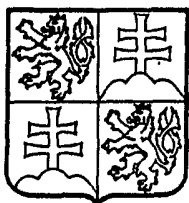


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 919

(21) PV 10216-86.F
(22) Přihlášeno 30 12 86

(40) Zveřejněno 12 01 90
(45) Vydáno 31 12 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 5

A 61 L 33/00

(75) Autor vynálezu BRYNDA EDUARD RNDr. CSc., HOUSKA MILAN ing. CSc., VACÍK JIŘÍ ing. CSc., KÁLAL JAROSLAV prof. ing. DrSc., PRAHA (CS);
NOVIKOVA SVETLANA PETROVNA, ILINA MARINA BORISOVNA, SELEZNEVA
MARINA NIKOLAEVNA, DOBROVA NATALIA BORISOVNA prof. dr., MOSKVA (SU)

(54) Způsob tromboresistentní úpravy výrobků používaných v medicíně
v kontaktu s krví

(57)

Řešení se týká způsobu tromboresistentní úpravy povrchu výrobků používaných v lékařství v kontaktu s krví, jejich úpravou roztoky albuminu, heparinu a glutaraldehydu, jehož podstata spočívá v tom, že se na povrch výrobku 1 až 50krát střídavě působí roztokem albuminu o koncentraci 0,1 až 0,5 % hmot. po dobu 5 až 30 minut a roztokem heparinu o koncentraci 50 až 100 m.j./ml po dobu 5 až 30 minut, přičemž roztoky mají pH 3,0 až 4,8 a iontovou sílu nižší než 0,5, načež se provede závěrečná fixace v roztoku glutaraldehydu o koncentraci 0,5 až 1,0 % obj.

Vynález se týká způsobu tromborezistentní úpravy povrchů výrobků používaných v lékařství v kontaktu s krví, jejich úpravou roztoky albuminu, heparinu a glutaraldehydu.

Výrobky z cizorodých materiálů aktivují při kontaktu s krví procesy vedoucí k tvorbě trombů. Proto jsou pro kontakt s krví používány výrobky se sníženou trombogenitou. Takové výrobky lze získat jednak výběrem materiálů a technologických podmínek při výrobě (Biomer, Avcothane, Pellethane), jednak dodatečnou úpravou povrchů již hotových výrobků. Účinným způsobem úpravy výrobků je imobilizace antikoagulantů na jejich povrchu. Jako nejperspektivnější se jeví přírodní antikoagulant heparin. Jsou známy způsoby přímé iontové nebo kovalentní vazby heparinu na povrch. Avšak, při iontové vazbě je heparin z povrchu rychle vymýván ve fyziologických roztocích, při kovalentní vazbě heparin často ztrácí svou aktivitu.

Technologicky nejjednodušší a účinná je úprava povrchů heparinem vázaným na povrchově aktivní látky. Jako příklad lze uvést úpravu povrchu cetylamoniumchloridem, heparinem a glutaraldehydem (Lagergren H., Eriksson J.C., Trans. Amer. Intern. Organs, 1971, 17,10-19; Larsson.N., Stenius P., Eriksson J.C., Maripuu R., Lindberg B., Colloid Interface Sci, 1982, 90,127). Nedostatkem tohoto způsobu je použití toxické organické povrchově aktivní aminosloučeniny, nedostatečná pevnost vazby povrchově aktivní látky s povrchem, použití vysoké teploty (60-90 °C) a v mnohých případech nutnost předem upravit povrch v oxidačním prostředí.

Je znám způsob imobilizace fyzikální adsorpcí kovalentně svázaného komplexu heparinu s přírodní povrchově aktivní látkou (albuminem), přičemž vázaný komplex je předem připraven v roztoku (Hennink W.E., Kim S.W., Feijen J., J. Biomed. Mater. Res. 1984 18,911-926). Nedostatky tohoto způsobu jsou: 1. použití karboimidu pro vazbu heparinu s albuminem vyvolává rozpad karboxylových skupin heparinu, což snižuje antikoagulační aktivitu heparinu. 2. vytvoření kovalentně vázaného komplexu snižuje schopnost albuminu hydrofobně se vázat na povrch - ve vodných roztocích se komplex vymývá s povrchem.

