

УДК 677.494-614:577.15  
©Коллектив авторов

## **ТЕКСТИЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ХИТОЗАН И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КРАБА, ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ**

***А.А. Белов\*, Е.Н. Белова, В.Н. Филатов***

НИИ текстильных материалов, Москва, РХТУ им. Д.И.Менделеева, Москва,  
тел/факс: (495) 3690207; эл. почта: ABelov2004@yandex.ru

На основе целлюлозы, окисленной целлюлозы и хитозана синтезированы носители, имеющие положительный заряд, на которые, был иммобилизован протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (ПК). Подобраны оптимальные условия, метод модификации и степень модификации текстильного носителя для иммобилизации, при которых практически не происходит инактивации ПК в процессе иммобилизации. Кинетика инактивации в процессе хранения иммобилизованного на текстильных носителях ПК, полученного в оптимальных условиях, аналогична кинетике инактивации иммобилизованного панкреатического трипсина.

Иммобилизация ПК на различные целлюлозные матрицы (независимо от их заряда) сужает профиль pH ферментативной активности в нейтральном и кислом диапазоне pH.

В экспериментах на крысах показано, что под влиянием нового материала значительно ускоряется течение раневого процесса, что выражается в сокращении средней продолжительности некролиза ткани, а также сроков заживления экспериментальных гнойных ран.

**Ключевые слова:** иммобилизация, хитозан, протеолитические ферменты, коллагеназа, инактивация, гнойные раны.

**ВВЕДЕНИЕ.** Попытки использования ферментов в клинической практике предпринимались давно. С первой трети XX века началось широкое и целенаправленное медицинское использование ферментов для терапевтических целей. Однако на пути ферментной терапии выявились серьезные трудности. Несмотря на высокую эффективность применения протеиназ в медицине и других областях, их использование ограничивают следующие факторы: инактивация при изменении pH и температуры, под действием ингибиторов тканей и крови,

---

\* - адресат для переписки

антигенные и пирогенные свойства. Если фермент введен непосредственно в организм пациента, он может оказаться в условиях, способствующих его денатурации, и активность фермента будет стремительно снижаться сразу после инъекции или местного применения раствора фермента [1]. Нативные ферментные препараты дороги и многие из них дефицитны, что ограничивает их широкое применение. Преодолеть эти недостатки удалось путем использования протеолитических комплексов, а также иммобилизацией ферментов (или комплексов) на различных природных и синтетических носителях [1-4]. Различными авторами показано, что смесь ферментов дает лучший результат, чем каждый фермент в отдельности. Синергизм действия смеси ферментов был отмечен при лечении ожогов, обморожений, воспалительных заболеваний, закупорках сосудов и при онкологических заболеваниях [2, 3].

Хитозан (Хт) является прекрасным носителем для иммобилизации ферментов (которые являются наиболее лабильными биологически активными веществами, БАВ), так как обладает высокой химической и биологической стойкостью, высокой механической прочностью, достаточной проницаемостью для самого фермента и субстратов, характеризуется высокой гидрофильностью и малой растворимостью, легко активируется для ковалентного связывания с БАВ [5]. В хитозан могут быть импрегнированы различные клетки, биологически активные вещества (в том числе ферменты, ингибиторы, гормоны, антибластомогенные вещества) и многие другие без значительной потери их биологических свойств [5, 6]. Установлено, что препараты на основе хитозана активизируют заживление ожоговой и раневой поверхности без образования рубцов, так как стимулируют рост коллагеновых волокон кожи, обеспечивающих эластичность кожных покровов [7].

НИИ текстильных материалов является основным разработчиком и производителем текстильных материалов содержащих разнообразные биологически активные вещества (БАВ). Хорошо известны и широко используются в медицине такие лекарственные препараты, как “Дальцекс-трипсин” (ФС 42-3008-99) и “Пакс-трипсин” (ВФС 42-1863-88), представляющие собой иммобилизованный трипсин (Тр) на диальдегидцеллюлозе (ДАЦ) и на активированном поликапроамиде (ПКА) соответственно [8]. Данные материалы используются в виде аппликаций, ваты, корпии или порошка, как перевязочные или косметологические средства для лечения и профилактики пролежней, гнойно-некротических, ожоговых и других ран. Для стерилизации иммобилизованных БАВ нами используется гамма облучение в дозе 25 кГрей при 293 К.

