

На правах рукописи



ФЕДОРИЦЕВ
Игорь Александрович

**БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МОДИФИЦИРОВАННОЙ
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

03.00.02.- Биофизика (биологические науки)
05.13.01 – Системный анализ, управление и обработка
информации (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Тула – 2006

Работа выполнена
в ГОУ ВПО «Тульский государственный университет»
и ООО Научно-производственное предприятие
"Тульская индустрия ЛТД"

Научные руководители: доктор технических наук, профессор
Протопопов Александр Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор
Субботина Татьяна Игоревна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Филатова Ольга Евгеньевна

кандидат биологических наук
Якушина Валентина Сергеевна

Ведущая организация: Государственное учреждение Научно-исследовательский институт нормальной физиологии РАНН им. П. К. Анохина

Защита состоится « 19 » января 2007 г. в 12.00 на заседании диссертационного совета К212.271.01 при Тульском государственном университете по адресу: 300600, г. Тула, ул. Болдина, д. 128.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Тульского государственного университета по адресу: 300600, г. Тула, ул. Болдина, д.128

Автореферат разослан « 18 » января 2006 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук



Н. Ю. Киркина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Гиалуроновая кислота (ГК) издавна применяется в различных областях биологии и медицины, особенно в дерматологии и косметологии (Duranti F., 1998; Эрдандес Е.И., 1998). Производство ГК налажено в таких странах, как Швеция, США и др. Как субстанция с медицинскими показателями, в России ГК начала производиться в 2000 г. в городе Туле (ФСП 42-0093-0221-00).

ГК широко применяется в виде различных косметологических форм: крема, сыворотки, геля; в виде растворов для электрофореза; в виде гидрогелей в глазной хирургии и ультразвуковой диагностике; суппозиториев в иммунологии; наружных и полостных покрытий в хирургии (Самойленко И.И., 2004).

Первоначально ГК отводилась роль наполнителя межклеточного пространства, однако развитие экспериментальных и теоретических биофизических методов исследования полимеров дало толчок к изучению ГК как природного регулятора ряда биологических процессов (миграция фибробластов и пролиферация эпителиальных клеток, стимуляция ангиогенеза, активация компонентов гемостаза, и др.) (Suzuki M., 1995). Определена значимость ГК как одного из адаптогенов синтоксинов и эффективного, биологически активного вещества (Larsen N.E., 1998; Prestwich G.D., 2000, Корягин А.А., 2004, Наумова Э.М., 2005).

Определена значимость ГК как транспортного средства для доставки и контролируемого освобождения лекарственных средств (Хадарцев А.А., 2003); созданы методики, адаптирующие ГК к современным инструментальным способам лечения – электрофорез, лазерофорез и ряд других (Maggiot, 2005).

Задачи, поставленные клинической практикой: артрологией, травматологией и др. (Swann D.A., 1991), обуславливают необходимость создания модифицированной гиалуроновой кислоты (МГК), сохраняющей биосовместимость, биодеградируемость и фармакологические свойства природной ГК.

Попытки использовать ГК для внутрисуставного введения были мало результативны из-за отсутствия специальных модифицированных форм, обеспечивающих необходимые биофизические эффекты (Barbacci, 2004; Pressato, 2004).

Актуальна оценка биофизических свойств модифицированной ГК (МГК) для внутрисуставного введения и определение перспектив ее применения в медико-биологической практике с позиций системного анализа.

Цель исследования. Системный анализ и оценка биофизической характеристики модифицированной гиалуроновой кислоты, адаптированной к внутрисуставной биологической системе организма человека.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи.

1. Подтвердить получение и исследовать основные реологические, термические, спектральные свойства МГК, изучить ее устойчивость в виде водных растворов при воздействии различных физических факторов (тепловая и низкотемпературная обработки, различные рН, ионизирующая радиация) и под действием ферментов (протеаз).

2. Отделить наличие примесей МГК как факторов возможных токсических и аллергических реакций различными биофизическими методами.

3. Определить молекулярные и концентрационные особенности водных растворов МГК.

4. Исследовать биологическую эффективность МГК как заменителя внутрисуставной жидкости, изучить ее системное воздействие на суставы.

Научная новизна исследования. Впервые дана биофизическая характеристика МГК и установлены молекулярные и концентрационные особенности ее водных растворов, обеспечивающие биологическую эффективность МГК как заменителя внутрисуставной жидкости.

Показано, что основным характеристическим показателем реологических свойств МГК, как аналога синовиальной жидкости, является вязкость.

Определена стабильность вязкости водных растворов МГК при воздействии различных физических факторов (тепловая и низкотемпературная обработки, различные рН, ионизирующая радиация) и ферментов (протеаз).

Установлены пороговые значения примесей в составе МГК (родственные сульфатные соединения, остаточные белки, низкомолекулярные фракции ГК, тяжелые металлы), являющихся факторами возможных аллергических и токсических реакций.

Внутрисуставное введение раствора МГК является фактором, способствующим восстановлению нарушенного гомеостаза на микро-, мипи- и макроуровнях.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования. Результаты работы дают объяснение эффективному использованию МГК в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата человека, позволяют успешно осуществлять модификацию ГК по предложенной схеме шивки с дивинилсульфоном (ДВС). Наши данные вносят существенный вклад в научное обоснование применимости МГК как заменителя синовиальной жидкости, а также углубляют фундаментальное понимание роли МГК в восстановлении нарушенного гомеостаза в коленном суставе и позволяют провести системный анализ биофизических характеристик МГК как биологически активного вещества.

