



(51) МПК

A61L 27/28 (2006.01)*A61L 27/20* (2006.01)*A61L 27/36* (2006.01)*A61F 2/24* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012156376/15, 25.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.12.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.12.2012

(45) Опубликовано: 10.06.2014 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2384348 С2, 20.03.2010. ЕА 009598
В1, 28.02.2008 . ЕА 009809 В1, 28.04.2008

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Центр трансфера
технологий, Дьяченко О.Г.

(72) Автор(ы):

Чащин Иван Сергеевич (RU),
Галлямов Марат Олегович (RU),
Хохлов Алексей Ремович (RU),
Бакулева Наталия Петровна (RU),
Костава Вахтанг Тенгизович (RU),
Лютова Ирина Геннадиевна (RU),
Залепугин Дмитрий Юрьевич (RU),
Тилькунова Наталия Александровна (RU),
Чернышова Ирина Валерьевна (RU),
Григорьев Тимофей Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова" (МГУ) (RU),
Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Научный центр сердечно-
сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева"
Российской академии медицинских наук
(RU),
Федеральное государственное унитарное
предприятие "Государственный завод
медицинских препаратов" (RU),
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки "Институт
элементоорганических соединений им. А.Н.
Несмеянова Российской академии наук" (RU)

(54) БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕРИКАРДИАЛЬНЫЙ ПРОТЕЗ КЛАПАНА СЕРДЦА С ХИТОЗАНОВЫМ ПОКРЫТИЕМ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к сердечно-сосудистой хирургии. Описан способ нанесения хитозанового покрытия на поверхность перикарда биологического протеза клапана сердца путем нанесения хитозана прямым методом из абсолютно биосовместимого для организма человека неиммуногенного растворителя, обладающего антимикробными свойствами, - воды, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, на перикард

биологического протеза клапана сердца, предварительно обработанного 0,625% глутаровым альдегидом. Способ нанесения хитозана из воды, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, позволяет повысить эффективность и сроки функционирования в организме биологического протеза клапана сердца за счет исключения возможности образования на его поверхности осадка кальция, улучшить эластичность, усилить антимикробные

свойства в результате присутствия на его поверхности хитозанового покрытия. Решается техническая задача получения неиммуногенных биологических протезов клапанов сердца,

устойчивых к кальцификации, обладающих антимикробными свойствами. 2 н. и 10 з.п. ф-лы, 1 ил., 4 табл., 12 пр.

R U 2 5 1 9 2 1 9 C 1

R U 2 5 1 9 2 1 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61L 27/28 (2006.01)*A61L 27/20* (2006.01)*A61L 27/36* (2006.01)*A61F 2/24* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012156376/15, 25.12.2012**(24) Effective date for property rights:
25.12.2012

Priority:

(22) Date of filing: **25.12.2012**(45) Date of publication: **10.06.2014** Bull. № 16

Mail address:

119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V.
Lomonosova, Tsentr transfera tekhnologij,
D'jachenko O.G.

(72) Inventor(s):

**Chashchin Ivan Sergeevich (RU),
Galljamov Marat Olegovich (RU),
Khokhlov Aleksej Removich (RU),
Bakuleva Natalija Petrovna (RU),
Kostava Vakhtang Tengizovich (RU),
Ljutova Irina Gennadievna (RU),
Zalepugin Dmitrij Jur'evich (RU),
Til'kunova Natalija Aleksandrovna (RU),
Chernyshova Irina Valer'evna (RU),
Grigor'ev Timofej Evgen'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Moskovskij
gosudarstvennyj universitet imeni M.V.
Lomonosova" (MGU) (RU),
Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie "Nauchnyj tsentr serdechno-
sosudistoj khirurgii imeni A.N. Bakuleva"
Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk (RU),
Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatije "Gosudarstvennyj zavod
meditsinskikh preparatov" (RU),
Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki "Institut
ehlementoorganicheskikh soedinenij im. A.N.
Nesmejanova Rossijskoj akademii nauk" (RU)**

(54) BIOLOGICAL CHITOSAN COATED PERICARDIAL VALVE PROSTHESIS AND METHOD FOR MAKING IT

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is described is a method for applying a chitosan coating on a pericardial surface of a biological heart valve prosthesis by direct chitosan application from a non-immunogenic solvent absolutely biocompatible with a human body and possessing antimicrobial properties, - high-pressure carbonated water, onto the pericardium of the biological heart valve prosthesis pre-processed with 0.625% glutaric aldehyde. The method for chitosan coating from high-pressure

carbonated water enables providing higher effectiveness and prolonged functioning of the biological heart valve prosthesis ensured by avoiding formation of deposited calcium on the surface, providing better elasticity, enhancing antimicrobial properties enabled by the chitosan coating on the surface.

EFFECT: making the non-immunogenic calcification resistant biological heart valve prostheses possessing the antimicrobial properties.

12 cl, 1 dwg, 4 tbl, 12 ex

Область техники

Изобретение относится к медицине, а именно к производству протезов клапанов сердца для сердечно-сосудистой хирургии.