Одна из проблем, возникающих при эксплуатации иммобилизованных биологически активных материалов, - это изменение (падение) биологической активности (изменение лечебных свойств) после иммобилизации, гамма-облучения и в процессе хранения. Выпускаемые нами медицинские текстильные изделия сохраняют лечебные свойства при хранении в защищенном от света месте (температура хранения от 0 до 40°C) в воздушно-сухом, стерильном состоянии на протяжении минимум 3-х лет, имеют значение протеолитической активности не менее 0,1 ПЕ/г в конце срока хранения, кроме того, они должны быть стерильными на протяжении всего срока хранения, иметь влажность не более 10% [8].

Нами разработан новый класс текстильных носителей на основе целлюлозы и хитозана, содержащих разнообразные лекарственные препараты [9]. Примером такого нового ранозаживляющего препарата является “Мультиферм”, перевязочный материал с полиферментной активностью на основе целлюлозы, хитозана и комплекса протеолитических ферментов из гепатопанкреаса краба (ПК).

**МЕТОДИКА.** В работе использовали: ПК производства НПО “Биопрогресс” (Щелково МО, Россия); коллагеназу для пищевой промышленности ТУ 9281-004-11734126-00; протеолитическая активность 0,9 ПЕ/г; активность по ВАР<sub>Na</sub> 160 ммоль/г; трипсин из поджелудочной железы крупного рогатого скота производства ООО “Самсон-Мед” (С. Петербург, Россия)

(ФСП 9281-004-11734126-06; протеолитическая активность 6,8 ПЕ/г; активность по ВАР<sub>Na</sub> 1600 мМ/г); хитозан производства НПО “Биопрогресс” (Щелково, ТУ 9289-067-00472124-03, влажность препарата 10%, степень деацелирования 80,0%; кинематическая вязкость не менее 383,7 сСт; молекулярная масса 478 Да). Все остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже “хч”.

Активацию целлюлозного носителя в виде тканых полотен (медицинской марли), проводили перйодатом натрия, в результате чего получали диальдегидцеллюлозу (ДАЦ) требуемой степени модификации вторичных спиртовых групп. Количество альдегидных групп на носителе, определяли окислением ДАЦ йодом в слабощелочных условиях [10] и выражали в мгЭкв/г с учетом влажности носителя. Содержание белка на носителе определяли по методу Лоури-Гартри [11]. Протеолитическую активность (ПА) определяли методом Кунитца, по гидролизу 1% раствора казеина по Гаммерстену в 1/15 М фосфатном буфере, рН 8,0 [12], ВАР<sub>Na</sub>-амидазную активность (ФА) определяли по методу [13], в модификации [14] в растворе 0,05 М трис-НСl (рН 8,0).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Были найдены оптимальные условия, метод модификации и степень модификации текстильного носителя для иммобилизации [9, 15]. Выбор оптимальных условий иммобилизации (рН, температура, состав раствора для иммобилизации и др.) заключался в выборе таких параметров, чтобы в процессе иммобилизации относительная ферментативная активность достигала максимального значения и не изменялась до начала высушивания образцов, а падение активности в процессе высушивания и хранения оказывались минимальными. Кинетика инактивации в процессе хранения иммобилизованного на текстильных носителях ПК, аналогична кинетике инактивации иммобилизованного панкреатического трипсина (Тр) [16]. Кинетика инактивации иммобилизованных ферментов в процессе хранения описывается характерной для гидрогеназ сложной экспоненциальной ( $A_t/A_0 = a_1 \cdot e^{-k_1 \tau} + a_2 \cdot e^{-k_2 \tau}$ ) зависимостью. В полулогарифмических координатах установленные зависимости имеют вид ломаной линии, каждая из которых описывается уравнением первого порядка. Значения эффективных констант инактивации ( $k_{ин}$ ) для препаратов ДАЦ-Хт-ПК, полученных в оптимальных условиях в процессе хранения, равны  $k_1 = 0,24 \text{ мес}^{-1}$ , а  $k_2 = 0,095 \text{ мес}^{-1}$ . Кинетические закономерности такого рода могут быть объяснены общим механизмом инактивации, включающим существование двух форм фермента, различающихся активностью и устойчивостью к денатурирующим воздействиям. То есть, вне зависимости от конкретных деталей механизма и соотношения элементарных констант, двухэкспоненциальный характер инактивации показывает, что механизм инактивации включает, по крайней мере, две различающиеся по активности или устойчивости формы ферментов. Можно различить три стадии инактивации иммобилизованного фермента после иммобилизации, в процессе высушивания и хранения. Как и для Тр, значительные потери биологической активности проявляются при высушивании и в первые месяцы хранения иммобилизованных препаратов [16].