Результаты исследований ГК и МГК использованы при разработке и внедрении в медицинскую практику биодеградируемого протеза синовиальной жидкости, имплантируемого в коленный сустав по ТУ.9398-001-78467549-2006 и защите патента № 2268052 (Россия). Основные положения диссертации используются в работе ГУП ТО НИИ Новых Медицинских Технологий и преподавании на кафедрах медицинского факультета ТулГУ.

Апробация работы. Основные результаты по теме диссертации были представлены и обсуждены на научных мероприятиях различного уровня: международные научно-практические конференции «Передовые технологии эстетической дерматологии и пластической хирургии» (Москва, 15 –16 октября 1998 г. и 22-23 июня 1999 г.); Всероссийская конференция «Новые технологии в хирургии» (Москва, 11-12 марта 1998 г.); межведомственный научный семинар по проблеме ГУК на базе НИИ ЭиМ им. Н.Ф.Гамалеи АМН РФ (Москва, 20.11.1997 г.); на заседании комиссии Комитета по инструментам, приборам, аппаратам и материалам, применяемым в общей хирургии МЗ РФ №29/1-1186-2001 (Москва, 21.06.2001 г.); на НТС Центрального научно-исследовательского кожно – венерологического института МЗ РФ (Москва, 21.03.2001 г.); на заседании комиссии Управления регистрации лекарственных средств и медицинской техники МЗ РФ 03-349/0592 (Москва, 13.10.2005 г.). Апробация работы проведена на совместном заседании кафедры медико-биологических дисциплин ТулГУ и Ученого совета ГУП ТО НИИ Новых Медицинских Технологий (Тула, 16.11.2006 г.).

Личный вклад автора заключается в постановке задачи исследования, анализе современного состояния проблемы, разработке новых и внедрении стандартных методик для системного анализа и оценки биофизической характеристики модифицированной гиалуроновой кислоты, адаптированной к внутрисуставной биологической системе организма человека, анализе полученных результатов и создании научного обоснования для применения МГК в медицинской практике.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано в 1996-2006 гг. 19 работ, в том числе 12 статей (8 в журналах, рекомендованных ВАК), 7 патентов РФ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 180 стр., состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложения. Работа содержит 33 рисунков, 21 таблиц, список литературы содержит 72 источников (11 отечественных и 61 зарубежных).

Основные положения, выносимые на защиту. В соответствии с поставленной целью и задачами, на защиту выносятся следующие положения.

1. Спектральными методами анализа подтверждено получение модифицированной гиалуроновой кислоты сшивкой по гидроксильным группам с ДВС, исследованы основные реологические, термические, спектральные свойства модифицированной гиалуроновой кислоты; определена стабильность вязкости водных растворов МГК при воздействии различных физических факторов (тепловая и низкотемпературная обработки, различные рН, ионизирующая радиация) и ферментов (протеаз).

2. Реологические свойства модифицированной гиалуроновой кислоты устанавливают ее основной характеристический показатель – вязкость.

3. Пороговые значения примесей (родственные сульфатные соединения, остаточные белки, низко- и среднмолекулярные фракции ГК, тяжелые металлы) в составе МГК являются факторами возможных токсических и аллергических реакций.

4. Молекулярные и концентрационные особенности водных растворов модифицированной гиалуроновой кислоты обеспечивают ее биологическую эффективность как заменителя внутрисуставной жидкости.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объект исследования

ГК, выработанная из гребней половозрелых птиц, прошедших ветеринарную экспертизу на соответствие требованиям ТУ.9212-312-23476484-04 (базовые характеристики субстанции соответствуют ФСП 42-0093-0221-00), произведенная в соответствии с ТУ.9358-005-12466809-98 по патенту № 2157381 РФ с приоритетом от 01.03.1999 г. и модифицированная поперечной шивкой с ДВС.

Исследования эффективности и безопасности МГК в форме протеза синовиальной жидкости коленного сустава проведены (в соответствии с письмом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ № 03-349с/0592) в трех независимых, аккредитованных на исследования новых изделий для медицины, центрах: - на базе ревматологического отделения Городской клинической больницы № 1 им. Н.И.Пирогова (Москва); в Российском Университете дружбы народов на базе городской клинической больницы № 31 в ортопедическом отделении (Москва); в Главном военном-клиническом госпитале им. Н.Н.Бурденко на базе ортопедического отделения (Москва) у больных с остеоартрозом.

В экспериментах использовали мышей Balb/c (весом 16-18 гр.) по программе, разработанной в специализированном медицинском учреждении. Мыши выращивались и содержались в контролируемых барьерных условиях и перед экспериментом в течение 1,5-2 недель адаптировались к стандартным условиям.

2. Методы исследования

Исследования биофизических характеристик базовых субстанций ГК и МГК

2.1. ИК-спектры всех исследуемых соединений снимали на спектрофотометре «СПЕЕКОРД 75-IR» для сухих исходных продуктов в виде таблеток и тонких пленок по стандартной методике.

2.2. Термический анализ ГК и МГК проведен на дериватографе Q-1500D фирмы «МОМ», в воздушной среде, в диапазоне температур от +2 до +41°C по стандартной методике. Скорость нагрева (охлаждения) варьировалась от 0,6 до 7,0 К/мин.

