

ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ГУБЧАТЫХ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СЫРЬЯ

¹Грехнева Е.В., ¹Ванина А.С.*, ¹Кондратова А.Н., ²Воробьев В.И., ²Нижникова Е.В., ¹Ефанов С.А.

¹*Курский государственный университет*

²*Калининградский государственный технический университет*

*vanina.nast.05@gmail.com

Благодаря своим физико-химическим свойствам коллаген является универсальной основой для гемостатических покрытий. Данное исследование направлено на получение гемостатических губок на основе коллагена рыбной чешуи. Для модификации свойств коллагеновой губки в состав вводили эфиры целлюлозы, которые использовались до этого индивидуально. Было проведено сравнительное исследование физико-механических и эксплуатационных свойств полученных губок.

Ключевые слова: коллаген, рыбная чешуя, гемостатические свойства, эфиры целлюлозы, импланты.

POSSIBILITIES OF OBTAINING COLLAGEN SPONGE IMPLANTS BASED ON ALTERNATIVE RAW MATERIALS

¹Grekhnyova E.V., ¹Vanina A.S., ¹Kondratova A.N., ²Vorobyev V.I., ²Nizhnikova E.V., ¹Efanov S.A.

¹*Kursk State University*

²*Kaliningrad State Technical University*

Due to its physicochemical properties, collagen is a universal basis for hemostatic coatings. This study is aimed at obtaining hemostatic sponges based on fish scale collagen. To modify the properties of the collagen sponge, cellulose esters were introduced into the composition, which were previously used individually. A comparative study of the physicommechanical and operational properties of the obtained sponges was carried out.

Keywords: collagen, fish scales, hemostatic properties, cellulose esters, implants.

Введение

На сегодняшний день среди средств местного гемостаза наибольшей востребованностью пользуются гемостатические губки на основе коллагена. Преимуществом коллагена в сравнении с синтетическими полимерами является то, что он полностью утилизируется организмом. Вследствие обратимости связей в комплексах коллаген при введении в макроорганизм способен подвергаться лизису [1]. При повреждении сосуда коллаген первым контактирует с кровью и форменными элементами вызывая их адгезию и активируя тромбоциты что способствует свёртыванию крови. Большую роль в процессе гемостаза играет гигроскопичность материала. Коллагеновые губки способны поглощать большое количество тканевого экссудата; также способствуют поддержанию влажности среды, при этом защищая от механических травм и бактериальных инфекций.

Значительно менее распространены, но очень эффективны гемостатические покрытия на основе производных целлюлозы. Применение местных рассасывающихся гемостатических материалов из окисленной целлюлозы позволяет контролировать гемостаз при операционных вмешательствах, что снижает риск возникновения послеоперационных осложнений.

Можно привести большое количество примеров губчатых имплантов, используемых современной медициной. Из коллагеновых губок это: «ТахоКомб» (Такеда, Австрия), губка коллагеновая кровоостанавливающая (РФ, Зеленая Дубрава), губка гемостатическая коллагеновая (РФ, Лужский завод «Белкозин»). Рынок целлюлозных губок сформирован в основном компанией «Джонсон и Джонсон» (США), а именно препараты «Таботамп», «Серджисел фибриллар» и др. При этом среди коммерческих губчатых покрытий нет материалов смесевой природы, что с нашей точки зрения, могло бы значительно расширить спектр применимости гемостатических имплантов.

Среди коллагеновых покрытий на современном рынке наиболее распространены материалы на основе коллагена крупного рогатого скота (КРС). Указанные материалы обладают неоспоримыми достоинствами: отсутствие токсических свойств, слабая антигенность, высокая механическая прочность, способность образовывать комплексы с биологически активными веществами [1]. Однако болезни КРС устанавливают ограничения, связанные с использованием такого коллагена и его производных. Во-первых, его очистка трудна и дорогостояща. Во-вторых, коллаген, получаемый из сырья бычьего происхождения, запрещен в индуизме, а свиного – в исламских и еврейской странах из-за религиозных убеждений. Следовательно, существует острая необходимость в разработке источника коллагена, альтернативного тканям наземных млекопитающих.

В настоящее время спрос на рыбную продукцию значительно вырос. При производстве продуктов рыбного содержания образуется большое количество побочных отходов в виде кожи, костей, внутренностей, голов, чешуи и т. д. Выделение и использование коллагена из таких материалов может решить задачу снижения белоксодержащих отходов (30-70 % от исходного сырья), образующихся при производстве рыбной продукции [2]. В литературе встречается большое количество работ, посвященное изготовлению гемостатических имплантируемых материалов из рыбного коллагена и коллагена морского происхождения. Однако коллаген, выделенный из рыбьей чешуи, для этих целей до настоящего времени не рассматривался.

