

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 22768

(13) С1

(46) 2019.12.30

(51) МПК

A 61B 17/03 (2006.01)

A 61F 2/02 (2006.01)

A 61L 27/56 (2006.01)

C 08L 27/18 (2006.01)

C 01F 11/24 (2006.01)

(54) МАТЕРИАЛ ДЛЯ ЗАКРЫТИЯ РАНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПЕЧЕНИ

(21) Номер заявки: а 20170055

(22) 2017.02.20

(43) 2018.10.30

(71) Заявители: Кудло Виктор Валентинович; Жук Игорь Георгиевич; Гракович Петр Николаевич; Цыдик Иван Станиславович (ВУ)

(72) Авторы: Кудло Виктор Валентинович; Жук Игорь Георгиевич; Гракович Петр Николаевич; Цыдик Иван Станиславович (ВУ)

(73) Патентообладатели: Кудло Виктор Валентинович; Жук Игорь Георгиевич; Гракович Петр Николаевич; Цыдик Иван Станиславович (ВУ)

(56) КУДЛО В.В. и др. Проблемы здоровья и экологии. - 2016. - № 4. - С. 67-73.

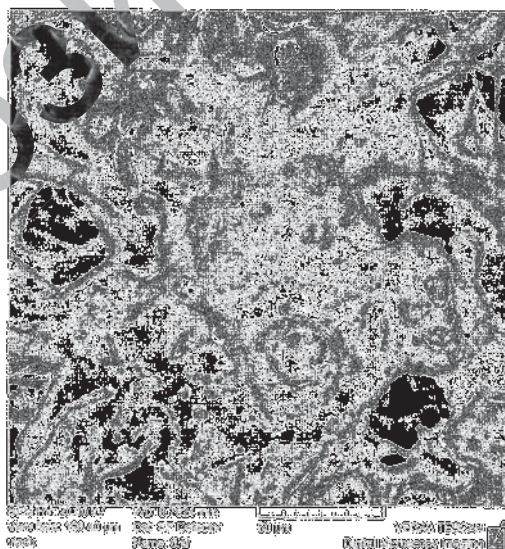
КУДЛО В.В. и др. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2016. - № 2. - С. 50-54.

CN 102786709 A, 2012.

ВУ 13192 С1, 2010.

(57)

Материал для закрытия раневой поверхности печени, представляющий собой волокнисто-пористый фторопласт Грифтекс, отличающийся тем, что поверхность фторопласта модифицирована методом пропитывания 10 %-ным раствором кальция хлорида и фотосенсибилизатором фотолоном.



Фиг. 1

Изобретение относится к области медицины, а именно к хирургии, и может использоваться для придания новых свойств полимерным материалам, используемым для закрытия раневой поверхности печени после резекции.

Модифицирование полимеров медицинского назначения открыло широкие перспективы в решении актуальных проблем практической медицины. Существуют химические и физические способы модификации материалов на основе политетрафторэтилена (фторопласта). При использовании физических вариантов не всегда удается достичь равномерности изменения поверхностной структуры исходных материалов.

На основе политетрафторэтилена изготавливают имплантаты, на поверхность которых нанесены алмазоподобные нанопокрyтия и распределенные наноразмерные частицы серебра. В экспериментах на животных показана биосовместимость и формостабильность материалов [1].

Известно применение для медицинской одежды и изделий водонепроницаемого, паропроницаемого политетрафторэтилена, обработанного дофамином и лизоцимом, имеющего антибактериальный эффект [2].

Недостатком данного материала является то, что дофамин в низких дозах вызывает расширение мелких сосудов, что может способствовать развитию кровотечения. Лизоцим, в свою очередь, проявляет антибактериальные свойства в отношении анаэробных и грамположительных бактерий, слабо влияя на грамотрицательные, что делает его не слишком пригодным для пластического закрытия ран паренхиматозных органов.

Известно применение двухслойного политетрафторэтилена в качестве материала для пластики раны при операциях на паренхиматозных органах брюшной полости. Первый слой, прилегающий к раневой поверхности органа, состоит из нескольких слоев высокопористого политетрафторэтилена, а внешний слой - из одного слоя низкопористого политетрафторэтилена [3]. Проведенные на собаках опыты по краевой резекции печени с наложением П-образных швов через полимер показали его достаточность для окончательного гемо- и холестаза без использования дополнительных средств и методов.