Гнойное воспаление характеризуется наиболее низким значением рН (6,0 и менее). В итоге концентрация ионов водорода может повышаться в 50 раз и более. Резкое падение рН влияет на действие химических медиаторов. Так, при рН 5,6 и ниже исчезают сосудосуживающее действие адреналина и антикоагуляционный эффект гепарина. Как было установлено, колебания рН раны значительны: от 4,0 до 9,0 [17]. Среднее значение рН при гнойно-воспалительных процессах в ранах после их хирургической обработки составило 5,7 – именно эта величина чаще всего приводится в литературе [17]. Нами была изучена кинетика термоинактивации немодифицированного и иммобилизованного ПК в растворах различного состава и рН в сравнении с Тр. При изучении термоинактивации в растворе ПК было установлено, что ПК является более устойчивым препаратом по сравнению с широко применяемым в хирургической практике панкреатическим Тр 8. Полученные данные приведены на рисунках 1 и 2 и в таблицах 1 и 2.

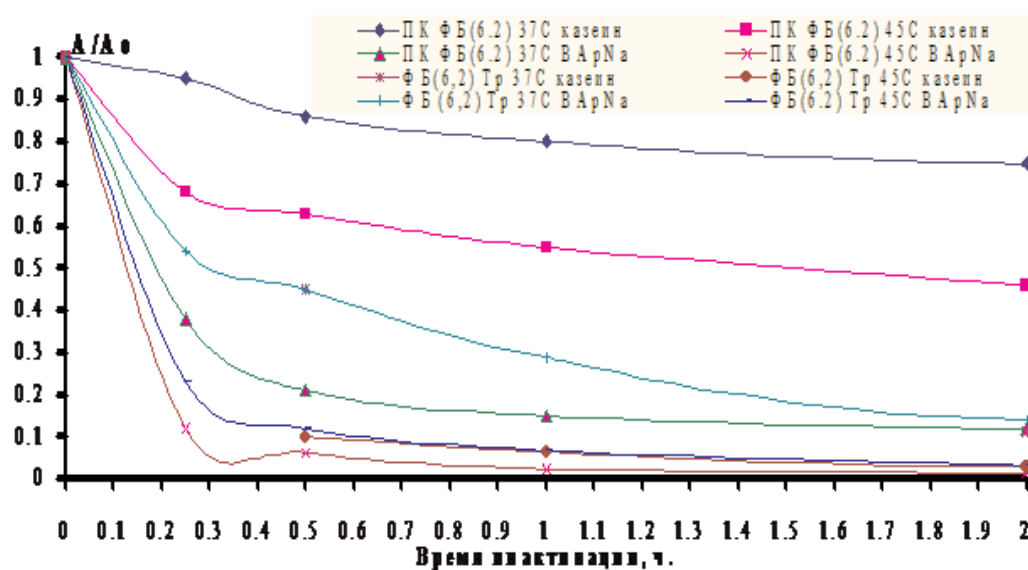


Рисунок 1.

Влияние условий термоинактивации на остаточную активность ферментов в зависимости от температуры и используемого субстрата для определения ферментативной активности А (концентрация ферментов 0,5 мг/мл, ФБ – 1/15 М раствор К-Na фосфатного буфера).