Je znám způsob získání tromborezistentních polymerních výrobků úpravou jejich povrchů albuminem následovanou adsorpcí heparinu a fixací glutaraldehydem ve vodě (Novikova S.P., Dobrova N.B., Popov S.A., Selezneva M.N., Autorské osvědčení SSSR 1 097 336 A. Tento způsob umožňuje vytvoření vazby mezi povrchem a komplexem heparin-albumin bez inaktivace heparinu. Nedostatky tohoto způsobu jsou: 1. nerovnoměrnost vrstvy komplexu vytvořené adsorpcí heparinu v neutrálním pH na adsorbovaný albumin a s ní spojené kolísání výsledného množství vázaného komplexu, což může mít negativní vliv na tromborezistentní vlastnosti. 2. Malá tloušťka antikoagulačního pokrytí tvořeného jednou vrstvou molekul albuminu a heparinu, což může mít vliv na dobu trvání antikoagulačního efektu obzvláště u výrobků, které jsou dlouho v kontaktu s organismem. Uvedené nedostatky odstraňuje způsob tromborezistentní úpravy povrchů výrobků používaných v lékařství v kontaktu s krví podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se na povrch výrobku 1 až 50krát střídavě působí roztokem albuminu o koncentraci 0,1 až 0,5 % hmot. po dobu 5 až 30 minut a roztokem heparinu

o koncentraci 50 až 100 m.j./ml po dobu 5 až 30 minut, přičemž roztoky mají pH 3,0 až 4,8 a iontovou sílu nižší než 0,5, načež se provede závěrečná fixace v roztoku glutaraldehydu o koncentraci 0,5 až 1,0 % obj.

Roztoky albuminu, kromě roztoku pro první adsorpci, roztoky heparinu, promývací roztoky a roztok glutaraldehydu mají pH 3 až 4,8, aby byla zajištěna stabilita komplexu albumin-heparin. Při vyšších pH se adsorbovaný heparin rychle uvolňuje do roztoku, síťování glutaraldehydem je méně účinné, protože proces rozpadu komplexu konkuruje procesu síťování. Nestabilita komplexu znemožňuje provádění vícenásobné adsorpce při pH vyšším než 4,8.

Koncentrace albuminu vyšší než 0,01 % zajišťuje vytvoření kompletních adsorbovaných vrstev albuminu.

Koncentrace heparinu 50 až 100 m.j./ml zajišťuje vytvoření kompletních adsorbovaných vrstev heparinu. Z úsporných důvodů nemá smysl používat vyšší koncentrace.

Teploty při adsorpci albuminu do 35 °C zajišťují tvorbu rovnoměrné adsorbované vrstvy. Při vyšších teplotách se v roztocích albuminu s kyselým pH rychle tvoří agregáty.

Iontová síla vodných roztoků je nižší než 0,5, protože při vyšší iontové síle je adsorbovaný komplex nestabilní.

Doby 5 až 30 minut (v závislosti na koncentraci a proudění roztoku u povrchu) zajišťují vytvoření jednotlivých adsorbovaných vrstev.

Navrhovaný způsob může být použit pro tromborezistentní úpravu materiálů různých typů, které adsorbují albumin, přičemž další proces již je určen první adsorbovanou vrstvou albuminu. Ze známých materiálů lze uvést například polyolefiny, polyestery, polymethakryláty, polyvinylchlorid, fluorované polymery, silikonový kaučuk i anorganické materiály jako jsou kovy, sklo, keramika, nebo materiály jejichž povrchy byly heparinizovány některým z dosud používaných způsobů. Navrhovaným způsobem je možno upravit povrchy výrobků určených pro kontakt s krví libovolných geometrických tvarů a rozměrů, například katetrů, cévních protéz, umělých srdečních chlopní, oxygenátorů, součástí přístrojů, které přicházejí do kontaktu s krví, kontejnerů pro uchovávání krve. Podle způsobu použití výrobku může být volen počet adsorbovaných vrstev albuminu a heparinu tak, aby byl pro dané použití optimální. Například u polyethylenových trubek pokrytých dvojnásobnou nebo čtyřnásobnou vrstvou komplexu (albumin-heparin) nebyl nalezen rozdíl při 20 min. ex-vivo pokusech zatímco čtyřnásobná vrstva vykazovala lepší účinek při dvouměsíční in-vivo implantaci.