Недостаток данного материала состоит в том, что его применение не обеспечивает профилактики гнойно-воспалительных осложнений после операции на печени.

Известно использование для закрытия раневой поверхности печени материала, изготовленного на основе политетрафторэтилена, представляющего собой либо несколько слоев, ламинированных вместе с помощью адгезива (клея), помещенного между ними, либо множество мелких кусков пористого политетрафторэтилена, склеенных вместе с помощью клея. Предпочтение отдается термопластическим клеям из класса плавких фторполимеров, таким как TeflonFEP (сополимер тетрафторэтилена с гексафторпропиленом) или ТefлонPFA (сополимер тетрафторэтилена с перфторвинилпропиловым эфиром) [4].

Недостатки у данного материала следующие:

1) так как политетрафторэтилен плохо клеится, то требуется специальная подготовка поверхности, включающая ее обработку химически активными компонентами (например, натрий-аммиачными комплексами), то использование общедоступных клеев, например на базе эпоксидных смол, затруднено. Используемые для подготовки поверхности реактивы в дальнейшем могут десорбироваться и вызывать токсические эффекты в организме;

2) применение в качестве клеев плавких фторполимеров приводит к использованию расплавов с очень высокой (более 300-310 °C) температурой и, как правило, повышенного давления, что требует весьма сложного технологического оборудования;

3) так как температура плавления политетрафторэтилена (327 °C) ненамного превышает температуру расплава фторполимера, то в ходе склеивания за счет затекания расплава в поры и деформации происходят необратимые изменения поровой структуры пористого политетрафторэтилена, в частности, изменяются общая пористость и размер пор. Это, в свою очередь, изменяет процесс фиксации материала к живым тканям;

4) уплотнение материала и, особенно, заполнение пор расплавом ведут к резкому увеличению жесткости листового материала, что затрудняет его наложение на рану из-за ограниченных деформационных характеристик.

Наиболее близким к заявляемому является использование для закрытия ран печени волокнисто-пористого политетрафторэтилена Грифтекс [5]. Грифтекс производится методом лазерной переработки и состоит из отдельных коротких волокон политетрафторэтилена со средним диаметром 10-15 мкм и длиной 0,2-2 мм, сплавленных между собой в местах контакта. Пористость составляет 85-90 %, средняя плотность - 300-400 кг/м³. Прочность материала на разрыв - 0,02-0,03 МПа, относительное удлинение при разрыве - 15-20 %. Материал Грифтекс может изготавливаться различной толщины: от 1 до десятков миллиметров [6].

К недостаткам использования данного материала относится: 1) при его имплантации в область инфицированной раны печени он не обеспечивает противомикробного эффекта, 2) полимер не влияет на свертывающие свойства крови в области операции и не способствует ускорению гемостаза.

Задача изобретения - расширение арсенала материалов для закрытия раневой поверхности печени, безопасных и обладающих антибактериальными и гемостатическими свойствами.

Поставленная задача решается путем создания материала, представляющего собой волокнисто-пористый фторопласт Грифтекс, при этом отличие состоит в том, что поверхность фторопласта модифицирована методом пропитывания 10 %-ным раствором кальция хлорида и фотосенсибилизатором фотолоном.

Кальция хлорид применяется для придания материалу гемостатических свойств за счет ионов кальция, т.к. они принимают активное участие во внутреннем и внешнем путях свертывания крови. Фотолон относится к лекарственным средствам для фотодинамической терапии.

На фиг. 1 изображена электронограмма, полученная при растровой электронной микроскопии модифицированного фторопласта в SE-режиме.

На фиг. 2 изображена электронограмма, полученная при растровой электронной микроскопии модифицированного фторопласта в BSE-режиме.

На фиг. 3 показана электронограмма на большом увеличении (линейка 20 мкм) исходного волокнисто-пористого фторопласта.

На фиг. 4 показана электронограмма на большом увеличении (линейка 20 мкм) модифицированного фторопласта.

Для оценки структуры поверхности модифицированного политетрафторэтилена Грифтекса проведено электронно-микроскопическое исследование с помощью растрового (сканирующего) электронного микроскопа (РЭМ) РЭМ VEGA II LSH (Чехия) с системой энергодисперсионного микроанализа INCA ENERGY 250 ADD. Изображения снимались в режиме вторичных электронов (детектор SE) и обратно отраженных электронов (детектор BSE). С помощью системы энергодисперсионного микроанализа проводился полуколичественный и качественный анализ элементов поверхности материала.

