

## **Получение ферментосодержащих хитозановых пленок с пролонгированным выходом ферментного препарата**

**Е. И. Кулиш, А. С. Мурзагильдина, Р. Х. Мударисова, С. В. Колесов**

---

Рассмотрено влияние модифицирования хитозановых пленок на выход протеолитических ферментов — пепсина, трипсина и коллагеназы из пленки. В качестве способов модифицирования рассмотрены термическое модифицирование пленок, обработка поверхности хитозановой пленки мицеллообразующим анионоактивным ПАВ — додецилсульфатом натрия и добавка антибиотика аминогликозидного ряда — амикацина.

**Ключевые слова:** хитозан, полимерные пленки, модифицирование, ферменты.

---

Modification influence chitosan films on an exit of proteolytic enzymes – pepsin, trypsin and collagenase from a film is considered. Films thermal modification, the treatment of the chitosan film surface with mycelo-forming anion-changing SAS –sodium dodecylsulphate and an antibiotic additive aminoglycoside line — amikatsina are considered as the modification method.

**Keywords:** chitosan, polymer films, modification, enzymes.

---

### **Введение**

В настоящее время производство перевязочных средств нового поколения, особенно за рубежом, превратилось в интенсивно развивающуюся отрасль химии полимеров медицинского назначения. Под термином “современное раневое покрытие” подразумевают не только привычные текстильные материалы (марля, сетка, трикотаж, нетканое полотно), но и различные пасты, гели и, главным образом, пленочные материалы [1, 2]. Требования к раневому покрытию существенно возросли: оно должно хорошо моделироваться на ране, быть атравматичным, обеспечивать возможность бесконтактного визуального контроля за раной, не оказывать токсического и местно-раздражающего действия, быть устойчивым к стерилизации, длительно эксплуатироваться на ране. Кроме того, от перевязочного средства ожидается и лечебное действие, поэтому многие из них являются носителями биологически активных веществ, десорбируемых в рану в необходимой дозировке [3]. Главная роль в осуществлении

перечисленных функций перевязочного средства принадлежит полимерной матрице, поскольку именно комплекс физико-химических характеристик полимеров определяет свойства и функции повязки. Полимером, исключительно подходящим на роль полимерной матрицы для создания современного раневого покрытия, является полисахарид природного происхождения хитозан (ХТЗ), который сочетает в себе комплекс уникальных свойств: биосовместимость и биоразлагаемость, антимикробная активность, высокая сорбционная способность и многие другие свойства [4]. Кроме того, немаловажным является тот факт, что ХТЗ легко растворяется в разбавленных кислотах (уксусной, муравьиной, соляной) и перерабатывается в пленки, характеризующиеся прочностью и эластичностью. На стадии очищения раны от некротических тканей целесообразно применение раневых покрытий, содержащих протеолитические ферменты. Использование ХТЗ, обладающего собственной физиологической активностью [5], как носителя ферментных препаратов пролонгированного действия, должно повысить эф-

фективность использования хирургических средств и снизить вероятность нагноения. Проблема, однако, заключается в том, что пленки ХТЗ, полученные в так называемой солевой форме, являются водорастворимыми. Вести речь о пролонгированной энзимотерапии в этом случае нельзя, так как при контакте с раневой поверхностью пленка быстро теряет целостность и этому ферментный препарат быстро выходит из полимерной матрицы.

Цель данной работы — поиск возможных путей модифицирования ферментосодержащих пленок ХТЗ для уменьшения скорости диффузии ферментов в водные среды при сохранении их исходной протеолитической активности.

### Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использован образец ХТЗ производства ЗАО “Биопрогресс” (Россия), полученный щелочным деацетилированием крабового хитина (степень деацетилирования ~84%), с молекулярной массой  $M_n = 80000$ , антибиотик аминогликозидного ряда амикацин и протеолитические ферменты колагеназа (ЗАО Биопрогресс, Щелково), пепсин (ООО Шако, Ростов-на Дону), трипсин (Микроген НПО ФГУП, Омск). Пленки ХТЗ получали методом полива раствора полимера в уксусной кислоте на поверхность стекла. Массовая концентрация полимера в исходном растворе составляла 2 г/дл. Концентрация уксусной кислоты в растворе составляла 1 г/дл. Соотношение ХТЗ:фермент составляло 2:1 по массе. Водный раствор ферментного препарата добавляли к раствору ХТЗ непосредственно перед формированием пленок. Содержание амикацина варьировали от 0,05 до 0,5 моль на моль ХТЗ. Толщину пленок во всех экспериментах поддерживали постоянной и равной 0,1 мм. Кинетику высвобождения фермента из пленочных образцов ХТЗ в водную среду изучали спектрофотометрически по оптической плотности  $A$  при  $\lambda = 280$  нм, соответствующей максимуму поглощения ферментных препаратов. Модифицирование пленки ХТЗ осуществляли тремя способами: 1) термическим модифицированием, заключающемся в прогреве сформированной пленки при температуре 45 – 100°C с увеличением времени прогрева [6]; 2) обработкой поверхностноактивным веществом — додецилсульфатом натрия (ДСН) с концентрацией равной 5 г/дл (выше критической концентрации мицеллообразования [7]); 3) добавлением антибиотика амикацина, водный раствор которого добавляли в ферментосодержащий раствор ХТЗ непосредственно перед приготовлением пленки. Количество амика-