Přednosti navrhovaného způsobu, které vytvářejí nový kvalitativní efekt ve srovnání s dosud používaným způsobem za použití albuminu, heparinu a glutaraldehydu ve vodě bez úpravy pH, jsou:

- 1) Zvýšení tromborezistentních vlastností v důsledku
 - a) rovnoměrnosti a planárnosti pokrytí,
 - b) mnohovrstevné adsorpce albuminu a heparinu.

- 2) Možnost regulovat množství imobilizovaného albuminu a heparinu podle použití výrobku.
- 3) Zjednodušení technologie procesu prováděním adsorpce albuminu a heparinu při teplotách 0 až 35 °C.
- 4) Zmenšení spotřeby biologických preparátů (albuminu až 10krát, heparinu 30 až 50krát), snížením koncentrace používaných roztoků, které bylo umožněno prováděním celého postupu při pH 3,0 až 4,8.

Příklad 1

Pokrytí povrchu trubek z polyethylenu schváleného pro lékařské použití dvojitou vrstvou (albumin-heparin)-(albumin-heparin).

První vrstva adsorbovaného albuminu byla získána kontaktováním trubek s 0,5 hmot. % roztokem albuminu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po 30 min při 20 °C.

Po skončení adsorpce byly trubky třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9.

První vrstva heparinu byla získána kontaktováním povrchu trubek upravených albuminem s roztokem heparinu 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 s koncentrací heparinu 100 m.j./ml po 20 min při 20 °C.

Trubky byly promyty třikrát proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9.

První vrstva adsorbovaného komplexu obsahovala 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ albuminu a 0,07 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparinu.

Druhá vrstva adsorbovaného albuminu byla získána kontaktováním trubek s 0,5 roztokem albuminu v 0,1 citrátovém pufru pH 3,9 po 20 min při 20 °C.

Trubky byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9.

Druhá vrstva heparinu byla získána kontaktováním trubek s roztokem heparinu 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 s koncentrací heparinu 100 m.j./ml po 20 min při 20 °C.

Trubky byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9.

Druhá vrstva komplexu obsahovala 0,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ albuminu a 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparinu.

Adsorbovaná dvojitá vrstva (albumin-heparin)-(albumin-heparin) byla fixována v 1 % obj. roztoku glutaraldehydu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po 30 min při 60 °C.

Trubky byly promyty nejprve proudem vody a potom umístěny ve větším množství destilované vody na 20 min. s pěti výměnami vody při 20 °C.

Vzorky byly sušeny při 40 G.

Po skončení úpravy byly vzorky pokryty dvojitou vrstvou komplexu obsahující 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ albuminu a 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparinu.

Tromboresistentní vlastnosti upravených trubek v kontaktu s nativní krví byly vyhodnoceny ex-vivo experimenty na psech. Krev cirkulovala testovanými trubkami upevněnými ve speciálním držáku připojeném ke zvířeti metodou arterio-venozního šuntu. Držák umožňoval v jednom experimentu paralelní sledování upravených a kontrolních neupravených trubek. V časovém průběhu bylo zjišťováno množství trombosní hmoty, která se usazovala na stěnách trubek. Maximální doba kontaktu s krví byla 20 min.