2.3. Исследование реологических свойств. Для определения реологических свойств исследовались зависимости динамической вязкости, различных по концентрации, температуре, степени модификации растворов ГК и МГК по стандартной методике (в соответствии ГФ XI, вып. 1, с. 90 (ротационный метод)). Измерения проводили на ротационном универсальном вискозиметре "ПОЛИМЕР-РПЭ-1М".

2.4. Исследование прозрачности проводили по стандартной методике (в соответствии с ГФ XI, вып.1, с.198). Вычислялся коэффициент пропускания электромагнитного излучения (ЭМИ) для 1% водного раствора ГК и МГК относительно дистиллированной воды. Измерения проводились с помощью спектрофотометра КФК-3, в стандартной кювете на длине волны 610 нм.

2.5. УФ-спектрометрия водных растворов ГК и МГК проводилась на спектрофотометре СФ-103, с диапазоном измерений 190-1100 нм, шириной выделяемого спектрального интервала 5 нм по стандартной методике.

2.6. Исследование белковых примесей. Определение суммарного значения белковых примесей проводили колориметрическим методом по Лоури (в соответствии с ГФ XI, вып.2, с.31).

2.7. Исследования фотоэлектрическим методом количественного содержания ГК в растворах по глюкозамину проведено по стандартной методике на 1% растворах МГК (в соответствии с ФСП 42-0093-0221-00).

модификации и условия дальнейшей очистки свиного продукта подобраны экспериментально.

На рис. 2 показано соотношение между концентрациями ГК и ДВС, приводящее к получению свиных гелей одинаковой вязкости.

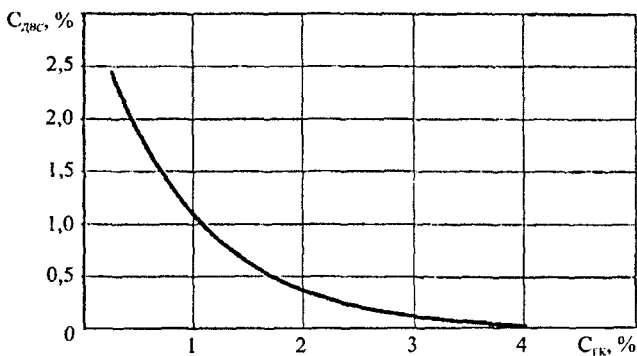


Рис. 2. Соотношение концентраций ГК и ДВС, приводящее к получению свиных гелей одинаковой вязкости

Для подтверждения наличия свиной гиалуроновой кислоты были сопоставлены ИК-спектры исходной и МГК в виде тонких пленок, полученных испарением их водных растворов.

Сравнение спектров исходной и модифицированной ГК в области высоких частот показывает, что в обоих спектрах присутствуют интенсивные широкие полосы в области $3400 - 3300 \text{ см}^{-1}$, принадлежащие валентным колебаниям ассоциированных гидроксильных групп, связанных водородной связью, что соответствует наличию различных типов гидроксильных групп в структуре обоих продуктов (рис. 3).

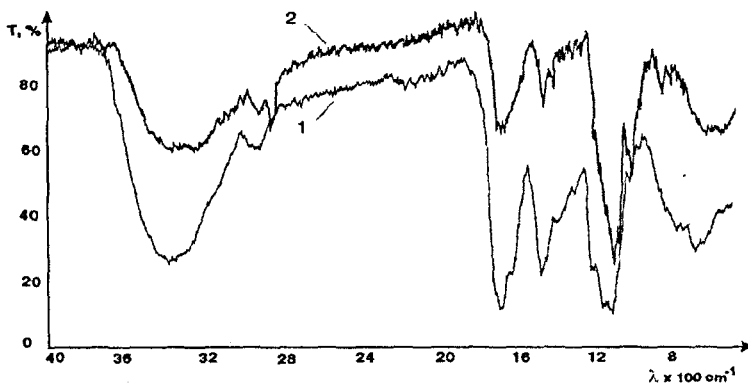


Рис. 3. ИК-спектры исходной и модифицированной гиалуроновой кислоты:
1 - исходная гиалуроновая кислота,
2 - модифицированная гиалуроновая кислота.

В спектрах обоих продуктов наблюдаются близкие характерные полосы валентных колебаний С-Н связей групп CH_2 (2910 см^{-1}) и появление новых полос при 2850 и 1465 см^{-1} . Это свидетельствует о том, что в процессе модификации к исходной структуре ГК были добавлены фрагменты, содержащие группировки CH_2 .

Наиболее существенные различия в ИК-спектрах исходной и модифицированной ГК наблюдаются в области средних частот. Сравнение спектров (рис. 3) показывает, что в этом диапазоне в спектре модифицированного продукта дополнительно к характерным полосам, относящимся к валентным колебаниям связи С-О-С (1080 см^{-1}), появляется область поглощения в интервале частот 1150 - 1100 см^{-1} , соответствующая появлению дополнительных эфирных связей. А полоса поглощения группы S=O на частоте 1050 см^{-1} отвечает, видимо, новой группировке R-SO-R , образовавшейся в результате сшивки ГК с ДВС.

