

# **Разработка твердофазных гранулированных препаратов для контактной гемомодуляции и активации репаративных процессов при повреждениях различной этиологии (ожоги, раневой процесс, СД)**

## **Актуальность исследования**

Конечная цель данного направления работ – это создание новой медицинской технологии, которая позволит целенаправленно вмешиваться в процессы регуляции органов и систем организма и таким образом влиять на течение болезни. Суть технологии связана с образованием внутри самого организма нового спектра биоактивных молекул необходимого для данного заболевания специфичности и с доставкой этих молекул в пораженный орган или сосудистый регион организма. Образование биоактивных регуляторных и эффекторных структур обеспечивает контактное взаимодействие крови со специализированными гранулированными препаратами в специальном гемоконтактном устройстве вне организма. Доставка биоактивных молекул происходит за счет различных вариантов подключения гемоконтактного устройства к системе кровообращения больного. Ключевое звено данной технологии – гемоконтактные препараты определенной специфичности. В этом проекте планируется оценить индуктивные возможности нативных препаратов двух типов – сверхсшитого полистирола и кремнезема. Последующая их модификация приведет к созданию линейки специализированных препаратов с заданной индукционной активностью.

## **Научная платформа**

Инвазивные технологии

## **Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)**

Руководитель исследования – главный научный сотрудник НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Института экспериментальной медицины, д.м.н. профессор С.И.Кузнецов.

Исполнители:

НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Института экспериментальной медицины

## **Ключевые слова**

Твердофазная контактная гемомодуляция, гемоконтактные гранулированные препараты, сверхсшитый полистирол, регуляторные и эффекторные эндогенные молекулы, сосудотропные вещества, биоцидные молекулы, антиоксидантная активность, малообъемная гемоперфузия.

## **Цель проекта**

Изучение возможности максимальной мобилизации эндогенных регуляторных и эффекторных молекул гуморальных и клеточных компонентов крови, образующихся в результате твердофазной контактной гемомодуляции (контактная активация крови на гранулированных сорбентах) с последующей доставкой нового спектра этих молекул в орган или сосудистый регион, где локализован очаг поражения (малообъемная гемоперфузия (МОГ)).

## Задачи проекта

1. В качестве твердой фазы будут исследованы два нативных (не модифицированных) гемоконтактных препарата с сорбционными свойствами (сверхсшитый полистирол марки MN-202 и кремнезем Силохром С-120).
2. Оценка возможности активации кислородзависимых биоцидных систем клеток крови на контактное взаимодействие с указанными препаратами в стендовых условиях.
3. Оценка некоторых регуляторных молекул вазотропного толка ферментативных каскадных систем плазмы крови (брадикинин, ангиотензин) при контактной активации в стендовых условиях.
4. Оценка некоторых метаболитов арахидоновой кислоты как эффективных сосудотропных агентов, образующихся при твердофазной контактной гемомодуляции.
5. Оценка влияния гемоконтактной процедуры на индукцию (активацию) кислороднезависимых биоцидных факторов крови.
6. Оценка возможности влияния гемоконтактной процедуры на эффекторно-регуляторные свойства крови через систему цитокинов.
7. Исследование некоторых ростовых факторов как регуляторно-эффекторных молекул, возникающих в результате гемоконтактной процедуры.

## Ожидаемые результаты проекта

По завершению проекта (3года) будут полностью охарактеризованы гемоконтактные препараты (сорбенты) сверхсшитый полистирол MN-202 и кремнезем Силохром С-120 по их способности активировать некоторые гуморальные и клеточные системы крови при контактном взаимодействии. В первую очередь внимание будет уделено анализу вазотропных и биоцидных физиологически активных молекул, появляющихся в крови в результате контактной гемомодуляции. Именно вазотропные вещества с дилатационными свойствами позволяют улучшить кровоснабжение органа или сосудистого региона, обеспечивая тем самым усиление доставки в зону поражения энергетического, пластического и информационного материала. Помимо основного вазодилататорного агента – NO, будут проанализированы некоторые метаболиты арахидоновой кислоты (вазодилататоры: простагландин E2, 6-кето-простагландин - F1a; вазоконстрикторы: лейкотриены C4/D4/E4; тромбоксан B2), а также молекулы ферментативных каскадных систем (ангиотензин, брадикинин). Усиление кровотока в очаге поражения будет способствовать доставке туда и биоцидных факторов. Наряду с кислородзависимыми биоцидными агентами (АФК) будет исследован ряд кислороднезависимых факторов, которые образуют мощную биоцидную систему из катионных белков и пептидов. Кроме перечисленных выше сосудотропных и биоцидных агентов будут проанализированы некоторые провоспалительные (ИЛ-1, ФНОα, ИФНγ) и противовоспалительные (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокины, а также некоторые ростовые факторы (ТФР-1в, ЭФР, ИпФР, ТрФР, ГМ-КСФ, VEGF), индукция которых должна сопровождать гемоконтактные взаимодействия.