Trombosní hmoty na vzorcích, pokrytých dvojitou vrstvou albuminu a heparinu, bylo méně než 5 % ve srovnání s množstvím trombosní hmoty na kontrolních neupravených trubkách; na trubkách pokrytých jednou vrstvou albuminu a heparinu bylo okolo 20 % trombosní hmoty v poměru ke kontrolním trubkám.

Příklad 2

Pokrytí povrchu polyethylenových trubek čtyřmi vrstvami komplexu (albumin-heparin).

Povrch trubek byl kontaktován s 0,1 hmot. roztokem albuminu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 20 min při teplotě 18 °C. Trubky byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 v průběhu 1 min. Trubky byly kontaktovány s roztokem 50 m.j./ml heparinu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 10 min při teplotě 18 °C. Trubky byly promyty třikrát proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 v průběhu jedné min. Popsaný postup byl dále opakován třikrát s tím, že doba kontaktování s roztokem albuminu byla zkrácena na 10 min. Výsledná čtyřnásobná vrstva adsorbovaného albuminu a heparinu byla fixována 1% obj. glutaraldehydu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 30 min při 55 °C. Trubky byly důkladně promyty destilovanou vodou po dobu 20 min a usušeny. Čtyřnásobná vrstva komplexu albumin-heparin obsahovala 1,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ albuminu a 0,47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparinu.

Množství trombosní hmoty usazené na trubkách při ex-vivo testech bylo méně než 5 % trombozní hmoty usazené v kontrolních neupravených trubkách.

Příklad 3

Pokrytí povrchu folie z polyvinylchloridu trojnásobnou vrstvou komplexu albumin-heparin.

Povrch folie byl kontaktován s 0,1 hmot. % roztokem albuminu v 0,1 M citrátovém pufru pH 4 po dobu 20 min při teplotě 23 °C. Folie byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 4 v průběhu 1 min. Folie byly kontaktovány s roztokem 50 m.j./ml heparinu v 0,1 M citrátovém pufru pH 4 po dobu 10 min při teplotě 23 °C. Folie byly promyty třikrát proudem 0,1 M citrátového pufru pH 4 v průběhu jedné min. Popsaný postup byl dále opakován dvakrát s tím, že doba kontaktování s roztokem albuminu byla zkrácena na 10 min. Výsledná čtyřnásobná vrstva adsorbovaného albuminu a heparinu byla fixována 1% obj. glutaraldehydu v 0,1 M citrátovém pufru pH 4 po dobu 30 min při 55 °C.

Folie byly promyty destilovanou vodou a usušeny. Trojnásobná vrstva komplexu albuminu s heparinem obsahovala 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ albuminu a 0,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparinu.

Příklad 4

Pokrytí povrchu folie ze silikonového kaučuku trojnásobnou vrstvou komplexu albumin-heparin.

Povrch folie byl kontaktován s 0,1 hmot. % roztokem albuminu v 0,1 M citrátovém pufru pH 4 po dobu 20 min při teplotě 23 °C. Folie byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 4 v průběhu 1 min. Folie byly kontaktovány s roztokem 50 m.j./ml heparinu v 0,1 M citrátovém pufru pH 4 po dobu 10 min při teplotě 23 °C. Folie byly promyty třikrát proudem 0,1 M citrátového pufru

pH 4 v průběhu jedné min. Popsaný postup byl dále opakován dvakrát s tím, že doba kontaktování s roztokem albuminu byla zkrácena na 10 min. Výsledná čtyřnásobná vrstva adsorbovaného albuminu a heparinu byla fixována 1% obj. glutaraldehydu v 0,1 M citrátovém pufru pH 4 po dobu 30 min při 55 °C. Folie byly omyty destilovanou vodou a usušeny. Trojnásobná vrstva komplexu albuminu s heparinem obsahovala 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ albuminu a 0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparinu.

Příklad 5

Pokrytí povrchu anorganického materiálu - germania - pětínásobnou vrstvou komplexu (albumin-heparin).