Предшествующий уровень техники

5 Современные механические протезы клапанов сердца имеют значительный срок службы, но требуют пожизненного применения антикоагулянтов - препаратов, разжижающих кровь, например варфарина, а также ежемесячного контроля свертывающей системы крови. Антикоагулянты предназначены для профилактики образования тромбов в полостях сердца. Биологические протезы клапанов сердца, 10 напротив, не требуют применения антикоагулянтов, поскольку их створки сформированы из перикарда животных, в основном свиньи или теленка, родственного по своему составу заменяемому клапану человека, включая родственность физико-химических свойств поверхности. Биологические протезы клапанов сердца имеют гемодинамические свойства, сходные с показателями нормальных клапанов человека, 15 в результате чего отмечается гораздо меньшее повреждение эритроцитов и меньший риск тромбообразования. Перикард животных перед использованием в качестве материала для биопротеза клапана сердца обрабатывают раствором глутарового альдегида с целью его химической стабилизации и устранения видоспецифичности, способной приводить к иммунному ответу организма человека.

20 Известен способ получения перикарда для биологических протезов клапанов сердца (Патент РФ №2120212), включающий обработку в растворе 0,625% глутарового альдегида и поверхностно-активного вещества (ПАВ). В качестве ПАВ используют, например, 1% раствор додецилсульфата натрия. Недостатками данного способа являются невысокие характеристики получаемого в результате химической обработки 25 перикарда биологического протеза клапана сердца в плане биосовместимости и достижимого срока службы, поскольку в перикарде остается заметное количество непрореагировавших альдегидных групп, что может провоцировать цитотоксичность биологического протеза клапана сердца, и вызывать его кальцификацию. Действительно, известно, что наличие свободных остаточных альдегидных групп, контактирующих с 30 элементами крови, является основным фактором отложения фосфатов кальция на поверхности биологического протеза клапана сердца, что приводит к выходу клапана из строя.

Известно изобретение, позволяющее снизить интенсивность развития кальцификации биологического протеза клапана сердца для повышения срока его функционирования 35 в организме (Патент РФ №2372945). Это достигается путем его предварительной обработки гексаном для очистки поверхности, затем смесью реактивов на основе полиэтиленгликоля (пленкообразующий компонент) и триацетоксисилана (добавляется в качестве отвердителя). Недостатками данного способа обработки перикарда являются: 1) потенциальная возможность недостаточной полноты конверсии 40 реагентов, способных привести к цитотоксичности и иммунному ответу, 2) потенциальная возможность неравномерности сшивки перикарда, 3) проблема контроля толщины покрытия (излишне толстое и жесткое покрытие может ухудшить механико-эластичные свойства получаемого биологического протеза клапана сердца и его гемодинамические характеристики), 4) использование реактивов не природного 45 происхождения, что может провоцировать цитотоксичность.

Задача создания покрытия для обеспечения биосовместимости поверхности перикарда и предотвращения его кальцификации должна быть решена использованием соединений, по своей химической природе близких нативным, покрытие из которых не нарушало

бы основных преимуществ биологических протезов клапанов сердца, а также обладало малой толщиной и оптимальными механическими характеристиками.

Известен патент, касающийся антикальцификационной обработки биологического протеза клапана сердца (Патент США №7422607), в котором предложена совокупность 5 способов предобработки перикарда, включая предобработку диальдегидами с силоксановыми или перфторуглеродными группами, в том числе в сочетании с аминогруппами в составе молекул, в том числе нанесением из растворов, эмульсий или суспензий в сверхкритической двуокиси углерода. Утверждается, что данные способы 10 позволяют уменьшить кальцификацию биологического протеза клапана сердца и устранить видоспецифичность биологического протеза клапана сердца. Однако поскольку данные способы основаны на использовании диальдегидов, подобных глутаровому, то проблема остаточных непрореагировавших альдегидных групп в перикарде остается нерешенной в рамках раскрытых в патенте способов, что может 15 аналогичным образом провоцировать кальцификацию биологического протеза клапана сердца. Кроме того, использование материалов не природного происхождения снижает биосовместимость и повышает цитотоксичность биологического протеза клапана сердца.

Известен способ химической обработки перикарда биологического протеза клапана сердца (Патент РФ №2384348). Данный способ включает химическую стабилизацию 20 перикарда раствором глутарового альдегида с последующей обработкой 1% раствором додецилсульфата натрия, при этом химически стабилизированный перикард дополнительно обрабатывают 0,05÷0,25% водным раствором хитозана или металлсодержащего хитозана при pH 3-5. Снижение интенсивности процессов кальцификации на перикарде биологического протеза клапана сердца при данном 25 способе обработки обусловлено нанесением прямым методом хитозановых макромолекул на поверхность перикарда, в результате которого происходит маскирование свободных остаточных альдегидных групп ковалентным связыванием с аминогруппами хитозановых макромолекул. Исследования влияния покрытия хитозаном биологических протезов клапанов сердца на процессы кальцификации 30 представлены в источниках [Gamzazade A, Electron microscopy of the coating morphology of pericardium tissue with chitosan ionogen derivatives / Gamzazade A, Bakuleva N, Belavtseva E, Gallyamov M. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. - 2009. - V.73. - P.468-470; Chanda J, Anticalcification treatment of pericardial prostheses / Chanda J. // Biomaterials - 1994. - V.15. - P.465-469; Nogueira G, Bovine pericardium coated with biopolymeric films as an alternative to prevent calcification: in vitro calcification and cytotoxicity results / Nogueira G, Rodas A, Weska R, Aimoli C, Higa O, Maizato M, Leiner A, Pitombo R, Polakiewicz B, Beppu M. // Mater. Sci. Eng. C. - 35 2010. - V.30. - P.575-582; Polak R, Inhibition of calcification of bovine pericardium after treatment with biopolymers, E-beam irradiation and in vitro endothelization / Polak R, Rodas A, Chicoma D, Reinaldo G, Beppu M, Higa O, Pitombo R. // Mater. Sci. Eng. C. - 2012. - V.30. - P.575-582]. Из анализа указанных источников следует, что данный способ нанесения хитозана на 40 перикард, стабилизированный глутаровым альдегидом, позволяет увеличить долговечность и биосовместимость биологических протезов клапанов сердца, изготовленных из перикарда, за счет повышения их гидрофильности, понижения цитотоксичности и склонности к кальцификации.

