

УДК 577.152.34:615.468

НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ МАТЕРИАЛОВ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ ВЫДЕЛЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА

Н. Р. Кильдеева^{1*}, В. Г. Бабак², Г. А. Вихорева¹, Е. П. Агеев³, М. А. Голуб³,
Л. С. Гальбрайт¹, Е. А. Меркович¹

(¹Московский государственный текстильный университет, ²Институт элементоорганических соединений РАН, ³химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; тел: 955-20-60)

Для модификации содержащих трипсин водорастворимых хитозановых пленок предложена поверхностная обработка раствором ПАВ (додецилсульфатом натрия). Модифицированные пленки состоят из слоев с различными свойствами: нерастворимого в воде поверхностного слоя и внутреннего водорастворимого слоя. В результате поверхностной модификации был получен полимерный материал с контролируемым выделением трипсина, набухающий в 0,9% NaCl на 4000%. Метод позволяет получать материал не только в виде пленок, но и в виде капсул различного размера.

Одной из наиболее распространенных причин заболеваний хирургического профиля является гнойная инфекция [1]. Причиной многих гнойных заболеваний являются не только травмы, ожоги, огнестрельные ранения, но также и послеоперационные осложнения.

В основе физиологии очищения ран лежат ферментативные процессы, поэтому в современной хирургии на стадии очищения ран от гноя используют протеолитические ферменты, расщепляющие при местном применении девитализированные ткани и способствующие их отторжению, не повреждая здоровых [2]. Основные средства, используемые хирургами для лечения ран, – перевязочные материалы, дренажи (трубки или полоски для оттока раневого отделяемого) и хирургические нити. Размещение на открытой ране любого материала несет опасность ее повторного инфицирования, поэтому применение материалов, содержащих протеолитические ферменты, способные подавлять развитие раневой инфекции, позволяет повысить эффективность использования хирургических средств и снизить вероятность нагноения [3].

При разработке материалов, используемых для пролонгированной энзимотерапии, одной из важнейших проблем, определяющих эффективность лечебного действия, является регулирование скорости перехода в рану лекарственного вещества. В отсутствие ковалентной связи с носителем выделение фермента происходит за счет диффузии макромолекул растворившегося белка в окружающую среду из набухшей полимерной системы. Поэтому регулирование кинетики выделения ферментов, включенных в полимерные материалы, осуществляется, в основном, с использованием двух подходов:

1) изменения условий формирования структуры полимерного материала;

2) введение в формовочные композиции компонентов, изменяющих диффузионно-кинетические свойства белка.

В первом случае формирование структуры, характеризующейся плотной упаковкой макромолекул и малыми межструктурными объемами, может быть достигнуто путем ориентационного вытягивания или изменением суперпозиции температурно-временных факторов процесса получения ферментсодержащих волокон или пленок [4]. Во втором изменении характеристик фермента происходит при его включении в состав полимерного материала в виде полиэлектролитных комплексов, молекулярная масса и размеры которых существенно выше, чем у нативного белка [5]. Эти два подхода были использованы нами ранее при разработке содержащих протеолитические ферменты дренажей и хирургических шовных нитей [6, 7].

Для эффективного очищения гнойных ран современные перевязочные средства должны обладать целым комплексом свойств, среди которых высокая сорбционная и влагоудерживающая способность, обеспечивающая удаление раневого экссудата, и низкая адгезия к ране, придающая материалу атравматичность. Чтобы получить материалы с таким комплексом свойств и пролонгированным некролитическим действием, мы реализовали новый подход, заключающийся в формировании на поверхности ферментсодержащей водорастворимой пленки нерастворимого в воде гидрофобного слоя.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие материалы: хитозан с молекулярной массой $2,5 \cdot 10^5$ и степенью дезацетилирования 0,87 (ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии), трипсин («Merk», Германия) с 68%-м содержанием ак-

*Адресат для переписки.

тивных центров, определенных по методу [8], додецилсульфат натрия (ДСН) и N-бензоил-L-аргинина метиловый эфир (БАМЭ) («Sigma», США).

Пленки получали из 2%-го раствора хитозана в 1%-й уксусной кислоте, содержащего трипсин (5% от массы хитозана), путем формования через щелевую фильеру с регулируемым размером щели и испарением растворителя при температуре 25°. Модификацию ферментсодержащих хитозановых пленок проводили инкубацией в 0,5%-м водном растворе ДСН с последующей сушкой при комнатной температуре. Капсулы получали капельным методом: капли 3%-го раствора хитозана, содержащего трипсин (соотношение хитозан : трипсин составляло 4 : 1), погружали в 0,7%-й раствор ДСН и выдерживали в нем в течение 1 ч, затем отделяли от раствора ПАВ и промывали дистиллированной водой.