Povrch krystalu byl kontaktován s 0,1 hmot. % roztokem albuminu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 20 min při teplotě 30 °C. Krystaly byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 v průběhu 1 min. Krystaly byly kontaktovány s roztokem 50 m.j./ml heparinu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 10 min při teplotě 30 °C. Krystaly byly promyty třikrát proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 v průběhu jedné min. Popsaný postup byl dále opakován čtyřikrát s tím, že doba kontaktování s roztokem albuminu byla zkrácena na 10 min. Výsledná čtyřnásobná vrstva adsorbovaného albuminu a heparinu byla fixována v 1% obj. glutaraldehydu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 30 min při 55 °C.

Množství adsorbovaného komplexu v tomto případě sestávalo z:

- v 1. vrstvě albuminu 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, heparinu 0,08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- v 2. vrstvě albuminu 0,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, heparinu 0,14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- v 3. vrstvě albuminu 0,21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, heparinu 0,10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- v 4. vrstvě albuminu 0,30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, heparinu 0,12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- v 5. vrstvě albuminu 0,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, heparinu 0,14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Příklad 6

Pokrytí tkané cévní protézy z materiálu "ftorlon-lavsan" (vlákna polyethylentereftalátu a kopolymeru tetrafluorethylenu s 1,1-difluorethylenem) SSSR čtyřnásobnou vrstvou komplexu (albumin-heparin).

Povrch protéz byl kontaktován s 0,1 hmot. % roztokem albuminu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 20 min při teplotě 18 °C. Protézy byly třikrát promyty proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 v průběhu 1 min. Protézy byly kontaktovány s roztokem 50 m.j./ml heparinu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 10 min při teplotě 18 °C. Protézy byly promyty třikrát proudem 0,1 M citrátového pufru pH 3,9 v průběhu jedné min. Popsaný postup byl dále opakován třikrát s tím, že doba kontaktování s roztokem albuminu byla zkrácena na 10 min. Výsledná čtyřnásobná vrstva adsorbovaného albuminu a heparinu byla fixována v 1 % obj. glutaraldehydu v 0,1 M citrátovém pufru pH 3,9 po dobu 30 min při 55 °C. Protézy byly promývány proudem vody po dobu 30 min a usušeny.

Množství vázaného heparinu bylo v 1. vrstvě 48,4 $\mu\text{g}/\text{g}$, v 2. vrstvě 58,9 $\mu\text{g}/\text{g}$, ve 3. vrstvě 59,2 $\mu\text{g}/\text{g}$, ve 4. vrstvě 59,8 $\mu\text{g}/\text{g}$. Množství heparinu jsou vztažena na 1 g suché protézy.

Sterilizace výrobků upravených komplexem albumin-heparin byla prováděna γ -zářením (2,5 Mrad) nebo etylenoxydem. Oba způsoby sterilizace nemají vliv na vlastnosti pokrytí a jsou vybírány

tak, aby nepoškodily materiál, ze kterého je výrobek zhotoven.

Množství albuminu a heparinu, postupně se zvyšující při opakování adsorpce, bylo stanovováno infračervenou reflexní spektroskopií v příkladech 1 až 5. V příkladě 6, kde se jednalo o materiál s velkým povrchem, bylo množství imobilizovaného heparinu stanovováno specifickou adsorpcí toluidinové modři s použitím spektroskopie ve viditelné oblasti.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob tromborezistentní úpravy povrchů výrobků používaných v lékařství v kontaktu s krví, jejich úpravou roztoky albuminu, heparinu a glutaraldehydu, vyznačený tím, že se na povrch výrobku 1 až 50krát střídavě působí roztokem albuminu o koncentraci 0,1 až 0,5 % hmot. po dobu 5 až 30 minut a roztokem heparinu o koncentraci 50 až 100 m.j./ml po dobu 5 až 30 minut, přičemž roztoky mají pH 3,0 až 4,8 a iontovou sílu nižší než 0,5, načež se provede závěrečná fixace v roztoku glutaraldehydu o koncentraci 0,5 až 1,0 % obj.