Исследование реологических свойств ГК и МГК

Экспериментами подтверждены теоретические предположения (Mathews M.B., 1977), что вязкость растворов ГК и МГК, как типичного полиэлектролита, зависит от pH среды. Размеры макромолекулярного клубка полиэлектролита зависят от жесткости цепи и линейной плотности заряда. Изменение pH влияет как на жесткость цепи ГК, так и на её заряд. С одной стороны, с ростом pH возрастает степень ионизации карбоксильных групп и электростатическое отталкивание между противоположно заряженными участками цепи, что приводит к ее разворачиванию. С другой стороны, увеличение pH приводит к возрастанию степени ионизации гидроксильных групп, и, следовательно, к разрушению водородных связей между соседними звеньями и снижению жесткости цепи. Эти две противоположные тенденции делают вязкость сложной функцией pH (рис. 4).

Установлено, что вязкость растворов ГК и МГК полимеров, как и низкомолекулярных жидкостей, с повышением температуры уменьшается благодаря увеличению свободного объема и снижению энергии межмолекулярного взаимодействия, препятствующей перемещению молекул (рис.5).

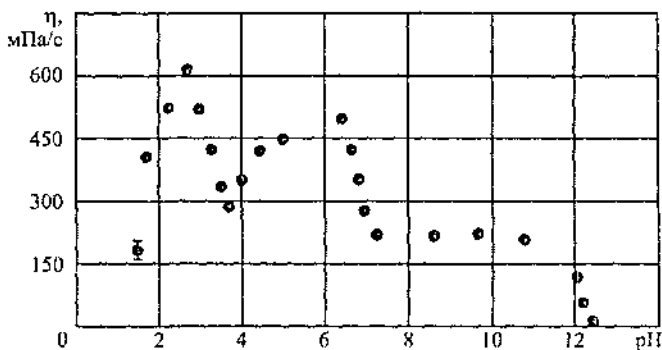


Рис. 4. Зависимость динамической вязкости растворов ГК от pH среды

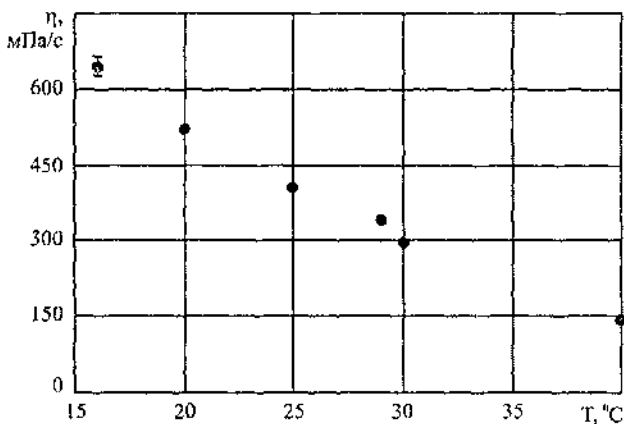


Рис. 5. Зависимость динамической вязкости ГК от параметров температуры

Исследование прозрачности водных растворов ГК и МГК

Согласно полученным результатам, все растворы ГК и МГК имеют высокие значения прозрачности. Однако, коэффициент пропускания 1% водного раствора МГК несколько ниже, чем у раствора ГК. Наиболее вероятная причина более низкого значения коэффициента пропускания раствора МГК связана с большей, по сравнению с ГК, молекулярной массой полимера, обусловленной образованием макромолекулярных цепей в результате сшивки высокомолекулярной ГК, что подтверждается реологическими, спектральными исследованиями, а также стабильностью растворов к различным воздействиям.

Термический анализ ГК и МГК

Гиалуроновая кислота, как объект термического анализа, имеет ряд особенностей. Как известно, ГК - протеогликан, содержащий, в том числе, связанный белковый компонент; ГК - сложный биополимер, молекулярные параметры которого сильно зависят от организма, из которого он выделен. Даже выделенная из одного исходного материала ГК неоднородна по молекулярной массе. Кроме того, длина макромолекулы (от 0,5 до 5 мкм) сильно зависит от катиона (Na, Ca, Mg).

Априори известно (Cleand R.I., 1977), что: не содержащая воды ГК имеет тетрагональную элементарную ячейку с параметрами $a = b = 0,989$ нм, $c = 3,38$ нм; ГК обладает объемным расположением донорных и акцепторных групп, которые необходимы для возникновения стабильных водородных связей при построении ячеистой структуры; конформационные особенности макромолекулы ГК, обусловленные водородными связями, карбоксильными, ацетамидными и гидроксильными группами, сохраняются в водных растворах; в 1% растворах ГК и МГК возникает орторомбическая форма элементарных ячеек ($a = 1,153$ нм, $b = 0,989$ нм, $c = 3,38$ нм.), содержащая по четыре молекулы воды на тетрасахаридную единицу; в растворах ГК и МГК образуются ячеистые структуры, придающие растворам большую вязкость.

Методом ДТА на дериватографе Q-1500D фирмы MOM, в воздушной среде получены термические зависимости, представленные на рис. 6. Образцы для термических исследований изготавливали из сухого остатка согласно методик приготовления раствора ГК и МГК для медицинских препаратов.

При варьировании скоростей нагрева и охлаждения в пределах от 0,6 до 7 К/мин существенных различий в полученных термических кривых не обнаружено.