Данный способ получения покрытия наиболее близок к заявляемому. Однако недостаток данного способа нанесения хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца связан с использованием раствора уксусной кислоты в качестве 45 растворителя, что может приводить к аллергическим реакциям или иным негативным

откликам организма на остаточный растворитель в модифицированном нанесении хитозанового покрытия биологического протеза клапана сердца в силу возможной гиперчувствительности или индивидуальной непереносимости [Wuethrich B, Allergic and intolerance reactions to wine / Wuethrich B // Allergology. - 2011. - V.34(8). - P.427-436; Przybilla B, Alcohol-induced anaphylaxis - allergy to the ethanol metabolite acetic acid / Przybilla B, Ring J, Galosi A // Allergology. - 1986. - V.9(4). - P.164-169]. Кроме того, остающиеся в получаемом покрытии по завершении процесса нанесения следы остаточного растворителя и связанные с хитозановыми цепями уксуснокислые анионы могут приводить к избыточному набуханию и деламинации покрытия в присутствии водной среды организма, что может ухудшить механические свойства покрытия биологического протеза клапана сердца.

В заявляемом изобретении предлагается использовать способ нанесения хитозанового покрытия на перикард биологического протеза клапана сердца из растворов в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении. Сведения о подобном способе нанесения хитозановых покрытий отсутствуют в научно-технической литературе. Нами установлено, что хитозан, нерастворимый в обычной воде при нейтральном значении pH, может быть растворен в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, в силу частичной конверсии воды в угольную кислоту и, как следствие, достижения кислотности среды значений pH ~3. В этих условиях хитозановые цепи протонируются, приобретают положительный заряд и растворяются. Таким образом, заявляемый способ нанесения хитозана на биологический протез клапана сердца прямым методом из раствора в сравнении со своим наиболее близким аналогом отличается тем, что в качестве растворителя хитозана используется вода, насыщенная углекислым газом при высоком давлении. Как оказалось, данный способ обработки биологического протеза клапана сердца обеспечивает абсолютно биосовместимое нанесение хитозана на перикард, причем покрытие отличается повышенной механической стабильностью.

Действительно, связанные с хитозаном карбонатные HCO_3^- -анионы нестабильны и в процессе высушивания покрытия после нанесения отделяются от аминогрупп хитозановой цепи вместе с протонами. В результате, с одной стороны, образуются абсолютно безвредные для организма человека компоненты: вода и углекислый газ, а с другой стороны, хитозановые цепи остаются незаряженными и, как следствие, неспособными к последующему избыточному набуханию в присутствии нейтральной водной среды крови (значение pH около 7,4). Кроме того, оказалось, что данный способ обработки биологического протеза клапана сердца не требует его последующей стерилизации после нанесения покрытия.

Таким образом, техническим результатом настоящего изобретения является получение хитозанового покрытия, благодаря которому биологический протез клапана сердца имеет рекордные характеристики в плане подавления кальцификации в сочетании с отсутствием каких-либо следов растворителя, обладает повышенными антимикробными и биосовместимыми характеристиками, а также высокой и долговременной механической стабильностью.

При этом технический результат является комплексным:

Во-первых, хитозановое покрытие, наносимое из водной среды, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, обеспечивает эффективное маскирование свободных альдегидных групп глутарового альдегида. Такое маскирование, как известно, способствует существенному снижению интенсивности процессов кальцификации на поверхности биологического протеза клапана сердца [Kuribayashi R, Efficacy of the chitosan posttreatment in calcification prevention of theglutaraldehyde-treated

porcine aortic noncoronary cusp implanted in the right ventricular outflow tract in dogs / Kuribayashi R, Chanda J, Abe T. // *Artificial organs*. - 1996. - V.20(7). - P.761-766; Shanthi C, Chitosan modified poly(glycidyl methacrylate-butyl acrylate) copolymer grafted bovine pericardial tissue - anticalcification properties / Shanthi C, Rao K. // *Carbohydr. polymer*. - 2001. - V.40(2). - P.123-131; Rodas A, Cytotoxicity and endothelial cell adhesion of lyophilized and irradiated bovine pericardium modified with silk fibroin and chitosan. / Rodas A, Polak R, Hara P, Lee E, Pitombo R, Higa O. // *Artificial Organs*. - 2011. - V.35(5). - P.502-507]. Более того, при нанесении хитозана заявляемым способом на перикард обнаружилась неожиданно высокая степень подавления кальцификации биологического протеза клапана сердца по сравнению с наиболее близким аналогом, по-видимому, вследствие повышенной однородности нанесения и повышенной механической стабильности покрытия.