Таким образом, в результате завершения проекта будут полностью охарактеризованы такие твердофазные препараты как сверхсшитый полистирол (MN-202) и Силохром С-120. Для каждого исследованного препарата будет создана индивидуальная спектрограмма биоактивных веществ, возникающих в результате его контактного взаимодействия с кровью. То есть будет получен спектр соединений различных классов в динамике, обладающих физиологической активностью. Учитывая, что патогенез и саногенез любой болезни имеют свои механизмы развития и разрешения, в регуляции которых принимают участие одни и те же физиологически активные соединения только в разном качественном и количественном сочетании (разный спектр растянутый по времени), то проведение гемоконтактной процедуры, индуцирующей определенный набор активных молекул, позволит модулировать меру осуществления процессов регуляции - допустим: блокировать некоторые звенья патогенеза и потенцировать механизмы саногенетических реакций. Дальнейшие исследования, выходящие за рамки данного проекта, будут

направлены на химическую модификацию поверхности гемоконтактных препаратов с целью получения определенного (нужного нам) спектра биоактивных молекул, который позволит модифицировать аутобиоспектр крови пациента в нужном направлении, необходимом данному конкретному больному, на данном этапе развития болезни, в данный временной интервал. Это позволит активизировать механизмы восстановления нарушенной саморегуляции организма.

По завершению проекта планируется оформить и подать в ФИПС 2 заявки на Патент РФ.

### **Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта**

Назначение проекта - оценка спектра гемомодулирующей активности гемоконтактных препаратов (сверхсшитого полистирола марки MN-202 и кремнезема Силохрома С-120). В разработке предполагается научиться оценивать (измерять) уровень или концентрацию молекул различных классов, обладающих регуляторными и биоцидными свойствами, в крови пациентов и составить спектр вновь образованных молекул для данного конкретного препарата. Таким образом, мы сможем классифицировать линейку контактных препаратов по спектру образующих ими активностей. Возвращая кровь больному, содержащую новый спектр (набор) регуляторных и эффекторных молекул, мы будем изменять спектр в очаге поражения и сдвигать развитие патологических процессов в сторону их разрешения (стимулировать саногенез). Использование новых гемоконтактных препаратов позволит перейти к усовершенствованию и практической реализации лечебного метода – малообъемной гемоперфузии. Для этого необходимо создание специального набора для проведения малообъемной гемоперфузии, который должен включать гемоконтактное устройство с новым гранулированным препаратом, коммуникационную систему с иглами для подключения устройства к системе кровообращения больного, промывочные растворы с антикоагулянтом, антисептик, стерильные перчатки и др. Набор должен быть стерилен, апирогенен и автономен, чтобы его можно было использовать в амбулаторных и полевых условиях. Очевидно, что разрабатываемые гемоконтактные препараты прежде всего необходимо использовать на уже апробированных заболеваниях, пролеченных методом МОГ (ишемические, термические, воспалительные и гнойно-некротические заболевания конечностей).

### **Описание предлагаемого научного исследования**

Планируемое научное исследование направлено на разработку новой медицинской технологии, которая позволит целенаправленно вмешиваться в регуляторные и эффекторные процессы, протекающие в больном организме, и воздействовать на эти процессы эндогенными физиологически активными молекулами. При развитии любого заболевания или при первичном повреждении органов и тканей включаются механизмы пато- и саногенеза, последний из которых (саногенез) в общем плане представляет собой процесс выздоровления. Саногенез (как и патогенез) – это активный процесс, который имеет свои стадии развития, причинно-следственные отношения и механизмы регуляции. Таким образом, при любых видах патологии существенную роль играет регуляторный компонент, воздействуя на который можно повлиять на течение заболевания в целом. В регуляции течения патологических процессов и в их разрешении принимают участие регуляторные системы различного уровня как регионарные, так и интегративные, к которым можно отнести нервную, эндокринную, иммунную системы, а также систему соединительной ткани. Они обеспечивают поддержание гомеостаза и взаимодействуют между собой по принципу взаимной регуляции, которая осуществляется нейромедиаторами, нейропептидами, трофическими факторами, гормонами, цитокинами, ростовыми факторами и другими биоактивными (информационными) молекулами через соответствующий рецепторный аппарат.