На обзорных снимках с малым увеличением установлено, что после проведения модифицирования волокнисто-пористого фторопласта общий вид его поверхности изменялся. Покрытие из фотолон и кальция хлорида консолидировало расположенные рядом фторопластовые волокна, закрывая их полностью. Сильно уменьшилось количество отдельных мелких деталей, характерных для исходного материала. Однако фотолон не образовывал сплошного покрытия по типу ламинирования. Все образцы остались пористыми, с сохранением основной структуры, которая являлась каркасом.

На снимках со средним увеличением (линейка 50 мкм) установлено, что исходный фторопласт имел множество элементов размером в десяток и несколько десятков микрометров, однако встречались частицы толщиной в несколько микрометров. После нанесе-

ния покрытия (модифицированный фторопласт) характер поверхности изменялся. Оставаясь пористой, она становилась похожей на "обернутую глазурью". При этом оно находилось на всех элементах материала с консолидацией мелких в единые трехмерные структуры. В оцениваемом поверхностном слое четко просматривались включения размером примерно в 5 мкм.

При изучении одних и тех же участков поверхности материала, выполненного с помощью вторичных электронов (детектор SE) и обратно отраженных электронов (детектор BSE), определено, что наибольшей яркостью обладали "5-микронные элементы", находящиеся в приповерхностном слое (фиг. 1). По нашему мнению, ими являлись кальций и хлор - наиболее тяжелые компоненты, использованные в процессе модифицирования исходного фторопласта. Таким образом, хлористый кальций не был распространен равномерно, а концентрировался в виде кристаллов размером около 5 мкм.

На снимках с большим увеличением (линейка 20 мкм) обнаружено, что тяжи расплава в модифицированном фторопласте представляли собой пленкоподобные структуры. Микронного размера кристаллы не были полностью погружены в слое фотолон. Это указывает на то, что толщина покрытия не превосходила 1-2 мкм (фиг. 2).

С помощью энергодисперсионного анализа и последующих расчетов на поверхности модифицированного фторопласта были установлены следующие элементы (табл. 1).

Таблица 1

Химический состав поверхности исследованного материала

Элемент	Атомный вес	Доля химических элементов (ат. %)	Доля химических элементов (вес. %)
N	14	$5,6 \pm 0,28$	$2,7 \pm 0,11$
O	16	$29,85 \pm 3,77$	$16,49 \pm 2,26$
F	19	$49,74 \pm 4,42$	$32,53 \pm 2,58$
Na	23	$3,97 \pm 0,09$	$3,14 \pm 0,05$
Cl	35,5	$7,08 \pm 0,26$	$8,67 \pm 0,39$
Ca	40	$3,77 \pm 0,6$	$5,21 \pm 0,87$
H	1	$75 \pm 8,67$	$2,59 \pm 0,33$
C	12	$69,33 \pm 3,56$	$28,66 \pm 1,19$

Из табл. 1 следует, что основным из них был фтор (F), составлявший около половины количества зарегистрированных атомов в слое, доступном по глубине для анализа. Это обусловлено тем, что он входит в состав фторопласта (C_2F_4). Далее было рассчитано содержание компонентов (вес. %) в поверхностном слое модифицированного фторопласта (табл. 1). В нем доли политетрафторэтилена, кальция хлорида в виде кристаллогидрата и фотолон составляли в среднем 51,64, 28,9 и 19,46 % соответственно.

Для оценки влияния модифицированного фторопласта Грифтекс на свертывание крови в зоне имплантации были проведены тромбоэластографические исследования. Были проведены 4 серии эксперимента, по 5 опытов в каждой из них. В 1-й серии (контроль) кровь пассивно заливалась в пустую кювету, прилагаемую к аппарату. Во 2-й серии на дно укладывался лоскут волокнисто-пористого фторопласта "Грифтекс", после чего помещалась кровь. В 3-й серии на дно кюветы предварительно помещался аналогичного размера фрагмент фторопласта с модифицированной поверхностью. В 4-й серии использовалась гемостатическая губка "Тахокомб". В течение 5 с после забора крови кюветы устанавливались в рабочее положение в аппарат. В нее опускался цилиндр и начиналась запись тромбоэластографии. В 3-й серии на протяжении 5 мин после начала проводилось воздействие на кровь в канюле низкоинтенсивным лазерным излучением аппаратом "Родник - 1" по методике, описанной выше. Для интерпретации графической информации рассчитывались следующие параметры тромбоэластограммы: время реакции (R), время образования

сгустка (K), максимальная амплитуда (МА) и константа тотального свертывания крови (Т).