Во-вторых, нанесение хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца методом прямого осаждения из таких растворов способствует понижению цитотоксичности и иммуногенности биологического протеза клапана сердца в связи с использованием абсолютно биосовместимого растворителя: воды, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, которая после декомпрессии спонтанно и полностью переходит в абсолютно безопасные для организма человека гипоаллергенные компоненты: воду и углекислый газ. Действительно, изменением внешнего давления можно изменять степень насыщения углекислым газом, и, соответственно, pH водной среды, меняя ее способность растворять хитозан [Sakai Y, A novel method of dissolving chitosan in water for industrial applications / Sakai Y, Hayano K, Yoshioka H, Yoshioka H. // *Polym. J.* - 2001. - V.33. - P.640-642].

В-третьих, среда, в которой проводится нанесение хитозана на перикард, имеет стерилизующие свойства. Действительно, при высоком давлении, молекулы углекислого газа, растворенные в воде, диффундируют в бактерии, споры бактерий, вирусы и биологически инактивируют их [Ellis J, (2010) Supercritical CO₂ sterilization of ultra-high-molecular weight polyethylene / Ellis J. // *J. Supercrit. Fluids*. - 2010. - V.52. - P.235-240]. Благодаря этому свойству среды можно исключить дополнительную стерилизацию клапана сердца после нанесения хитозанового покрытия, и тем самым упростить технологический процесс подготовки биологического протеза клапана сердца для последующей хирургической операции.

В-четвертых, нанесение хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца методом прямого осаждения из растворов хитозана в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, способствует образованию более прочной связи хитозана с белковыми компонентами перикарда по сравнению с хитозаном, связанным с ацетат-анионами уксусной кислоты, которые образуются при нанесении хитозана на перикард из уксусной кислоты. Действительно, вследствие слабого связывания карбонат-анионов с поликатионными цепями молекул хитозана, изначально протонированные в угольной кислоте (воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении) цепи хитозана теряют заряд при понижении давления до атмосферного и высушивании нанесенного хитозанового покрытия. Таким образом, в условиях внутренней среды организма потерявшие заряд цепи хитозана не имеют сродства к воде, что приводит к лучшей механической стабильности нанесенного хитозанового покрытия. Напротив, при нанесении хитозана из растворов уксусной кислоты, соединения хитозановых цепей с ацетат-анионами будут более устойчивыми по сравнению с соединениями хитозановых цепей с карбонат-ионами. Хитозановые цепи в покрытии, нанесенном из растворов уксусной кислоты, будут удерживать некоторый остаточный положительный заряд и будут окружены ацетат-анионами, сохраняя

определенное сродство к воде, в результате, такое покрытие будет механически менее стабильным в среде крови и может деламинироваться. Поэтому, в процессе эксплуатации биологического протеза клапана сердца, покрытие, нанесенное из растворов хитозана в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, покажет лучшие механические характеристики, большую долговременную стабильность, меньшую способность к набуханию и деламинации в среде крови в сравнении с покрытием, нанесенным из растворов уксусной кислоты. Таким образом, в сравнении с аналогом, достигается увеличение срока службы биологического протеза клапана сердца.

Указанный комплексный технический результат достигается тем, что в качестве полимера для покрытия поверхности биологического протеза клапана сердца используется хитозан, а в качестве растворителя хитозана при его нанесении на перикард используется вода, насыщенная углекислым газом при высоком давлении.

В качестве метода нанесения целесообразно использовать прямой метод нанесения хитозана на перикард непосредственно из раствора.

Нанесение хитозана на перикард целесообразно проводить из заранее приготовленного раствора хитозана в воде, насыщенной углекислым газом под давлением.

Нанесение хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца из растворов воды, насыщенной углекислым газом, и хитозана целесообразно проводить при давлении 100-300 атм, поскольку при данном давлении обеспечивается достаточная кислотность среды для растворения хитозана и повышаются ее стерилизующие свойства.

Нанесение хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца из растворов в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, целесообразно проводить при температуре 15-35°C.

Нанесение хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца из растворов воды, насыщенной углекислым газом при высоком давлении, и хитозана целесообразно проводить в течение 2-4 часов.

В качестве хитозана для покрытия биологического протеза клапана сердца целесообразно использовать хитозан с низкой молекулярной массой для лучшей растворимости.

В дальнейшем изобретение поясняется графиками, описанием конкретных примеров его выполнения со ссылками на сопутствующие графики.

На чертеже изображена схема нанесения хитозанового покрытия на перикард биологического протеза клапана сердца. Нанесение производят с помощью установки, состоящей из баллона с CO₂ (1), системы соединяющих кранов и капилляров (2), регулятора давления (3), автоклава (4). Перед созданием высокого давления CO₂ перикард биологического протеза клапана сердца (5) помещают в автоклав, содержащий воду и навеску хитозана (6). Затем в автоклаве создают высокое давление CO₂ и тем самым осуществляют нанесение.