Активность трипсина определяли по начальной скорости гидролиза БАМЭ на рН-стате («Радиометр», Дания) при рН 8,0 и температуре 25°. Набухание пленок изучали в 0,9 %-м растворе NaCl, степень набухания рассчитывали как отношение массы набухшей пленки к массе высушенной. Кинетику выделения трипсина в 0,95 %-й раствор NaCl изучали в статических условиях при соотношении полимерного материала и изотонического раствора 1:30 по изменению активности трипсина в растворе.

Результаты и обсуждение

Использование хитозана в качестве пленкообразующего полимера-носителя обусловлено наличием в нем реакционноспособных аминогрупп, которые в протонированной форме придают полимеру растворимость в воде. Природное происхождение и химическое строение макромолекулы хитозана обеспечивает ему биосовместимость и способность к биodeградации, комплексообразующие и ионообменные свойства, иммуностимулирующую

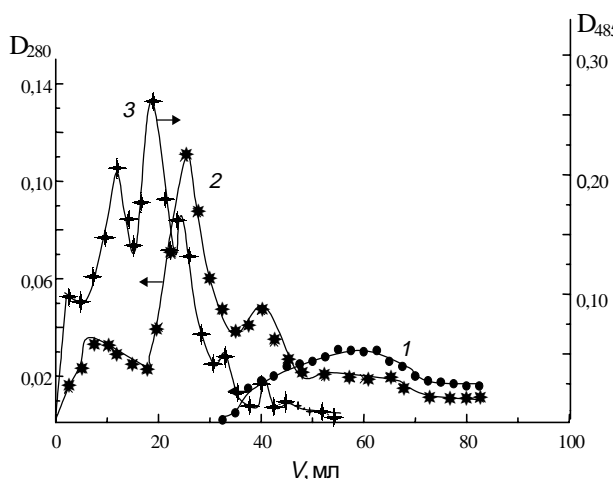


Рис. 1. Гель-хроматография на биоэле P-60 ($V_{\text{кол}} = 1,5 \times 29$ см) нативного трипсина (1) и композиции на основе раствора хитозана в 2%-й уксусной кислоте, содержащего трипсин (2, 3). Элюент – 2%-й раствор уксусной кислоты. Максимум поглощения трипсина при l_{280} (1, 2), максимум поглощения хитозана при l_{485} (3). Соотношение хитозан:трипсин = 5:1



Рис. 2. Схематическое изображение ферментсодержащих набухшей пленки (а) и капсулы (б), поверхностно модифицированных ДСН

ую и ранозаживляющую активность, при этом последняя может быть усилена присутствием протеолитического фермента. В качестве реагента для модифицирования поверхности хитозановой пленки нами был выбран ДСН, мицеллообразующее анионообменное ПАВ, способное к образованию ионных связей с протонированными аминогруппами. В результате модификации обработкой раствором ДСН на поверхности трипсинсодержащей хитозановой пленки формируется нерастворимый в воде слой ПАВ-полиэлектролитного комплекса. Таким образом, модифицированная пленка состоит из нерастворимых в воде поверхностных слоев и внутреннего слоя, в состав которого входят водорастворимые немодифицированные полимеры – хитозан и трипсин. Исследование смеси растворов трипсина и хитозана методом гель-хроматографии на колонке, предварительно откалиброванной по нативному трипсину и хитозану, показало, что значительная часть фермента входит в состав полиэлектролитного комплекса с хитозаном, о чем свидетельствует появление соответствующего пика на хроматограмме (рис. 1).

Использование для модификации пленок раствора ДСН с концентрацией, меньшей ККМ (0,23% [9]) не приводит к образованию прочного слоя на поверхности хитозановой пленки, поэтому в работе использовался мицеллярный раствор ПАВ с концентрацией 0,5–0,7%. В связи с этим структура поверхностного слоя может быть представлена как трехмерная сетка, образованная мицеллоподобными кластерами ПАВ-полиэлектролитных комплексов, соединенных макромолекулярными цепями хитозана и белка. О том, что в состав поверхностного слоя входит трипсин, свидетельствует его способность к гидролизу специфического субстрата (БАМЭ). Поверхность модифицированной ферментсодержащей пленки представляет собой полупроницаемую мембрану толщиной ~10 мкм, позволяющую воде проникать в пленку. В результате увеличения объема внутреннего слоя поверхностная мембрана растягивается и выделение фермента из пленки ограничивается только размерами полиэлектролитного комплекса и проницаемостью поверхностной мембраны. Таким образом, набухшая в воде модифицированная пленка представляет собой контейнер (рис. 2), внутри которого находится раствор хитозана и белка, поэтому используемое в дальней-