цина, вводимое в пленку, составляло 0,05; 0,1 и 0,5 моль на моль ХТЗ. Активность ферментных препаратов оценивали по стандартной методике спектрофотометрическим методом Ансона [8].

### Обсуждение результатов

Некоторые подходы, позволяющие пролонгировать выход лекарственного препарата, были апробированы ранее для пленочных материалов с включенным внутрь полимерной матрицы антибиотиками [9, 10] Это, в первую очередь, термическое модифицирование пленок и обработка пленки мицеллярным раствором поверхностно активного вещества (ПАВ), например, додецилсульфатом натрия, приводящие к потере растворимости пленки в воде. Соответственно, скорость выхода лекарственного начала (в рассмотренных ранее случаях — антибиотиков) принципиальным образом уменьшается. Похожие закономерности наблюдаются и при использовании в качестве лекарственного начала ферментных препаратов. Прогрев пленочного материала при температуре порядка 100°C в течение 15 – 30 мин сопровождается потерей растворимости ферментосодержащей пленки в воде и, соответственно, существенному уменьшению скорости выхода ферментного препарата из пленки (табл. 1). Вместе с тем, прогрев при такой высокой температуре однозначно приводит к инактивации фермента. Уменьшение температуры, при которой проводится термомодифицирование, до температур порядка 40 – 45°C с соответствующим увеличением времени прогрева, приводит к тому, что только пленки, содержащие трипсин, теряют свою растворимость. В случае использования в качестве ферментных препаратов колагеназы и пепсина, прогрев даже в течение трех суток не приводит к сколь либо существенному уменьшению растворимости пленок в воде. Вместе с тем, протеолитическая активность ферментов падает.

В случае обработки ферментосодержащих пленок ХТЗ раствором ПАВ наблюдаются следующие закономерности — по мере увеличения концентрации ПАВ в растворе и времени обработки пленок, скорость выхода фермента из пленки в значительной мере уменьшается. Однако в этом случае, выходящий из пленки фермент также практически полностью теряет свою активность и составляет не более 3 – 5% от нативной. Таким образом, получается, что этот очень действенный способ модифицирования матрицы ХТЗ, а следовательно, и регулирования скорости выхода лекарственного препарата из пленок, не может быть использован в медицинской практике. Кроме

Таблица 1

Влияние условий модифицирования ферментосодержащих пленок на транспортные свойства ХТЗ

Ферментный препарат	Способ модифицирования	Время, мин/ Температура, °С	Начальная скорость ХТЗ, $Q^*$ /ч	Протеолитическая активность, Е/г
Трипсин	Исходная пленка	—	100,0	48
	Термическое модифицирование	15/100	2,4	5
		30/100	2,3	3
		180/45	2,8	32
		3600/45	2,70	25
Коллагеназа	Обработка раствором ПАВ	15/25	2,3	3
	Исходная пленка	—	100,0	65
		15/100	2,5	6
		30/100	2,3	5
		180/45	95,2	54
3600/45	90,4	40		
Пепсин	Обработка раствором ПАВ	15/25	2,3	4
	Исходная пленка	—	100	35
		15/100	2,5	6
		30/100	2,4	5
		180/45	98,5	26
3600/45	98,0	24		
	Обработка раствором ПАВ	15/25	2,3	2

$Q^*$  — масс. % ферментного препарата от его исходного количества, введенного в пленку.

Таблица 2

Влияние модифицирования ферментосодержащих пленок антибиотиком амикацином на транспортные свойства ХТЗ

Фермент	Содержание амикацина, моль/моль ХТЗ	Начальная скорость ХТЗ, $Q^*$ /ч	Протеолитическая активность, Е/г
Трипсин	0,05	8,5	48
	0,10	2,9	46
	0,50	1,9	46
Коллагеназа	0,05	4,1	65
	0,10	2,4	65
	0,50	1,2	64
Пепсин	0,05	3,1	35
	0,10	2,1	32
	0,50	1,2	32

того, пленки ХТЗ, модифицированные раствором ПАВ, обладают невысокими механическими свойствами.