Способ реализуется следующим образом.

Способ нанесения хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца осуществляется непосредственно из раствора хитозана в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении.

В качестве хитозана предпочтительно использовать низкомолекулярный хитозан с молекулярной массой 15000-50000 г/моль, поскольку использование полимера с меньшей, чем в указанном интервале, молекулярной массой не обеспечит достаточной механической стабильности хитозанового покрытия, а полимер с большей, чем в

указанном интервале, молекулярной массой будет обладать недостаточной растворимостью в воде, насыщенной углекислым газом для нанесения на перикард.

Предпочтительно, чтобы нанесение хитозана происходило из заранее приготовленного 0,1-2% раствора хитозана в воде, насыщенной углекислым газом, поскольку меньшая, чем в указанном интервале, концентрация полимера не приведет к достаточной для маскирования альдегидных групп и механической стабильности толщине хитозанового покрытия, а большая, чем в указанном интервале, концентрация нецелесообразна с экономической точки зрения.

Для того чтобы хитозан полностью растворился в воде, насыщенной углекислым газом, предпочтительно проводить первичное растворение хитозана в автоклаве при давлении P=100-300 атм и температуре 15-35°C в течение 5-7 суток с периодическим помешиванием раствора.

Нанесение хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца, стабилизированный глутаровым альдегидом, производится прямым методом из раствора хитозана в воде, насыщенной углекислым газом в автоклаве.

В частности, в качестве автоклава, в котором происходит нанесение хитозана и приготовление его раствора, можно использовать автоклавы, предназначенные для работы со сверхкритическими флюидами, рассчитанные на давления более 100 атм.

В частности, время экспозиции полимера может быть 1-6 часов, поскольку более длительное воздействие условий осаждения может приводить к ухудшению механических характеристик перикарда биологического протеза клапана сердца (возможно, за счет экстракции эластина), а меньшие времена экспозиции недостаточны для формирования однородного и механически стабильного хитозанового покрытия на перикарде.

В частности время декомпрессии автоклава должно быть не менее 2-15 мин. При меньших временах декомпрессии возможен срыв хитозанового покрытия с поверхности биологического протеза клапана сердца вместе с потоком углекислого газа и воды.

Заявляемое изобретение может быть проиллюстрировано следующими примерами.

Пример 1

Перикард биологического протеза клапана сердца в виде пластин площадью 30 см² и толщиной 0,4-0,5 мм, предварительно обработанный 0,625% раствором глутарового альдегида, несколько раз тщательно промывают стерильным физиологическим раствором с 6-кратной сменой раствора из расчета 500-550 мл на 100 г перикарда, отмытый перикард погружают в автоклав с раствором хитозана фирмы Aldrich (сорт «low molecular weight», каталожный номер 448877) в дистиллированной воде, насыщенной углекислым газом при давлении 300 атм. На чертеже показана схема установки для нанесения хитозана на перикард биологического протеза клапана сердца. Раствор предварительно приготавливают по следующей методике: в автоклав помещают навеску хитозана в количестве 0,1% по весу раствора, затем наливают дистиллированную воду до половины объема автоклава, затем нагнетают углекислый газ до давления в автоклаве 100 атм, после этого оставляют растворяться хитозан в течение 5 суток при температуре 20°C с периодическим помешиванием раствора, путем установки автоклава на магнитную мешалку в процессе приготовления раствора. Давление в установке сбрасывают, и перикард биологического протеза клапана сердца погружают в раствор хитозана. Затем в автоклав нагнетают углекислый газ до давления 100 атм. В этих условиях происходит нанесение хитозана на перикард в автоклаве при температуре 20°C в течение 2 часов.

Пример 2

Перикард отмывают согласно условиям примера 1, отмытый перикард погружают

в автоклав с раствором хитозана фирмы Aldrich (сорт «low molecular weight», каталожный номер 448877) в дистиллированной воде, насыщенной углекислым газом под давлением 300 атм. Раствор предварительно приготавливают по следующей методике: в автоклав погружают навеску хитозана в количестве 1% по весу, затем наливают
5 дистиллированную воду до половины объема автоклава, затем нагнетают углекислый газ до давления в автоклаве 200 атм, после этого оставляют растворяться хитозан в течение 5 суток при температуре 25°C с периодическим помешиванием раствора, путем установки автоклава на магнитную мешалку. Давление в установке сбрасывают, и перикард биологического протеза клапана сердца погружают в раствор хитозана. Затем
10 в автоклав нагнетают углекислый газ до давления 200 атм. В этих условиях происходит нанесение хитозана в автоклаве при температуре 25°C в течение 4 часов.

Пример 3

Раствор хитозана готовится аналогично методике, указанной в примерах 1 и 2, за исключением того, что в автоклав погружают навеску хитозана в количестве 0,5% по
15 весу и растворение хитозана происходит при температуре 15°C. Нанесение проводится по методике, указанной в примере 1, за исключением того, что осуществляется при температуре 15°C.

Пример 4

Раствор хитозана готовится аналогично методике, указанной в примере 2, за
20 исключением того, что растворение хитозана происходит при температуре 30°C. Нанесение хитозана проводится по методике, указанной в примере 2, за исключением того, что осуществляется при температуре 30°C.