При оценке результатов тромбоэластографии установлено, что наименьшее значение параметра R (время реакции) было при применении гемостатической губки "Тахокомб" (4-я серия). Он был статистически ниже ($p < 0,05$), чем в 1-й серии, в 1,35 раза (табл. 2).

Таблица 2

Цифровые параметры оценки тромбоэластографии

Оцениваемый показатель	1-я серия (контроль)	2-я серия	3-я серия	4-я серия
R, с	806,6	713,0	733,4	590,6 ¹
K, с	389,4	534,0	513,0	548,4
МА, мм	34,7	32,5	29,8	24,1 ¹
T, с	1757,6	1630,4	1676,0	1301,6 ^{1,2,3}

Время образования сгустка (K) было наибольшим также в 4-й серии, однако разница между сериями эксперимента не была статистически значимой ($p > 0,05$).

Наименьшее значение максимальной амплитуды (МА) установлено в 4-й серии и было достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной серии, в 1,55 раза. В то же время при парном сравнении по данному параметру статистически значимых отличий между контрольной, 2-й и 3-й сериями обнаружено не было.

Параметр T (константа тотального свертывания крови) статистически достоверно отличался между экспериментальными сериями. При применении гемостатической губки "Тахокомб" (4-я серия) он был ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной серии, при использовании волокнисто-пористого фторопласта (2-я серия) и модифицированного фторопласта (3-я серия) в 1,35, 1,25 и 1,29 раза соответственно.

Таким образом, установлено, что присутствие модифицированного фторопласта при свертывании крови не изменяет плотность формирующегося тромба по сравнению с контрольным значением. В то же время при применении губки "Тахокомб" выявлено статистически значимое снижение конечной прочности сгустка крови по сравнению с контрольной серией в 1,55 раза ($p < 0,05$).

Для оценки антимикробного эффекта у модифицированного фторопласта Грифтекс было проведено микробиологическое исследование. В опыте использовались грамположительные и грамотрицательные бактерии, устойчивые к некоторым антибиотикам. Производились смывы суточной культуры со скошенного мясопептонного агара каждого вида бактерий 5 см³ стерильной дистиллированной воды при 37 °С. Были проведены 6 серий экспериментов, в каждой из которых использовали по 8 фрагментов полимерных материалов равного размера 1 × 5 см.

Во всех случаях для нанесения смывов культур бактерий использовали одну и ту же стандартную петлю с целью минимизации возможного расхождения посевной дозы. В 1-й серии стерильные фрагменты исходного волокнисто-пористого фторопласта помещались в стерильные чашки Петри. Во 2-й серии кусочки фторопласта с модифицированной поверхностью помещались в стерильные чашки Петри.

В 3-й серии на поверхность лоскутов стерильного волокнисто-пористого фторопласта наносились смывы культуры *S. aureus*, затем они располагались в стерильные чашки Петри. В 4-й серии на поверхность стерильных лоскутов модифицированного фторопласта помещались смывы культуры *S. aureus* и укладывались в стерильные чашки Петри.

В 5-й серии на поверхность лоскутов стерильного волокнисто-пористого фторопласта наносились смывы культуры *E. coli* и размещались в стерильные чашки Петри. В 6-й серии на поверхности лоскутов модифицированного фторопласта распределялись смывы культуры *E. coli* и укладывались в стерильные чашки Петри.

Во 2-й, 4-й и 6-й сериях на следующем этапе проводилось облучение каждого из фрагментов НИЛИ аппаратом "Родник-1" с вышеописанными параметрами. Все чашки Петри в последующем инкубировались при 37 °С в течение 24 ч. После этого в стерильных условиях в каждой из серий фрагменты материалов переносились в отдельные пробирки с 5 см³ мясopептoнного бульона. Предварительно производились замеры мутности исходных пробирок с помощью денситометра DEN-1 (BioSan, Латвия). Пробирки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. На следующий день проводились повторные денситометрические измерения. Для каждой пробирки определялась разница между исходным и конечным значением (коэффициент редукции). Согласно инструкции производителя, относительные величины мутности по Мак-Фарланду переводились в концентрации бактерий в среде.