Наш вклад в развитие данной отрасли знаний – это теоретическое обоснование и практическая разработка новой медицинской технологии, которая пока еще не имеет аналогов в мировой клинической практике. Точкой приложения новой медицинской технологии являются механизмы регуляции и защиты жизнедеятельности организма. Она основана на принципе твердофазной контактной гемомодуляции. Суть принципа сводится к запуску и цепному развитию активационных процессов в гуморальных и клеточных системах крови при ее взаимодействии с гемоконтактными препаратами. В результате этого взаимодействия происходит активация гуморальных ферментативных каскадов плазмы (системы контактной активации, комплемента, ренин-ангиотензина, фибринолиза, калликреин-кининовой и др.), что приводит к образованию большого разнообразия промежуточных и конечных продуктов ферментативного катализа, которые обладают выраженным биологическим действием на различные субстраты. Этими биоактивными соединениями, прежде всего, обеспечивается опосредованная (помимо прямой контактной активации на твердофазном препарате) индукция активированных клеток крови, сосудистого русла и далее – межклеточного вещества и клеточных элементов тканей перфузируемого региона. В активированных клетках, в свою очередь, включаются метаболические и синтетические процессы, которые приводят к экспрессии на клеточной мембране адгезивных структур и рецепторных белков, а также к синтезу и секреции большого количества «профилированных» информационных молекул, которые, обладая ауто- пара- и/или эндокринным действием, реализуют свои регуляторно-эффекторные функции в рамках вновь возникающих гуморально-клеточных и клеточно-клеточных кооперативных взаимодействий. Таким образом, следствием твердофазной контактной гемомодуляции является изменение общего эффекторно-регуляторного потенциала крови, который передается на ткани всего перфузируемого региона или органа, вызывая лечебный эффект. Практической реализацией принципа твердофазной контактной гемомодуляции стала новая медицинская технология, которая вылилась в метод малообъемной гемоперфузии (целевая малообъемная гемоперфузия – ЦМОГ – артериальный вариант и регионарная малообъемная гемоперфузия - РМОГ – венозный вариант), который успешно был использован для эффективного лечения ряда тяжелых заболеваний: критической ишемии нижних конечностей и диабетической стопы, термических поражений нижних конечностей, воспалительных и гнойно-некротических заболеваний пальцев и кисти.

#### **Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач**

В ходе реализации проекта будут использованы современные методы исследования и комплексный подход к оценке и анализу полученных эффектов. При решении поставленных задач планируется использовать гематологические, биохимические, иммунологические, люминесцентные, иммуноферментные методы исследования. Сочетание предложенных методов позволит установить основные закономерности мобилизации эндогенных регуляторных и эффекторных молекул гуморальных и клеточных компонентов крови при контактном взаимодействии (на первом этапе на примере биоцидных и сосудотропных субстанций). Данную экспериментальную работу планируется выполнять *in vitro* с использованием сверхсшитого полистирола и Силохрома С-120 (ранее не используемых в качестве гемоконтактных препаратов) и человеческой крови здоровых доноров.

Эксперименты по оценке влияния гемоконтактных препаратов на некоторые параметры крови планируется проводить в стендовых условиях. Донорскую кровь будем получать на станции переливания крови Центра им. В.А.Алмазова, которую будут забирать у здоровых волонтеров из локтевой вены в вакуумную пробирку с гепарином в объеме 9,0 мл.

Гемоконтактные препараты.

1. Сверхсшитый полистирол марки MN-202 представляет собой гранулы темно-коричневого цвета с размерами частиц 0,3-1,2 мм. Удельная поверхность составляет 800 – 1000 кв. м / г, суммарный объем пор – 1,0-1,1 мл / г. Имеются поры двух типов – транспортные поры диаметром порядка 80 нм и нанопоры – диаметром 1-3 нм. Полимер нейтрален, не содержит функциональных групп, обладает гидрофобной поверхностью. Сорбент не меняет объема в средах в интервале рН 1-14 независимо от ионной силы раствора.

2. Кремнезем Силохром С-120 – это гранулы белого цвета неправильной формы размером 0,3-0,5 мм. Удельная поверхность гранул – 130 кв.м / г, размер пор – 28 нм. Удельную поверхность препарата определяли по низкотемпературной адсорбции методом ВЕТ, а анализ пористой структуры проводили методом ВЖН. Измерения осуществляли на приборе ASAP 2020MP.

Эксперименты на стенде планируется проводить в гемоконтактных одноразовых колонках, изготовленных из 20-ти мл шприцов. В шприц вставляют фильтр из нетканого материала и капроновую сетку, которые плотно фиксируют у торцевой поверхности шприца прижимным кольцом. В колонки загружают гемоконтактные препараты, хранящиеся в растворе этанола, в объеме 1,8 мл. Препараты в колонках промывают тем же раствором этанола и хранят в таком виде до проведения экспериментов.

Перед началом работы из колонок удаляют раствор этанола и гемоконтактные препараты трижды промывают 10-ти кратным объемом стерильного физиологического раствора, а затем еще трижды физраствором с гепарином (20 ед/мл). После такой подготовки в шприц-колонку забирают гепаринизированную донорскую кровь из вакуумной пробирки из расчета сорбент : кровь (1 : 4). Предварительно из этой же пробирки отбирают пробу крови «до» контакта. Загруженные кровью шприцы помещают в горизонтальном положении на роторную мешалку и включают вращение. Эксперименты будут проводиться при комнатной температуре в постоянном ротационном режиме. Длительность эксперимента – 60 мин. Через определенные промежутки времени (5, 20, 40, 60 мин) от начала опыта из колонок отбирают пробы крови в объеме 1,8 мл в пробирки с ЭДТА. В пробах крови сначала проводят исследования, связанные с клеточными структурами (гематология, хемилюминесценция, иммунология). Затем пробы центрифугируют, отбирают плазму и проводят изучение гуморальных факторов (биохимия, иммуноферментный анализ). До постановки реакций плазма хранится в замороженном состоянии.