Пример 5

Раствор хитозана готовится аналогично методике, указанной в примере 2. Нанесение
25 хитозана проводится по методике, указанной в примере 2, за исключением того, что осуществляется при давлении 300 атм.

Пример 6

Перикард отмывают согласно условиям примера 1, отмытый перикард помещают в автоклав с навеской низкомолекулярного гидролизованного хитозана ГХ-4 (ММ
30 19000 г/моль, СА 15%, исходно: поставки ЗАО Сонат или Aldrich (сорт «low molecular weight», каталожный номер 448877)) в количестве 1% и дистиллированной водой до половины объема автоклава, затем нагнетают углекислый газ до давления в автоклаве 300 атм, после этого оставляют систему в течение 7 суток при температуре 20°C с периодическим помешиванием раствора. В этом случае процессы растворения хитозана
35 и формирования хитозанового покрытия на поверхности биологического протеза клапана сердца проходят параллельно.

Пример 7

Перикард отмывают согласно условиям примера 1, отмытый перикард помещают в автоклав с растворенным низкомолекулярным гидролизованным хитозаном ГХ-4
40 (ММ 19000 г/моль, СА 15%, исходно: поставки ЗАО Сонат) в растворе дистиллированной воды. Раствор предварительно приготавливают по следующей методике: в автоклав помещают навеску хитозана ГХ-4 в количестве 1% по весу, затем наливают дистиллированную воду до половины объема автоклава, затем нагнетают углекислый газ до давления в автоклаве 300 атм, после этого оставляют растворяться
45 хитозан в течение 7 суток при температуре 20°C с периодическим помешиванием раствора.

После того как перикард биологического протеза клапана сердца погружают в раствор хитозана, в автоклав нагнетают углекислый газ до давления 300 атм. После

проводят нанесение хитозана в автоклаве при температуре 20°C в течение 4 часов.

Сравнительный пример 1

Перикард биологического протеза клапана сердца в виде пластин площадью 30 см² и толщиной 0,4-0,5 мм, предварительно обработанный 0,625% раствором глутарового альдегида, несколько раз тщательно промывают стерильным физиологическим раствором с 6-кратной сменой раствора из расчета 500-550 мл на 100 г перикарда, таким образом получают исходный нативный перикард, предварительно обработанный глутаровым альдегидом без хитозанового покрытия.

Сравнительный пример 2

Согласно наиболее близкому аналогу (Патент РФ №2384348) перикард отмывают, как и в примере 1, отмытый перикард помещают в 50 мл (10 г/50 мл) 0,25% водного раствора хитозана с молекулярной массой 4-10³ г/моль и pH 5 и обрабатывают в течение 20 мин при 25°C. По окончании обработки перикард фиксируют в 70% водном растворе этанола и затем перикард с фиксированным первичным хитозановым покрытием выдерживают в 0,50% водном растворе N-сульфосукцината хитозана с молекулярной массой 10⁴ при pH 5 в течение 20 мин при 20°C с последующей фиксацией полученного покрытия в абсолютном этаноле.

Сравнительный пример 3

Перикард отмывают согласно условиям примера 1, отмытый перикард погружают в 1% весовой раствор хитозана фирмы Aldrich (сорт «low molecular weight», каталожный номер 448877) в 2%-ной уксусной кислоте. Раствор предварительно приготавливают по следующей методике: хитозан Aldrich в количестве 1% от веса раствора погружают в 2% раствор аскорбиновой кислоты. Раствор перемешивают на магнитной мешалке в течение 2 часов. Нанесение хитозана на перикард проводится согласно условиям примера 1.

Пример 8

Перикард, полученный согласно примерам 1-7, и перикард, полученный по сравнительным примерам 1-3, тестируют на механическую стабильность хитозанового покрытия, для этого их помещают в ультразвуковую диспергирующую ванну на 15 мин. После этого поверхность перикарда, полученного по примерам 1-7 и сравнительным примерам 1-3, исследуют с помощью сканирующего электронного микроскопа (например, Hitachi SU 8000). Перикард, полученный согласно сравнительным примерам 1-3, имеет поверхность с шероховатой морфологией, характерной для нативного перикарда, в отличие от поверхности перикарда, полученного согласно примерам 1-7, где поверхность образца имеет более гладкую однородную морфологию, типичную для хитозановых покрытий. Таким образом, можно сделать вывод о механической стабильности хитозанового покрытия на перикарде, полученного согласно примерам 1-7, в отличие от хитозанового покрытия на перикарде, полученного согласно сравнительным примерам 2-3.

Пример 9

Перикард, полученный согласно примерам 1-7, и перикард, полученный по сравнительному примеру 1, тестируют на биосовместимость. Для этого в культуру клеток фибробластов мышцы линии NIH/3T3 вносят экстракты, приготовленные согласно ГОСТ Р ИСО 10993-12-2009 в физиологическом растворе при условиях, близких к условиям эксплуатации перикарда биологического протеза клапана сердца (температура 37°C, время экстракции 72 ч) из образцов перикарда, полученного согласно примерам 1-7 и сравнительному примеру 1. Через 24 ч инкубации оценивают морфологию и лизис

клеток.