Данная работа представляет собой пилотное исследование возможности применения коллагена рыбьей чешуи в качестве основы для создания матрикса гемостатических губчатых имплантов. Для модификации свойств коллагеновой губки, а также для расширения выбора раневых покрытий мы провели работу по получению композиционных губок, в состав которых входил не только коллаген, но и эфиры целлюлозы, которые использовались до этого индивидуально.

Эксперимент

Материалы. В работе использовали: гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) – Alfa Aesar CAS Number: 9004-65-3 (вязкость 2 % в H₂O 40-60 сП); натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы Alfa Aesar CAS Number: 9004-32-4: низковязкая (low viscosity: вязкость 4 % раствора в воде 50-200 сП), средневязкая (medium viscosity: вязкость 2 % раствора в воде 400-800 сП), высоковязкая (high viscosity: вязкость 1 % раствора в воде 1500-3000 сП); метилцеллюлозу Alfa Aesar CAS Number: 9004-67-5 (вязкость 2 % в воде 300-560 сП); глутаровый альдегид (ГА) CAS: 111-30-8; глиоксаль CAS: 107-22-2; глицерин- CAS: 56-81-5.

Методика получения коллагеновой губки. Навеску коллагена диспергируют в воде (для получения коллагеновой губки) или в водном растворе выбранного эфира целлюлозы (для получения смесевой губки) для получения 5 % (масс.) дисперсии. К полученной дисперсии добавляют рассчитанное количество сшивающего агента, соляной кислоты и глицерина. Диспергирование ведут в режиме ультразвуковой кавитации на ультразвуковой ванне ВУ-09-«Я-ФП»-03 в течение 30-60 мин. Полученные таким образом смеси переливают в специальные ёмкости, замораживают при температуре -80 °С и высушивают на лиофильной сушилке Alpha 1-2 LD plus, производства MartinChrist (Германия). В результате получают упругие плотные губки толщиной 3-5 мм.

Методы исследования

Методика оценки сорбционных свойств. Пробу образца в виде круглого диска диаметром 1 см взвешивали на аналитических весах, помещали в ёмкость с водой и выдерживали в течение 5, 15 и 30 минут. По истечении времени образцы извлекали из воды, удаляли поверхностную влагу с помощью фильтровальной бумаги и снова взвешивали. Водопоглощение рассчитывали по формуле (1)

$$W_x = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \cdot 100, \quad (1)$$

где W_x – водопоглощение за некоторое время, %; M_2 – масса набухшего образца через x минут, г; M_1 – масса исходного образца, г.

Методика оценки эластичности при изгибе. Образец накладывают на стержень наибольшего диаметра (20 мм) и, плотно прижимая его к стержню, плавно изгибают в течение 1–2 сек. на 180° вокруг стержня, затем образец в месте изгиба рассматривают на наличие трещин и разрывов. Если эти дефекты отсутствуют, то производят изгибание губки последовательно от стержня большего диаметра к меньшему до тех пор, пока не будут обнаружены указанные выше дефекты [4].

Результаты и их обсуждение

Выше были отмечены преимущества рыбьей чешуи как с экологической, так и с экономической точек зрения, в качестве сырья для получения коллагена. Полученный «сухим» способом [6] коллаген представляет собой волокнистый материал белого цвета, похожий на вату, обладающий высоким адсорбирующим потенциалом. Он хорошо набухает в воде, что дало нам основание использовать его в качестве основы для гемостатических губок.

Для формирования материала, устойчивого в воде и в биологических жидкостях, необходимо было использовать сшивающий агент. Традиционно в качестве сшивающего агента используется глутаровый альдегид. Он является эффективным кросс-линкером, так как образует стабильные шивки лизина, а также полимеризует и сшивает остатки лизина на больших расстояниях друг от друга. Обычно 6–8 молекул ГА участвуют в одной шивке «лизин–лизин» [3]. Так как мы имеем коллаген не в виде водного раствора, а в виде микроволокон различного размера (фракция более 2,5 мкм), необходимо было определить целесообразность применения сшивающего агента в различных количествах. Экспериментально было установлено, что оптимальной является концентрация 5 % от массы полимера. Глубина шивки обуславливает скорость деградации материала повязки, а также ее физические и эксплуатационные характеристики. Ввиду некоторых недостатков глутарового альдегида, связанных с его неконтролируемой реакционной способностью, в качестве сшивающего агента использовался также глиоксаль [5]. Для обеспечения полноты реакции последующее применение ГА и глиоксаля проводилось в кислой среде. В работе использовали соляную кислоту, которая выступала в качестве катализатора процесса шивки [7]. Получаемые губки должны быть мягкими и эластичными, при эксплуатации не разрушаться от механических воздействий, поэтому обязательным является применение пластификатора, в качестве которого использовали глицерин. Состав и свойства губок, изготовленных на основе коллагена представлены в табл. 1.

