами. Кроме того, возможно, что аффинный лиганд конформационно более доступен на поверхностях, модифицированных полиэлектролитным комплексом, чем на подложках, модифицированных только АП. В результате, заметная адсорбция плазминогена отмечена даже в случае покрытий с наружным слоем менее активного АП-I в составе мульти-полиэлектролитных комплексов по сравнению с тем же покрытием, но нанесенным непосредственно на полистирол (табл. 1б): количество адсорбированного плазминогена (пропорциональное активности плазмина) на МП на порядок превышало количество плазминогена, адсорбированного на покрытиях без промежуточных слоёв.

Исследование тромборезистентности покрытий. Гемостаз представляет собой очень сложную полифакторную и динамически неустойчивую систему. В связи с этим, до сих пор остаются не выясненными многие аспекты тромбообразования на поверхности искусственных материалов. До настоящего времени не найдены физико-химические параметры, по-которым можно было бы однозначно оценить гемосовместимость исследуемых материалов, не существует унифицированной системы оценки тромборезистентности.

В данной работе тромборезистентность полученных материалов мы исследовали в модельных опытах *in vitro* и *ex vivo* с помощью специального метода, позволяющего провести сравнительную оценку количества тромботических масс, адсорбировавшихся на исследуемых поверхностях. В качестве контрольных материалов использовали нативный полиэтилен (ПЭ), полиэтилен, модифицированный альбумином (ПЭ-СА) и полиэтилен, модифицированный комплексом альбумин-гепарин (ПЭ-СА-ГП). Опытные образцы трубок, покрытые альбумином, модифицировали однократно аффинным полимером АП-I (содержание аффинного лиганда в полимере 18,4% моль). В эксперименте исследовали образцы с покрытиями БП1 ($2,0 \pm 0,3$ мкг/см² полимера АП-I, $0,77 \pm 0,23$ нмоль/см² специфического лиганда) и БП2 ($0,01 \pm 0,05$ мкг/см² полимера АП-I, $0,09 \pm 0,02$ нмоль/см² специфического лиганда). Динамика пристеночного тромбообразования (зависимость адсорбции тромботических масс на поверхности материалов от времени инкубации) приведена в таблице 2.

СВОЙСТВА ЛИЗИН-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ ПОКРЫТИЙ

Таблица 2. Адсорбция тромботических масс на поверхностях материалов в зависимости от времени контакта с кровью.

Образец	Время контакта с кровью, мин	Масса пристеночного тромба, мкг/см ²
а) <i>in vitro</i>		
ПЭ	0	0
	60	93,1
	120	122,3
	180	123,5
ПЭ-СА-ГП	0	0
	60	61,7
	120	69,3
	180	58,6
ПЭ-СА-БП1	0	0
	60	26,3
	120	26,6
	180	23,0
ПЭ-СА-БП2	0	0
	60	24,3
	120	24,7
	180	26,2
б) <i>ex vivo</i>		
ПЭ-СА	0	0
	6	0
	9	46,4
	15	392,6
ПЭ-СА-ГП	0	0
	6	9,2
	9	81,0
	15	158,3
ПЭ-СА-БП1	0	0
	6	5,9
	9	29,7
	15	217,3
ПЭ-СА-БП2	0	0
	6	3,0
	9	39,3
	15	245,3

Эксперименты *in vitro* (табл. 2а) показали, что образцы полиэтилена, модифицированного ГП и БП, при взаимодействии с кровью проявляли повышенную тромбозистентность: количество осевших тромботических масс на поверхности материалов за время экспозиции с кровью 60-180 минут составило около 25 и 70 мкг/см² для БП1,2 и ГП, соответственно, в то время как на контрольных ПЭ поверхностях количество адсорбированных масс было значительно больше – от 100 до 125 мкг/см².

В системе *ex vivo* (табл. 2б) за время перфузии крови относительное количество массы пристеночного тромба на образцах с БП составило 10-50% от контроля. Количество тромботических масс на поверхности этих материалов при максимальном времени контакта с кровью находилось в пределах 200-250 мкг/см²; степень тромборезистентности этих образцов была несколько ниже, чем образцов с иммобилизованным гепарином. Покрытия ГПЭ-СА-БП1,2, также как и покрытия ГПЭ-СА-ГП, были значительно менее тромбогенны, чем контрольные образцы ПЭ-СА, на которых при максимальном времени экспозиции с кровью адсорбировалось около 400 мкг/см² тромботических масс. Кроме того, эксперименты *in vitro* и *ex vivo* показали, что как покрытие БП2, так и покрытие БП1 эффективно снижали тромбогенность ПЭ, несмотря на меньшее содержание аффинного полимера на поверхности БП2 (по сравнению с БП1). Такой результат совпадает с данными по сорбции плазминогена *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В составе предложенных в настоящей работе полиэлектролитных тромборезистентных аутоselectивных покрытий использованы нетоксичные вещества: лизин-содержащий полимер, альбумин – один из важнейших белков-полиамфолитов плазмы крови, составляющий по массе больше половины её белкового состава, и полисахарид хитозан (или его модифицированное производное). Хитозан – биосовместимый промышленно доступный полимер. Молекула хитозана содержит в каждом моносахаридном звене функциональные группы, которые могут участвовать в образовании водородных и ионных связей.

В качестве промежуточных слоев покрытий использовали хитозан или альбумин, а в качестве наружного контактного слоя – аффинные полимеры, содержащие специфический лиганд к плазминогену (АП-I и АП-II). Более эффективным был полимер АП-II, однако, с точки зрения дешевизны и технологической простоты синтеза, более предпочтителен аффинный полимер I типа [4].