В таблице 1 приведены данные исследований образцов перикарда, полученных согласно примерам 1-7, и образцов перикарда, полученных согласно сравнительному примеру 1. Проведенные испытания показали, что экстракты из образцов полученного согласно сравнительному примеру 1 перикарда оказывают незначительное цитотоксическое действие на культуру фибробластов мышцы линии NIH/3T3, экстракты из образцов перикарда, полученных согласно примерам 1-7, не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мышцы линии NIH/3T3

Представленные результаты показывают снижение цитотоксичности модифицированного покрытием хитозана из воды, насыщенного углекислым газом, биологического протеза клапана сердца по сравнению с биологическим протезом клапана сердца, только предобработанным глутаровым альдегидом.

Образец	Реакция	Выводы
Перикард, полученный согласно сравнительному примеру 1	Незначительная	Незначительная цитотоксичность
Перикард, полученный согласно примерам 1-7	Отсутствует	Не цитотоксично

Пример 10

Перикард, полученный согласно примерам 1-7, и перикард, полученный по сравнительному примеру 1, тестируют на антимикробность.

На образцы перикарда, полученного согласно примерам 1-7, и перикарда, полученного по сравнительному примеру 1, наносят тест-культуры, затем определяют количество жизнеспособных клеток тест-культур на поверхностях образцов. Для интерпретации полученных данных используют понятия индекс адгезии и степень адгезии.

В качестве тест-культур выбирают клинические штаммы: грамположительные - *Staphylococcus aureus* MR (MRSA - метициллинрезистентный золотистый стафилококк) и *Staphylococcus haemolyticus*, грамотрицательные - *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* в концентрации 10^6 Кл/мл.

В Таблице 2 показаны результаты исследования антимикробных свойств образцов перикарда, полученного согласно примерам 1-7, и перикарда, полученного согласно сравнительному примеру 1.

Образцы	Тест-культуры, концентрация 10^6 Кл/мл							
	Грамположительные микроорганизмы				Грамотрицательные микроорганизмы			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	Индекс адгезии, Кл/пл	Степень адгезии, %	Индекс адгезии, Кл/пл	Степень адгезии, %	Индекс адгезии, Кл/пл	Степень адгезии, %	Индекс адгезии, Кл/пл	Степень адгезии, %
Перикард, полученный согласно примеру 1-7	0	0	0	0	$2,0 \times 10^3$	2,0	$3,04 \times 10^3$	3,04
Перикард, полученный согласно сравнительному примеру 1	10^6	100	10^6	100	10^6	100	10^6	100

Представленные данные свидетельствуют о том, что образцы перикарда с нанесенным заявляемым способом хитозановым покрытием имеют более выраженные антимикробные свойства.

Пример 11

Тестируют механико-прочностные характеристики перикарда, полученного согласно примерам 1-7 и сравнительным примерам 1-3, с помощью разрывной машины (например, Zwick/Roell BZ 2.5 / TN1S).

В Таблице 3 показаны средние значения механико-прочностных характеристик

исходного перикарда, перикард с хитозановым покрытием, нанесенным согласно сравнительным примерам 1-2, перикард с хитозановым покрытием, нанесенным согласно примерам 1-7

5 Таблица 3

Образцы перикарда	Количество образцов	$\sigma_{\text{пц}}$, МПа Предел прочности (по двум направлени- ям)	E, МПа Модуль упругости (по двум направлени- ям)	ε_{max} , % Максимальная деформация до нарушения сплошности (по двум направлениям)
Перикард, приготовленный со- гласно сравнительному примеру 1	50	15.0±0.1	71.4±1.4	41.4±1.6
		7.3±0.4	37.2±1.1	41.3±1.4
Перикард с хитозановым покры- тием, нанесенным согласно срав- нительному примеру 2	60	12.3±0.8	68.5±2.2	37.0±1.6
		7.2±0.6	38.0±2.0	38.1±1.2
Перикард с хитозановым покры- тием, нанесенным согласно примерам 1-7	60	16.0±3.0	41.0±2.2	62.0±2.0
		7.0±2.0	22.7±1.7	42.0±2.0
Перикард с хитозановым покры- тием, нанесенным согласно приме- ру 6	60	12.0±1.5	28.0±2.0	60±4
		6.5±1.5	19.0±3.0	42±5

10

15

Представленные данные свидетельствуют о том, что модификация перикарда биологического протеза клапана сердца предлагаемым методом согласно примерам 1-7 улучшает механическую прочность перикарда.

Однако для перикарда, полученного согласно примеру 6, наблюдается некоторое снижение механических характеристик при таком способе нанесения по сравнению с перикардом, приготовленным согласно сравнительным примерам 1-2, и перикардом с нанесенным хитозановым покрытием согласно примерам 1-5, и 7, по-видимому, в результате экстракции эластина из перикарда под действием растворенной в воде углекислоты, вследствие длительного нахождения перикарда в воде, насыщенной углекислым газом при высоком давлении (300 атм).

20

25

Пример 12

Перикард, полученный согласно примерам 1-7, и перикард, полученный по сравнительным примерам 1-3, тестируют на способность подавления кальцификации.