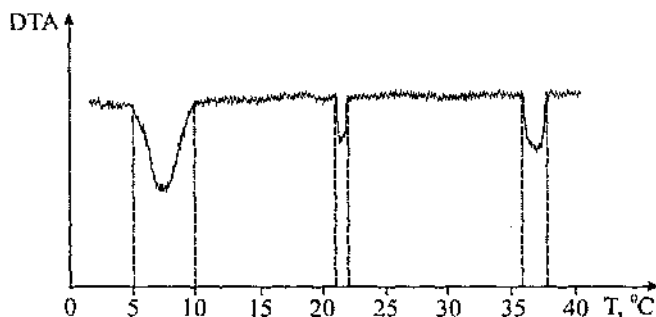


Рис. 6. Кривые дифференциально-термического анализа 1% раствора ГК и МГК

Представленная на рис. 6 кривая ДТА хорошо воспроизводится и является в пределах погрешности дериватографа одинаковой, что установлено при исследовании 60 образцов ГК и 60 образцов МГК.

Как видно из представленных результатов, в 1% растворе ГК и МГК зафиксировано три эндотермических пика, находящиеся в температурных интервалах (5 - 10)⁰С, (21 - 22)⁰С и (36 - 38)⁰С.

Наибольший тепловой эффект наблюдается в температурном интервале (5 - 10)⁰С. Данный, хорошо фиксируемый эндотермический эффект, можно сопоставить с переходом жидкокристаллической структуры из тетрагональной в орторомбическую (Cleand R.I., 1977).

УФ-спектрометрия водных растворов ГК и МГК.

Исследования УФ-спектров водных растворов ГК и МГК позволили осуществлять идентификацию базовой ГК в растворах по характерной полосе поглощения в диапазоне 250-260 нм. (рис.7) по стандартной методике в соответствии с ТУ.9358-005-12466809-98.

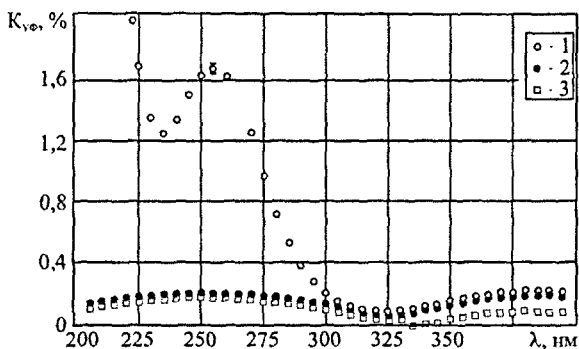


Рис. 7. Идентификация подлинности ГК методом УФ-спектрометрии: 1-рабочий спектр; 2-проверка кювет; 3-тестирование оборудования.

Исследования количественного содержания ГК в водных растворах

Исследования фотоэлектрическим методом количественного содержания ГК в растворах по глюкозамину проведены по ФСП 42-0093-0221-00 по стандартной методике на 1% растворах ГК и МКГ. Результаты позволяют рассчитать степень сшивки ГК с ДВС, а также контролировать концентрацию ГК в составе МКГ. Содержание ГК в базовой субстанции для модификации, в пересчете на сухое вещество, составило 97%.

Исследование стабильности водных растворов ГК и МКГ

Изучалась устойчивость растворов ГК и МКГ к воздействиям: тепловому, низкотемпературному, ферментативному, ионизирующей радиации и изменению pH.

Данные по стабильности водных растворов ГК и МКГ к различным видам воздействия, представленные в таблице 1, охарактеризованы в единицах процентной потери вязкости раствора.

Обобщенные данные по стабильности водных растворов ГК и МКГ представлены в табл. 1 и рис. 8.

Таблица 1

Стабильность водных растворов ГК и МКГ к различным видам воздействия.

Способ воздействия	Потеря вязкости раствора, %	
	ГК	МКГ
Тепловое	26,3	6,8
Низкотемпературное	78,8	47,4
Изменение pH	20,1	0
Ферментативная деградация	94,9	68,4
Ионизирующая радиация	76,3	44,7

Вязкость МГК, подвергнутой рассмотренным воздействиям (табл. 1), после пропускания через иглу 30G увеличивается на 20%, с условием сохранения вязкости от различных воздействий на 75% от начальной.

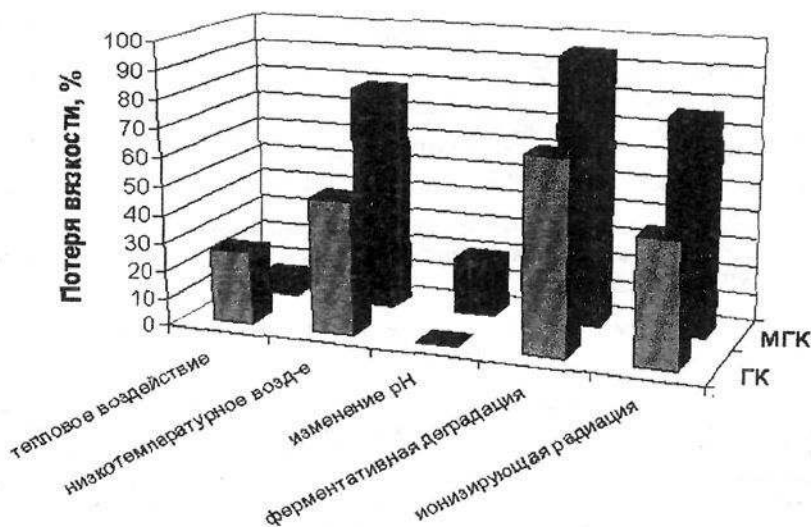


Рис. 8. Диаграмма стабильности ГК и МГК

Исследованиями установлено:

- исключается радиоизотопная стерилизация готовых продуктов на основе ГК и МГК;
- исключается замораживание готовых продуктов на основе ГК и МГК;
- pH готового продукта на основе ГК и МГК, по условию стабильности, должен быть в пределах 6,5 – 7,5;
- МГК обладает устойчивостью к воздействию различных физических и химических факторов в 2 раза выше, чем ГК;
- растворы МГК, подвергшиеся разрушениям под действием различных внешних воздействий, но не получившие потерю вязкости более чем на 75% от исходной, при пропускании через иглу 30G частично восстанавливают ее (около 20%). Полученные данные свидетельствуют о том, что избыточное давление (более $245 \cdot 10^6 \text{ Па}$ (25 кгс/мм^2)), создаваемое в растворе в колбе шприца, является фактором, восстанавливающим вязкость МГК.