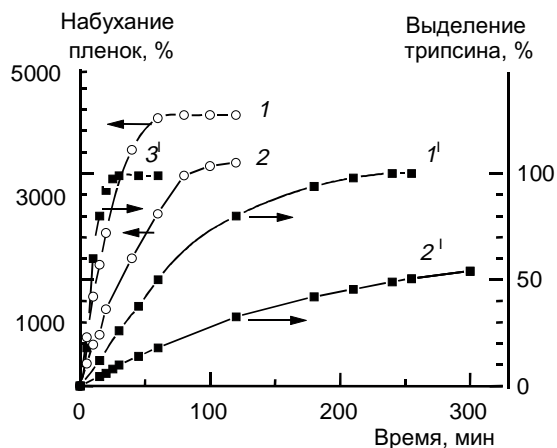


Рис. 3. Кинетика изменения свойств трипсинсодержащих хитозановых пленок в 0,9 М растворе NaCl: 1, 2 – набухание; 1'–3' – выделение белка; модифицирование пленок в течение (мин): 1, 1' – 15, 2, 2' – 60; 3' – немодифицированная пленка

шем для характеристики материала понятие «степень набухания» достаточно условно. Обработка ДСН позволяет получить пленочный материал, масса которого в изотоническом растворе изменяется на 4000%. Ни один из известных перевязочных материалов не обладает столь значительной способностью сорбировать и удерживать влагу без потери целостности.

Немодифицированная хитозановая пленка водорастворима, поэтому трипсин переходит в 0,9%-й раствор NaCl в течение 15 мин. Нерастворимая в воде поверхностная мембрана позволяет макромолекулам белка диффундировать во внешний раствор, но в значительной степени замедляет этот процесс (рис. 3).

Как степень набухания, так и скорость выделения белка можно регулировать изменением толщины поверхностного слоя, который при прочих равных условиях зависит от продолжительности обработки пленки раствором ДСН (рис. 3). Полученные данные показывают, что использование поверхностно модифицированной хитозановой мембраны позволяет поддерживать терапевтическую концентрацию фермента в модельной среде в течение нескольких часов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Даценко Б.М., Белов С.Г., Тамм Т.И. Гнойная рана. М., 1985.
 2. Гостищев В.К., Затолокин В.Д., Сажин В.П. Бактериальные протеолитические ферменты в гнойной хирургии. Воронеж, 1985.
 3. Адамян А.А., Глянцев С.П. // Хирургия. 1992. № 7–8. С. 105.
 4. Кильдеева Н.Р., Гальбрайт Л.С. // Химические волокна. 1999. № 5. С. 28.
 5. Balabushevitch N.G., Kildeeva N.R., Moroz N.A., Trusova S.P., Virnik A.D., Khromov G.L., Larionova N.I. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1997. 61. P. 129.

Таким образом, использование предложенного подхода, заключающегося в формировании на поверхности хитозановой протеазосодержащей пленки поверхностной мембраны, ограничивающей ее растворение, позволило получить материал со следующими свойствами:

- 1) высокой сорбционной способностью;
- 2) способностью удерживать до 4000 % влаги без потери целостности.
- 3) антиадгезионными свойствами;
- 4) контролируемым выделением протеолитического фермента.

Метод поверхностного модифицирования позволяет получить полимерные системы с пролонгированным действием ферментов не только в виде пленок, но и в виде капсул размером 1–3 мкм, строение которых приведено на рис. 2. Получение капсул капельным методом в растворе ДСН имеет свои особенности. При их получении образование поверхностного слоя происходит в результате диффузии мицелл ПАВ в раствор хитозана, в то время как при получении высоконабухающих пленок воздействию ПАВ подвергается твердая пленка. Поэтому скорость образования нерастворимой в воде мембраны на поверхности капль значительно выше, чем на поверхности пленок, и в течение часа толщина слоя может достигнуть 100–150 мкм. Следует отметить и различие в механизме выделения белка из капсул и пленок. Так как внутри капсулы находится раствор хитозана, то при погружении ее в 0,9%-й раствор NaCl она не изменяет объема, и мембрана на ее поверхности не подвергается растяжению, поэтому количество и скорость выделения белка из капсул ниже, чем из пленок, и составляет 20% от введенного в капсулу фермента за 5 ч инкубации в 0,9 %-м растворе NaCl.

Полученный высоконабухающий пленочный материал, обладающий протеолитической активностью, был испытан для лечения труднозаживающих ран сложной этиологии, так называемых «вяло экссудующих ран», т.е. ран с постоянным выделением раневого экссудата. Испытания проводили в отделении пластической микрохирургии Московского научно-исследовательского института онкологии имени П.А. Герцена. Помимо быстрого заживления ран, образовавшихся после удаления опухолей, отмечается гладкая эпителизация под поверхностью пленки и атравматичность последней.

6. Kildeeva N.R., Gostishev V.K., Tolstikh P.I. / Proc. Intern. Simp. Controlled Release of Bioactive Materials. 1997. Stocholm, P. 603.
 7. Virnik A.D., Kildeeva N.R., Krasovskaya S.B. / Химические волокна. 1994. № 5. С. 28.
 8. Chase T., Shaw E. / Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. 29. P. 508.
 9. Поверхностно-активные вещества и моющие средства / Под ред. А.А. Абрамзона. М., 1993.