Промежуточный слой из хитозана или альбумина способствовал более полному закрытию тромбогенной поверхности, прочному сцеплению с подложкой аффинного полимерного слоя, кроме того (за счет ионного связывания) – снижению избыточной кислотности наружного биоспецифического слоя и экспонированию аффинного лиганда на поверхности.

Предложенные бислойные/мультислойные покрытия на основе полимерных комплексов с биоспецифическими свойствами показали возможность повышения гидрофильности и тромборезистентности полиолефиновых (полистирольных) материалов в системах *in vitro*. Полученные нами данные по исследованию гемосовместимости полученных материалов в модельных опытах *in vitro* и *ex vivo* с помощью специального метода, позволяющего провести сравнительную оценку количества тромботических масс, адсорбировавшихся на поверхности исследуемых материалов, подтвердили эффективность предложенных полиэлектролитных покрытий. Есть основание предполагать, что БП, нанесенные на имплантаты, будут способствовать снижению степени тромбогенности контактирующих с кровью изделий, используемых в клинической практике.

Такой принцип модификации поверхности имеет ряд других достоинств. Данный подход позволяет достаточно легко получать, например, антимикробные гидрофильные полиэлектролитные покрытия. С этой целью в состав наружного слоя поликомплекса можно ввести биологически активные вещества – ангидридные группы исходного сополимера малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном в мягких условиях в отсутствие конденсирующих веществ могут реагировать с amino- или оксигруппами таких лекарственных средств.

Используемые нами покрытия достаточно устойчивы при физиологических значениях pH и ионных сил [9]. Кроме того, существует возможность ковалентной сшивки слоев покрытия с модифицируемой подложкой, каждого из полимерных слоев, а также наружного и внутреннего слоев друг с другом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Севастьянов В.И. (ред.) (1999) Биосовместимость. ИЦ ВНИИГеосистем, М.
2. Бокерия Л.А., Абдулгасанов Р.А., Спиридонов А.А., Тутов Е.Г., Новикова С.П. (2002) *Анналы хирургии*, **2**, 26-33.
3. Boura C., Menu P., Payan E., Picart C., Voegel J.C., Muller S., Stoltz J.F. (2003) *Biomaterials*, **24**, 3521-3530.
4. Samojlova N.A., Krayukhina M.A., Yamskov I.A. (2004) *J. Chromatography B, Anl. Tech. in the Biomed. & Life Sci.*, **800** (1-2), 263-269.
5. McClung W.G., Clapper D.L., Hu S.-P., Brash J.L. (2000) *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**, 409-414.
6. McClung W.G., Clapper D.L., Hu S.-P., Brash J.L. (2001) *Biomaterials*, **22**, 1919-1924.
7. Warkentin P.H., Johansen K., Brash J.L., Lundstrom I. (1998) *J. Colloid Interface Sci.*, **199**, 131-139.
8. Доброва Н.В., Новикова С.П. (1996) Устройство для исследования тромборезистентных свойств материалов. – Авторское свидетельство № 1799, РФ.
9. Самойлова Н.А., Краюхина М.А., Ямсков И.А. (2002) *Ж. физ. химии*, **76**, 1660-1665.
10. Тутова Е.Ф., Белавцева Е.М., Гамзазаде А.И., Скляр А.М., Павлова С.А., Рогожин С.В. (1986), *Acta Polymerica*, **37** (2), 121-124.
11. Rudee M.L., Price T.M. (1985) *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 57-66.
12. Новикова С.П. (1995) в: *Биопротезы клапанов сердца. Проблемы и перспективы* (ред. Барбараш Л.С., Барбараш Н.А., Журавлева И.Ю.) Кемеровский полиграфкомбинат, Кемерово, сс. 266-288.
13. Andrade J.D. (1985) *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*, London: Plenum Press, N.Y.
14. Unsworth L.D., Tun Z., Sheardown H., Brash J.L. (2005) *J. Colloid Interface Sci.*, **281**, 112-121.

Поступила: 24. 07. 2007.

**BIOSPECIFIC PROPERTIES OF LYSINE-CONTAINED POLYELECTROLYTE COATINGS
FOR DEVICES CONTACTING BLOOD**

N.A. Samoilova¹, M.A. Krayukhina^{1,2}, S.P. Novikova², L.I. Moukhametova³, R.B. Aisina³, I.A. Yamskov¹

¹Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, 28 ul. Vavilova, Moscow, 119991 Russia; tel.: (495) 135-9359; e-mail: kmalexster@gmail.com

²Bakulev Research Center of Cardiovascular Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, 135 Roublevskoye shosse, Moscow, 121552 Russia

³School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119992 Russia

Biospecific properties of thromboresistant bilayer and multilayer coatings based on polyelectrolyte complexes of modified copolymer of *N*-vinylpyrrolidone and maleic acid (VPMA) with chitosan, amphiphilic chitosan or albumin were investigated. VPMA contained affinity ligand towards plasminogen – α -amino coupled lysine residues. Polyethylene and polystyrene surfaces were investigated before and after their covering by protective polyelectrolyte coatings

The specific adsorption of plasminogen (precursor of the fibrinolytic enzyme plasmin) from its solutions and from human plasma was investigated using these model systems. It was found that all coatings with the outer contact lay of lysine-contained affinity polymer had affinity to plasminogen. But multilayer polyelectrolyte coatings were more efficient than bilayer coatings with single application of layers and the affinity polymer coatings without interlayer.

The decrease in thrombogenicity degree of the materials modified by polyelectrolyte coatings was shown *in vitro* and *ex vivo*.

Employment of proposed modification of surfaces will improve hemocompatibility of medical devices.

Key words: affinity polymer, lysine, polyelectrolyte coating, thromboresistance.