Исследование примесей в составе МГК

На основании анализа литературных данных и требований МЗ РФ определен перечень соединений, примеси которых в готовом изделии могут приводить к развитию нежелательных аллергических или токсических реакций при введении МГК внутрь сустава. В соответствии со стандартными методиками проведены исследования по изучению содержания в конечном продукте вышеопределенных соединений и элементов, а также требования к его сте-

ривности, токсичности и технического состоянию. Обобщенные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание примесей в составе МГК

Наименование примеси или соединения	Норма	Достигнутый результат
Сопутствующие белки (по Лоури)	менее 1 %	0,5
Родственные сульфатные соединения	менее 1 %	0,75
Тяжелые металлы (данные анализов испытательного аналитического центра ГУП ВНИИХТ, 2005)	менее 10 мкг/кг	5,0
Низко- и среднемолекулярная ГК	менее 5 %	2,0

Из полученных результатов (табл. 2) можно сделать вывод о достигнутом необходимом уровне безопасности и исключения любых отрицательных реакций за счет введения МГК в сустав.

Системный анализ биофизической эффективности МГК при внутрисуставном введении

Совместные исследования концентрационных особенностей МГК на иммуномодулирующее действие МГК *in vitro* проводились в специализированном НИИ Э и М РАМН РФ им. Н.Ф.Гамалеи. Результаты исследований показали, что МГК в комплексе с выраженными иммуномодуляторами способна на синергетический эффект, что говорит о необходимости исключения сложных систем растворов для снижения риска отрицательных реакций организма; концентрация ГК в модифицированном комплексе должна составлять 1% с целью снижения риска отрицательной реакции организма на иммуномодулирующую активность раствора.

Исследования системного воздействия МГК на коленный сустав проводились в аккредитованных для испытаний аналогичных изделиях центрах в соответствии с протоколом №03-349с/0592 от 13.10.2005г. Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Управления регистрации лекарственных средств и медицинской техники МЗ РФ.

Для всех трех клинических центров МГК представлена в виде разработанного и защищенного патентом изделия медицинского назначения с маркой - АРТРОНИЛ™, которое относится к группе высокомолекулярных производных ГК. Исследования проводились в сравнительном анализе с изделием СИНВИСК™ производства США. АРТРОНИЛ™ использовался как искусственный заместитель - протез синовиальной жидкости. На исследования представлен в виде флакона/шприца по 2,0 и 4,0 мл., заполненного гидрогелем МГК с рН 6,8-7,2 и концентрацией ГК - 1%, молекулярной массой до 3,0 млн. Да, вязкостью до 600 мПа/с, временем деградации до 150 ч. Исследовалась клиническая эффективность и переносимость изделия при использовании для внутрисуставных введений у больных с остеоартрозом коленного сустава. В каждом центре наблюдалось до 20 больных, пол и возраст выбирался произвольно. Критерии включения в группу наблюдения - достоверность диагноза «остеоартроз (ОА) коленного сустава», подтвержденного наличием клинических симптомов и рентгенологических признаков ОА. На период исследования больные не должны были применять противовоспалительные и другие подобные им препараты. Исключались также внутрисуставные введения других лекарственных средств и назначения физиотерапевтического лечения.

Для унифицированной характеристики боли в коленном суставе использована сенсорно-аналоговая шкала; оценка припухлости и подвижности сустава выполнялась с приме-

нением визуально-аналоговой шкалы. Для оценки болевого синдрома учитывались следующие показатели: боль в покое, боль при ходьбе, боль при подъеме и спуске, при сгибании и разгибании сустава, боль при надавливании, стартовая боль.

Для характеристики воспалительного поражения коленных суставов оценивалась припухлость коленных суставов, баллотирование надколенника, наличие или отсутствие синовиального выпота и его объем, а также объем возможных движений (сгибание и разгибание).

Хорошие и отличные ближайшие результаты лечения АРТРОНИЛ™ получены у 11 (73,3%) больных, незначительное улучшение у 3 (20%), без изменений - 1 (6,7%). Суждение об эффективности проведенного лечения по мнению больного и врача было примерно одинаковым. Максимальный терапевтический эффект отмечен у основной массы больных после введения АРТРОНИЛ™, когда боль, скованность, ограничение подвижности сустава и выпот в полости сустава либо полностью исчезли, либо значительно уменьшились сравнительно с исходным уровнем.