В нашем исследовании в результате инкубации исходного волокнисто-пористого фторопласта (1-я серия) в питательной среде изменения мутности по отношению к исходной не установлено. Соответственно, стерилизация полимеров на основе фторопласта (1-я и 2-я серии) по стандартной методике в газовой камере окисью этилена обеспечивала полную стерильность материалов.

Во 2-й серии эксперимента увеличение относительной мутности мясopептoнного бульона обуславливалось диффузией в питательную среду компонентов раствора, использованного при модифицировании поверхности фторопласта (фотолон и кальция хлорид). Во всех случаях показатель равнялся 2,5 единицам Мак-Фарланда.

Применение комбинации из модифицированного фторопласта и НИЛИ (4-я серия) вызвало достоверное снижение концентрации *S. aureus* в питательной среде в 2,58 раза ($p < 0,05$) по сравнению с применением чистого волокнисто-пористого фторопласта (3-я серия), обсемененного аналогичным количеством микроорганизмов.

В 6-й серии эксперимента при использовании фторопласта с модифицированной поверхностью и НИЛИ отмечено уменьшение количества *E. coli* в питательной среде в 8,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению с 5-й серией, в которой бактерии помещались на исходный волокнисто-пористый фторопласт.

Для оценки местного эффекта применения модифицированного фторопласта было проведено электронно-микроскопическое исследование ткани печени в области имплантации модифицированного фторопласта. Были выявлены следующие ультраструктурные особенности. Ядра большинства гепатоцитов имели овальную форму, мелкозернистый, диффузно распределенный в кариоплазме хроматин. Крупные ядрышки локализовались вплотную к ядерной оболочке, содержали преимущественно гранулярный компонент, поры в кариолемме были отчетливыми, широкими и многочисленными, что характеризовало состояние ядра как активное. ГрЭС была сильно развита, на ее цистернах локализовались многочисленные связанные рибосомы. Регистрировалось значительное количество вновь синтезированного белка в цитоплазме гепатоцитов в виде серой хлопьевидной. Митохондрии гепатоцитов содержали матрикс умеренной электронной плотности, отчетливые кристы, что свидетельствовало об их оптимальном биоэнергетическом и биосинтетическом состоянии. При этом они отличались полиморфизмом: в одних гепатоцитах преобладали органеллы овальной формы, в других - удлинённые и делящиеся гантелеобразные. Изредка встречались митохондрии удлинённой формы с характерной продольной ориентацией крист. Наблюдались многочисленные вдавления и выпячивания мембран латеральных поверхностей соседних гепатоцитов (интердегитации), что указывало на усиление межклеточных взаимодействий. В цитоплазме гепатоцитов содержались в умеренном количестве мелкие и средние липидные включения. Комплекс Гольджи в одних клетках был умеренно развит, в других хорошо развит, локализовался на билиарном полюсе гепатоцитов. Последнее свидетельствовало об его активном функционировании. Выявлялись немногочисленные профили гладкой цитоплазматической сети и гликогеновые включения. Местами наблюдалось увеличение числа вторичных лизосом, в частности ли-

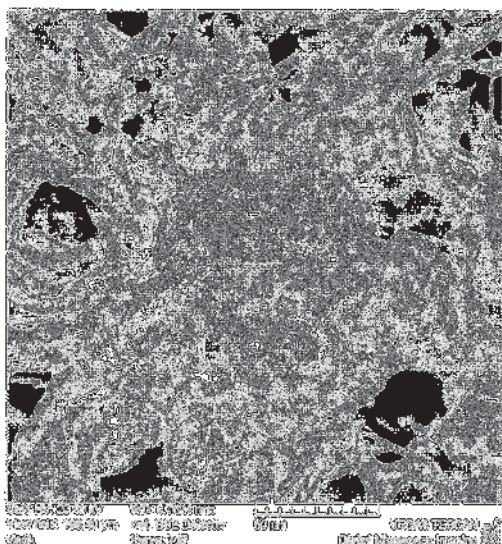
пидолизосом. Желчные капилляры содержали многочисленные микроворсинки, что свидетельствовало об интенсивной секреции желчи. Желчные протоки имели типичное строение с эпителием кубической формы. Со стороны микроциркуляторного русла, так же как и в других группах, отмечалось увеличение числа макрофагов с высокой фагоцитарной активностью. Обнаруживались единичные плазматические клетки и эозинофилы. В отдельных гепатоцитах обнаруживались электронно-плотные структуры, ограниченные одиночной мембраной. По нашему мнению, они представляли собой фагосомы с резорбированными элементами фотосенсибилизатора фотолон, использованного для модифицирования поверхности фторопласта. Описанные особенности свидетельствуют о возникновении и развитии репаративных и секреторных процессов в ответ на оперативное вмешательство в области применения модифицированного фторопласта Грифтекс и отсутствии у него местного токсического эффекта.