Таблица 1

Состав и свойства коллагеновых губок

Полимер	Сшивающий агент	Наличие пластификатора (глицерин)	Влагопоглощение (5 минут)	Гибкость (минимальный диаметр стержня), см	Устойчивость в воде, часы	Толщина губки, см
Коллаген	–	–	1360,92 %	1	65	0,35
	ГА	–	1625,04 %	1	120	0,32
	Глиоксаль	–	1219,13 %	1	113	0,33
	ГА + HCl	–	1525,81 %	1	180	0,31
		+	1435,34 %	0,2	190	0,30
Глиоксаль + HCl	–	1216,38 %	1	142	0,34	

Как отмечалось выше коллаген, как родственный человеческим тканям материал, не будет вызывать аллергическую реакцию и отторжение. Эфиры целлюлозы обладают гемостатическими свойствами, гидрофильны, за счет чего могут впитывать большое количество раневого экссудата. С этой точки зрения получение композиционной губки могло значительно расширить возможности раневых покрытий. Для каждой серии губок провели комплекс исследований: водопоглощение, прочность на изгиб и устойчивость в воде. Максимальное (показательное) количество воды, которое может поглотить материал, фиксируется в первые 5 минут. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Состав и свойства смесевых губок

Эфир целлюлозы	Сшивающий агент	Наличие пластификатора (глицерин)	Влагопоглощение (5 минут)	Гибкость (минимальный диаметр стержня), см	Устойчивость в воде, часы	Толщина губки, см
КМЦ (low)	ГА + HCl	–	1370,06 %	1	140	0,30
	ГА	–	2082,97 %	1	130	0,31
	Глиоксаль + HCl	–	1178,44 %	1	135	0,30
КМЦ (med)	ГА	–	1388,73 %	1	70	0,34
КМЦ (high)	ГА	–	1636,63 %	1	80	0,32
МЦ	ГА	–	1457,17 %	1	115	0,36
ГПМЦ	ГА + HCl	–	1368,23 %	1	180	0,32
		+	1324,57 %	0,2	190	0,30
	Глиоксаль + HCl	–	1284,21 %	1	166	0,34
	ГА	–	1329,96 %	1	170	0,31
	Глиоксаль	–	1169,97 %	1	142	0,33

Таким образом, установили, что более устойчивыми и имеющими большее влагопоглощение являются материалы, сшитые глутаровым альдегидом в присутствии соляной кислоты. Губки, содержащие только коллаген, рыхлые, но достаточно устойчивы в водном растворе в течение двух суток, полная деградация приходится на вторую половину третьих суток. Однако образцы, содержащие, помимо основного полимера, эфиры целлюлозы, были намного плотнее, устойчивее; в водном растворе их деградация протекает значительно дольше, чем у простых коллагеновых губок. Особой устойчивостью обладают композиционные материалы, вторым полимером которых является гидроксипропилметилцеллюлоза. Даже при длительном выдерживании в водном растворе губки сохраняли упругость и свою структуру.

Выводы

Резюмируя все вышесказанное, можно заключить, что в ходе данного исследования нами была показана принципиальная возможность создания медицинских покрытий на основе коллагена, выделенного из рыбной чешуи.

Установлено, что для получения стабильных материалов необходимо добавление в композицию глутарового альдегида в качестве кросс-линкера и соляной кислоты, как катализатора сшивки в количествах 5 % от массы сухого коллагена. Добавление пластификатора улучшает органолептические и механические свойства получаемых изделий.

Помимо изготовления медицинских покрытий на основе рыбного коллагена, нами была показана возможность создания композитных материалов, сочетающих в своем составе белковый компонент и производные целлюлозы. Использование в качестве второго полимера гидроксипропилметилцеллюлозы придает материалам особые физико-механические свойства, в частности, увеличивает прочность изделий.

Тем самым, в ходе нашей работы выявлено, что для расширения спектра применения коллагеновых покрытий целесообразно комбинировать несколько полимеров.

Библиография

1. Сторублевцев С.А. Коллагены животных и рыб в получении медицинских препаратов // Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение. 2014. Т. 1. С. 345–347.
2. Ковалев, А.Н. Коллаген некоторых видов рыб и беспозвоночных // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: Материалы VI Международной научно-технической конференции, Владивосток, 2020. Т. 2. С. 45–48.
3. Нашекина, Ю.А. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине // Цитология. 2020. Т. 62, № 7. С. 459–472.
4. ГОСТ 6806-73 (СТ СЭВ 2546-80) «Материалы лакокрасочные. Метод определения эластичности пленки при изгибе».
5. Yoshioka S.A, Goissis G. Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2008. V. 19, N 3. P. 1215–1223.
6. Воробьев В.И., Нижникова Е.В. Получение фракций коллагена и гидроксиапатита из рыбьей чешуи // Известия КГТУ. 2021. № 62. С. 80–91.
7. Kim K.J., Lee S.B., Han N.V. Kinetics of crosslinking reaction of PVA membrane with glutaraldehyde // Korean Journal of Chemical Engineering. 1994. V. 11. P. 41–47.