Результаты данных исследований свидетельствуют о том, что МГК обладает биологической эффективностью как аналог внутрисуставной жидкости и введение МГК в полость сустава оказывает системное влияние на гомеостаз. При этом стабилизируются и восстанавливаются реологические свойства синовиальной жидкости за счет взаимодействия между отдельными молекулами МГК с высокой молекулярной массой (более 1,5 млнДа) и нормализованной концентрацией, вводимой внутрь сустава с нарушенными функциями. Происходит набухание и заполнение всего пространства внутри сустава без нарушения водного баланса, что позволяет восстановить эффект механической защиты поврежденных поверхностей, тормозится процесс разрушения хряща и наблюдается стабилизация макрогомеостаза. Стабилизируется транссиновиальный поток жидкости из-за возрастания вязкоупругости среды при введении МГК, в результате чего замедляется пассаж жидкости через межклеточное пространство и происходит стабилизация микрогомеостаза. Стимулируется микрогомеостаз (ввиду наличия высокомолекулярной ГК в составе МГК, как в нормальной межсуставной жидкости), включая влияние на продукцию хондроцитов и возврат макрофагов к нормальной стадии синтеза, что позволяет суставной системе продуцировать патологически неизменную синовиальную жидкость.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получена МГК для внутрисуставного введения с улучшенными характеристиками биофизических свойств (вязкость, молекулярная масса, прозрачность и т.д.), сохраняющая биосовместимость, биодegradуемость и фармакологическое действие природной ГК в качестве протеза синовиальной жидкости путем сшивки высокомолекулярной ГК с ДВС.

2. Результаты исследований реологических свойств водных растворов позволили сделать вывод, что основным характеристическим показателем МГК является вязкость. Определена стабильность вязкости водных растворов МГК к действию ряда физических факторов. Водные 1 % растворы МГК, подвергшиеся разрушениям под действием различных физических факторов (тепловая и низкотемпературная обработки, различные pH, ионизирующая радиация) и воздействию ферментов (протеаз), но не получившие потерю вязкости более чем на 75 % от исходной, при пропускании через иглу 30G (за счет создания избыточного давления в колбе шприца более 245×10^4 Па) частично (в среднем около 20 %) восстанавливают вязкость начального раствора МГК.

3. Определены пороговые значения примесей в составе МГК (родственные сульфатные соединения, остаточные белки, низко- и среднемолекулярные фракции ГК, тяжелые металлы) как факторов возможных токсических и аллергических реакций.

4. Показано, что концентрация ГК в модифицированном комплексе должна составлять 1% с целью снижения риска отрицательной реакции организма на иммуномодулирующую активность раствора; МГК в комплексе с выраженными иммуномодуляторами способна на синергетический эффект, что говорит о необходимости исключения сложных систем растворов для снижения риска отрицательных реакций организма.

5. Показано, что МГК с сохранением высокой молекулярной массы (более 1,5 млнДа) при внутрисуставном введении не вызывает воспаления или обводнения и не требует дополнительного введения в состав раствора комплексов протеинхондритинкератансульфатов (ПХКС). МГК, полученная спивкой высокомолекулярной ГК с ДВС, обладает биологической эффективностью и введение ее в полость сустава оказывает системное влияние на гомеостаз:

- стабилизируются и восстанавливаются реологические свойства синовиальной жидкости за счет взаимодействия между отдельными молекулами МГК с высокой молекулярной массой и нормализованной концентрацией, вводимой внутрь сустава с нарушенными функциями;

- набухание и заполнение всего пространства внутри сустава без нарушения водного баланса позволяет восстановить эффект механической защиты поврежденных поверхностей, торможение процесса разрушения хряща и наблюдается стабилизация макрогемеостаза;

- стабилизируется транссиновиальный поток жидкости из-за возрастания вязкоупругости среды при введении МГК, в результате чего замедляется пассаж жидкости через межклеточное пространство и происходит стабилизация микрогемеостаза;