При исследовании взаимодействия ХТЗ с антибиотиками аминокликозидного ряда — амикацином и гентамицином ранее было обнаружено, что ХТЗ с этими лекарственными препаратами образует комплекс средней устойчивости посредством водородных связей [11]. Было установлено, что количество антибиотика, комплексно связанного с ХТЗ, довольно велико и составляет порядка 70 масс. %. Это позволяет использовать систему ХТЗ-антибиотик аминокликозидного ряда как матрицу для пролонгированного выделения третьего компонента — протеолитического фермента. При этом чем больше антибиотика находится в пленке ХТЗ, тем труднее выходит из пленки ферментный препарат (табл. 2). В этом случае, активность фермента не теряется при взаимодействии

с антибиотиком. Следовательно, уменьшение растворимости пленки ХТЗ, достигаемое за счет третьего компонента — антибиотика амикацина, приводит к возможности существенно уменьшить скорость высвобождения протеолитических ферментов из матрицы ХТЗ.

#### Заключение

Наиболее эффективный способ модифицирования пленок ХТЗ — антибиотиком аминокликозидного ряда амикацином, позволяющего создать пленочный ферментосодержащий материал с пролонгированным выходом ферментного препарата. Именно в этом случае достигаются положительные результаты не только по уменьшению скорости выхода ферментных препаратов, но и сохранению их протеолитической активности на высоком уровне.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и республики Башкортостан (грант р\_волжье\_а № 11-03-97016)*

### **Литература**

1. Биологически активные перевязочные средства в комплексном лечении гнойно-некротических ран. Под ред. Федорова В. Д., Чижа И.М. М.: Медицинская энциклопедия РФ, 2000, 36 с.
2. Жуковский В.А., Жуковская И.И., Воронова И.Г. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов. Материалы II междунар. конф. "Современные подходы к разработке перевязочных средств", 21 – 22 ноября 1995 г., Москва, М.: Медицинская энциклопедия РФ, 1995, с. 314 – 315.
3. Кузин М. И., Костюченко Б. М. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина. 1981, 592 с.
4. Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002, 360 с.
5. Платэ Н. А., Васильев А. Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986, 296 с.
6. Зоткин М.А., Вихорева Г.А., Кечекьян А.С. Термическая модификация хитозановых пленок в солевой форме из различных кислот. Высокомолекулярные соединения, 2004, т. 46, № 2, с. 359 – 363.
7. Кильдеева Н.Р., Бабак В.Г., Вихорева Г.А. и др. Новый подход к созданию материалов с контролируемым выделением лекарственного вещества. Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия, 2000, т. 41, № 6, с. 423 – 425 .
8. Алексеенко Л.П. Современные методы в биохимии. Т.2. М.: Медицина. 1968, 112 с.
9. Мударисова Р.Х., Кулиш Е.И., Колесов С.В., Монаков Ю.Б. Исследование взаимодействия хитозана с цефазолином. Журнал прикладной химии, 2009, т. 82, № 5, с. 347 – 349.
10. Кулиш Е.И., Резяпова Н.Р., Мударисова Р.Х., Кузина Л.Г., Колесов С.В. Термически модифицированные пленки на основе хитозана и антибиотиков цефалоспоринового ряда. Вестник башкирского университета, 2009, т. 14, № 2, с. 377 – 380.
11. Мударисова Р.Х., Кулиш Е.И., Ершова Н.Р., Колесов С.В., Монаков Ю.Б. Изучение комплексообразования хитозана с антибиотиками амикацином и гентамицином. Журнал прикладной химии, 2010, т. 83, № 6, с. 1006 – 1008.

*Статья поступила в редакцию 10.10.2011 г.*

**Кулиш Елена Ивановна** — Башкирский государственный университет (г. Уфа), доктор химических наук, доцент, профессор. Специалист в области физико-химии полимеров. E-mail: alenakulich@rambler.ru.

**Мурзагильдина Анежела Саматовна** — Башкирский государственный университет (г. Уфа), аспирант. Специализируется в области физико-химии полимеров. E-mail: anzhela\_murzagil@mail.ru.

**Мударисова Роза Ханифовна** — Институт органической химии ИОХ УНЦ РАН (г. Уфа), кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Специалист в области физико-химии полимеров. E-mail: tudarisova@anrb.ru.

**Колесов Сергей Викторович** — Институт органической химии ИОХ УНЦ РАН (г. Уфа), доктор химических наук, профессор, руководитель отдела. Специалист в области физико-химии полимеров. E-mail: kolesovservic@rambler.ru.