Таким образом, заявляемый материал обладает рядом преимуществ по сравнению с прототипом:

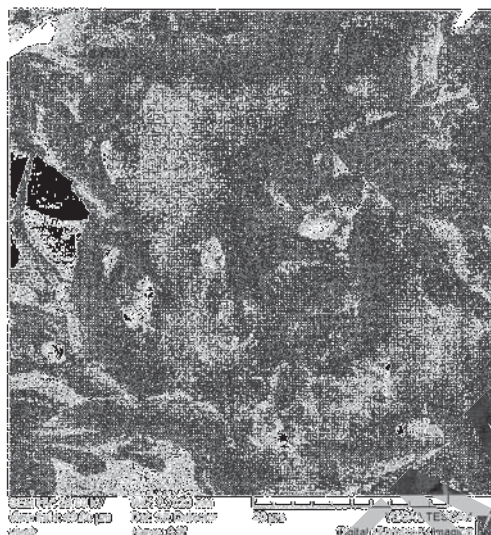
- 1) на поверхности синтетического материала формируется покрытие, на 50 % состоящее из функционально активных компонентов;
- 2) проявляет антимикробную активность в отношении широкого спектра бактерий; кроме того, стерилизация изделий из модифицированного фторопласта не требует применения специальных способов;
- 3) вызывает формирование более прочного сгустка крови в зоне имплантации, потенцируя гемостатический эффект;
- 4) не проявляет местного токсического влияния при имплантации в области раневой поверхности паренхиматозного органа.

Источники информации:

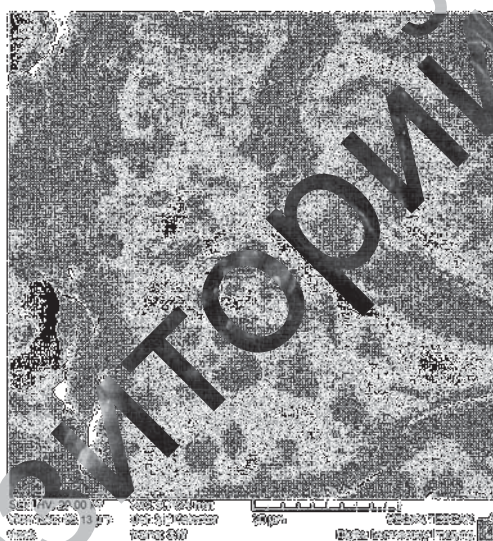
1. Ситников В.П. и др. Новые технологии использования протезов из фторопласта с алмазоподобным нанопокрывтием в хирургии уха (экспериментальное исследование) // Омский научный вестник. - 2014. - № 2. - С. 75-76.
2. Патент CN 102786709, МПК С 08J 7/16, С 08J 7/12, С 08L 27/18, 2012.
3. RU 2293542, МПК А 61F 2/02, А 61L 27/56 (2005), 2007.
4. Патент WO/1995/022359, МПК А 61F 2/00, А 61L 27/16, А 61L 27/34, А 61L 27/40, А 61L 27/50, А 61L 27/56, В 32В 27/32, С 09J 5/06, 1995.
5. Кудло В.В., Цыдик И.С. Изучение возможности применения материала "Грифтекс" для лечения ран печени в эксперименте. Тез. докл. конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора Д.А.Маслакова. - Гродно, 19-20 апреля 2012 г. / Ред. кол.: В.А.Снежицкий (отв. ред.) и др. - Гродно: Гродн. гос. мед. ун-т., 2012. - С. 224-225.
6. BY 13192, МПК D 01B 5/00, B 01A 6/02, G 01N 33/483, 2010.



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4