- стимулируется микрогемеостаз (ввиду наличия высокомолекулярной ГК в составе МГК, как в нормальной межсуставной жидкости), включая влияние на продукцию хондроцитов и возврат макрофагов к нормальной стадии синтеза, что позволяет суставной системе продуцировать патологически неизменную синовиальную жидкость.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработаны и утверждены в МЗ РФ технические условия на изготовление протеза синовиальной жидкости на основе МГК по ТУ.9398-001-78467549-2006, а также инструкция и методика его применения при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Федорищев И. А. Перспективы получения высокоэффективных лекарственных средств с гиалуроновой кислотой на базе субстанции «ГИАПЛЮС» / И. И. Самойленко, И. А. Федорищев // Вестник новых медицинских технологий. – 1996. – № 3. – С. 82–83.
2. Федорищев И. А. Гиалуроновая кислота – биологически активное вещество, обладающее защитными и иммуномодулирующими свойствами / В. В. Строителев, И. А. Федорищев // ВНМТ. – 1997. – № 3. – С. 98.
3. Федорищев И. А. Разработка и применение отечественных препаратов гиалуроновой кислоты в лечебно-профилактической косметологии / И. И. Самойленко, Е. М. Лебедева, И. А. Федорищев // Материалы международной научно-практической конференции «Передовые технологии в эстетической дерматологии и пластической хирургии». Москва. 15–16 октября 1998. – М., 1998. – С. 42–43.
4. Салфетки с гиалуроновой кислотой «ГИАПЛЮС» для хирургической практики (Федорищев И. А., Строителев В. В., Хадарцев А. А., Матчин Е. Н., Жилина И. М.) // Материалы Всероссийской конференции «Новые технологии в хирургии». Москва. 11–12 марта 1998. – М., 1998. – С. 165.
5. Федорищев И. А. Использование отечественных препаратов гиалуроновой кислоты в лечебно-профилактической косметологии / И. И. Самойленко, Е. М. Лебедева, И. А. Федорищев // Материалы международной научно-практической конференции «Передовые технологии в эстетической дерматологии и пластической хирургии». Москва. 22–23 июня 1999. – М., 1999. – С. 44–45.
6. Способ получения гиалуроновой кислоты: пат. 215738, МКИ 07 С08В37/08 / И. А. Федорищев, А. А. Чернышов, А. Е. Елифанов. – № 2157381; Заявлено 01.03.99; Опубл. 10.10.2000, Приоритет 01.03.99, № 99104197/04 (Россия). – 5 с.
7. Композиция для ухода за кожей лица: пат. 2159111, МКИ 07 А61К31/715 / Е. М. Лебедева, И. А. Федорищев – № 2157381; Заявлено 02.08.99; Опубл. 20.11.2000, Приоритет 02.08.99, № 99116548/14 (Россия). – 5 с.
8. Средство, способствующее созреванию шейки матки, способ ускорения созревания шейки матки и устройство для доставки лекарственного средства к шейке матки: пат. 2177789, МКИ 07 А61К31/728 / И. А. Федорищев, В. Г. Волков, В. В. Строителев. – № 2177789; Заявлено 19.11.99; Опубл. 10.01.2002, Приоритет 19.11.99, № 99124017/14 (Россия). – 10 с.
9. Косметическая маска: пат. 2191000, МКИ 07 А61К7/48 / И. А. Федорищев. – № 2191000; Заявлено 04.08.2000; Опубл. 20.10.2002, Приоритет 04.08.2000, № 2000120582/14 (Россия). – 6 с.
10. Композиция для заживления ран на основе гиалуроновой кислоты: пат. 2172168, МКИ 07 А61К9/08 / Е. М. Лебедева, И. А. Федорищев. – № 2172168; Заявлено 11.05.2000; Опубл. 20.08.2001, Приоритет 11.05.2000, № 2000111241/14 (Россия). – 5 с.
11. Федорищев И. А. Применение искусственного покрытия ГИАПЛЮС в лечении трофических язв нижних конечностей / В. Г. Волков, В. В. Строителев, И. А. Федорищев // ВНМТ. – 2000. – №1. – С.101-102.
12. Федорищев И. А. Гиалуроновая кислота в медицинских и косметических препаратах / В. В. Строителев, И. А. Федорищев // Косметика и медицина. – 2000. – №3. – С.21-32.
13. Средство для укрепления волос: пат. 2174830, МКИ 07 А61К7/06 / И. А. Федорищев. – № 2174830; Заявлено 26.05.2000; Опубл. 20.10.2001, Приоритет 26.05.2000, № 2000112950/14 (Россия). – 5 с.
14. Федорищев И. А. Гиалуроновая кислота и основные ее направления применения в медицине / В. Г. Волков, В. В. Строителев, И. А. Федорищев // ВНМТ. – 2001. – Т. VIII, № 1. – С. 68.

15. Федорищев И. А. Получение препарата на основе модифицированной гиалуроновой кислоты для применения в медицине / Г. А. Галкина, О. Н. Пономарева, А. В. Рудаков, И. А. Федорищев // Известия Тульского государственного университета. Сер. химия.– 2002.– № 3.– С. 100–104.

16. Федорищев И. А. Исследование характера модификации гиалуроновой кислоты методом ИК-спектроскопии / А. Я. Каминский, Г. А. Зараева, О. Н. Пономарева, И. А. Федорищев // Изв. Тул. У. Сер. химия.– 2004.– № 4.– С. 222–228.

17. Федорищев И. А. Гиалуроновая кислота в лечении ран и ожогов / Е. Н. Матчин, В. Л. Потапов, В. В. Строителев, И. А. Федорищев // Научно-практический журнал "Комбустиология".– 2002.– № 11.– С. 38–39.

18. Средство для лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов (варианты), способ лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов (варианты) и устройство для доставки лекарственного средства к пораженному участку: пат. 2268052, МКИ 07 А61К35/78 / В. В. Строителев, И. А. Федорищев, М. Б. Хазов.– № 22680520; Заявлено 27.01.2004; Оpubл. 10.07.2005, Приоритет 27.01.2004, № 2004101940/15 (Россия) – 16 с.

19. Способ получения водорастворимых солевых комплексов гиалуроновой кислоты (варианты); пат. 22800412, МКИ 07 С08В37/08 / М. Б. Хазов, И. А. Федорищев, А. В. Рудаков. – № 2280041; Заявлено 21.04.2005; Оpubл. 20.07.2006, Приоритет 21.04.2005, № 2005111788/04 (Россия). – 14 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПГ	– агрегаты протеингликанов;
ГК	– гиалуроновая кислота;
ДВС	– дивинилсульфон;
ИК	– инфракрасный (диапазон);
МГК	– модифицированная гиалуроновая кислота;
НГВП	– нестероидные противовоспалительные препараты;
ОА	– остеоартроз;
ПХКС	– протеинхондритинкераганеульфат;
УФ	– ультрафиолетовый (диапазон);
ФСП	– фармакопейная статья предприятия;
ЭМИ	– электромагнитное излучение.

Отпечатано в Издательском центре ТГПУ им. Л. Н. Толстого.
300026, Тула, просп. Ленина, 125.

Формат 60×90/16. Бумага офсетная. Печать трафаретная.
Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз. Заказ 06/147.