Подавление кальцификации исследуют методом подкожной имплантации крысам, для чего образцы перикарда биологического протеза клапана сердца размером 10*10 мм имплантируют подкожно крысам линии Wistar под тиопенталовым наркозом на спине по 4 штуки на животное, причем контрольные и опытные образцы помещают каждому животному попарно. После имплантации животных содержат в нормальных условиях вивария, питание ad libitum. В рацион питания включают эргокальциферол (витамин Д3). Через 4 месяца после имплантации образцы перикарда под наркозом извлекают из животных, промывают физиологическим раствором для удаления формульных элементов крови животных, высушивают в течение 1 недели в суховоздушном термостате при 25°C. Пробы помещают в кварцевые стаканчики, смачивают дистиллированной водой, добавляют 2 мл концентрированной азотной кислоты, оставляют на ночь при комнатной температуре, затем нагревают до 150-200°C на электроплитке до полного высушивания, потом помещают в муфель и нагревают 30 минут при 300°C, и затем 30 минут при 550°C. Если осадки были темного цвета, то обработку кислотой повторяют до полного отсутствия в них золы. После чего к ним добавляют 2 мл 2% азотной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой, и оставляют на 30 минут для полного растворения, затем измеряют в них содержание минерализованного кальция методом атомной абсорбционной спектроскопии.

30

35

40

45

В Таблице 4 показаны результаты исследования интенсивности процесса кальцификации in vivo на крысах 1) на образцах перикарда, полученного согласно

сравнительному примеру 1, 2) образцах перикарда, полученного согласно сравнительным примерам 2-3, 3) образцах перикарда, полученного согласно примерам 1-7.

Образцы перикарда	Количество образцов	Содержание Са, мг/г сухой ткани
Перикард, полученный согласно сравнительному примеру 1	50	8.20±0.4
10 Перикард, полученный согласно сравнительному примеру 2	60	0.036±0.006
Перикард, полученный согласно примеру 1-7	60	0.012±0.002

Представленные данные свидетельствуют о том, что модификация перикарда биологического протеза клапана сердца предлагаемым методом согласно примерам 1-7 позволяет существенно уменьшить их кальцификацию по сравнению с исходным перикардом и перикардом, модифицированным по способу-прототипу, согласно сравнительному примеру 2.

Формула изобретения

1. Способ нанесения хитозанового покрытия на перикард биологического протеза клапана сердца, отличающийся тем, что нанесение проводят прямым методом из 0,1-2% раствора хитозана в воде, насыщенной углекислым газом под давлением.

2. Способ нанесения хитозанового покрытия по п.1, отличающийся тем, что используют перикард, химически обработанный 0,625% раствором глутарового альдегида.

3. Способ нанесения хитозанового покрытия по п.1, отличающийся тем, что используемый для нанесения хитозанового покрытия 0,1-2% раствор хитозана предварительно приготавливают в автоклаве с дистиллированной водой при нагнетании углекислого газа до давления 100-300 атм и температуре 15-35°C в течение 5-7 суток с периодическим помешиванием раствора, и лишь затем помещают в этот раствор хитозана перикард биологического протеза клапана сердца для нанесения покрытия.

4. Способ нанесения хитозанового покрытия по п.1, отличающийся тем, что нанесение, в том числе с использованием предварительно подготовленного раствора хитозана, проводят в автоклаве под давлением 100-300 атм, температуре 15-35°C, в течение 2-4 ч.

5. Способ нанесения хитозанового покрытия по п.1, отличающийся тем, что в качестве хитозана используется материал поставки Aldrich (сорт «low molecular weight»).

6. Способ нанесения хитозанового покрытия по п.1, отличающийся тем, что в качестве хитозана используются низкомолекулярные хитозановые материалы с молекулярной массой 15000-20000 г/моль и степенью ацетилирования 15-20%.

7. Перикард биологического протеза клапана сердца с нанесенным хитозановым покрытием, отличающийся тем, что покрытие получено методом прямого осаждения из 0,1-2% раствора хитозана в воде, насыщенной углекислым газом под давлением.

8. Перикард биологического протеза клапана сердца по п.7, отличающийся тем, что он химически обработан 0,625% раствором глутарового альдегида.

9. Перикард биологического протеза клапана сердца по п.7, отличающийся тем, что 0,1-2% раствор хитозана, из которого проводят нанесение хитозана на перикард, предварительно приготавливают в автоклаве с дистиллированной водой при нагнетании углекислого газа до давления 100-300 атм и температуре 15-35°C в течение 5-7 суток с

периодическим помешиванием раствора.

10. Перикард биологического протеза клапана сердца по п.7, отличающийся тем, что хитозан наносят на перикард, в том числе с использованием предварительно подготовленного раствора хитозана, в автоклаве под давлением 100-300 атм, 5 температуре 15-35°C, в течение 2-4 ч.

11. Перикард биологического протеза клапана сердца по п.7, отличающийся тем, что в качестве хитозана используют материал поставки Aldrich (сорт low molecular weight).

12. Перикард биологического протеза клапана сердца по п.7, отличающийся тем, 10 что в качестве хитозана используют низкомолекулярный хитозановый материал с молекулярной массой 15000-20000 г/моль и степенью ацетилирования 15-20%.

15

20

25

30

35

40

45