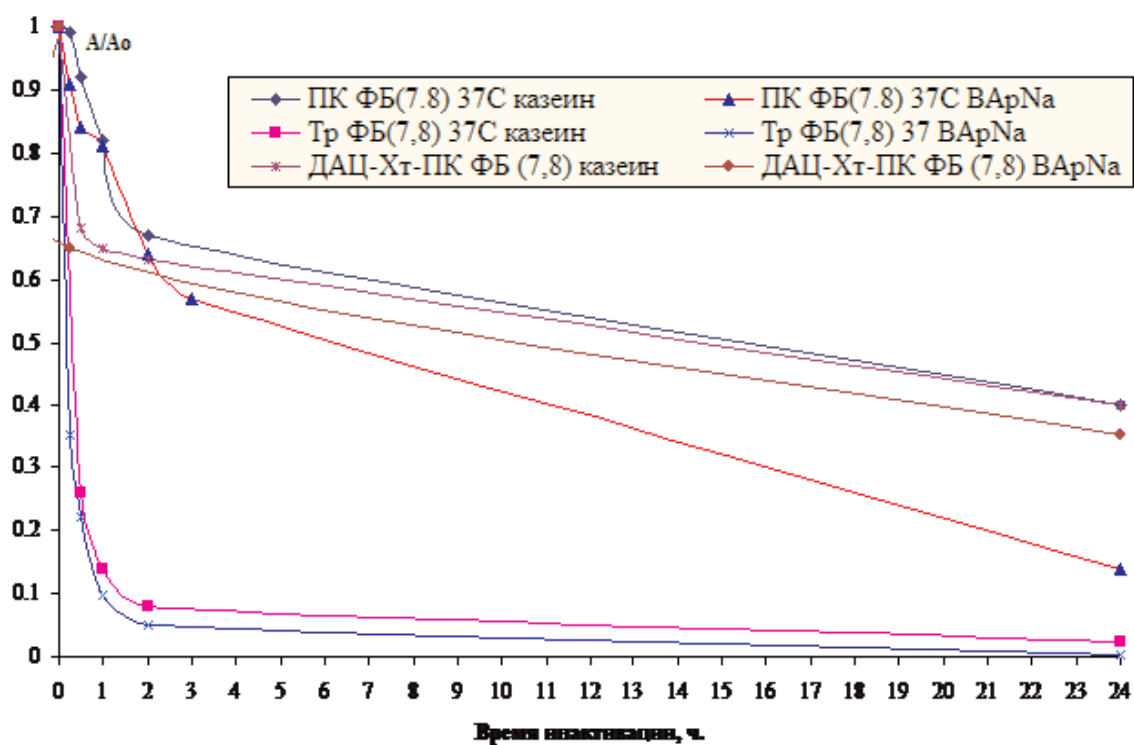


Рисунок 2.

Влияние условий термоинактивации на остаточную активность ( $A/A_0$ ) различных форм ферментных препаратов.

Таблица 1. Влияние условий инактивации и типа использованного субстрата на эффективные константы скорости инактивации растворов ПК и Тр.

Условия инактивации, субстрат		25°C	37°C	45°C
Казеин* 0,05 М трис-НСl рН 8,0	ПК	$k=0$	$k_1=0,18 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,020 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=0,58 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,024 \text{ ч}^{-1}$
	Тр	$k_1=0,35 \text{ ч}^{-1}$ $k_2=0,08 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=2,78 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,23 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=14,8 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=3,8 \text{ ч}^{-1}$
1/15 М ФБ рН 7,8 ВАрНа	ПК	$k=0$	$k_1=0,20 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,07 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=6,02 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,46 \text{ ч}^{-1}$
	Тр	$k_1=0,26 \text{ ч}^{-1}$ $k_2=0,09 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=2,55 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,13 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=9,9 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=2,6 \text{ ч}^{-1}$
1/15 М ФБ рН 6,2 ВАрНа	ПК	$k=0$	$k_1=2,23 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,029 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=6,62 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,80 \text{ ч}^{-1}$
	Тр	$k=0,05 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=1,08 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,11 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=4,6 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,86 \text{ ч}^{-1}$
0,05 М трис-НСl рН 8,0 ВАрНа	ПК	$k=0$	$k_1=0,004 \text{ ч}^{-1}$	$k=0,38 \text{ ч}^{-1}$
	Тр	$k_1=0,23 \text{ ч}^{-1}$ $k_2=0,04 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=1,52 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,16 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=5,2 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,95 \text{ ч}^{-1}$

Примечание. Для ПК при использовании в качестве субстрата казеина на величину константы инактивации (в пределах погрешности ее определения) в растворе не влияет ни концентрация используемого для инактивации комплекса (от 5 до 0,004 мг/мл), ни величина рН инактивации (от 5,5 до 8,2), ни состав раствора для инактивации (1/15 М ФБ, 0,05 М трис-НСl, 0,1 М NaCl). Для Тр концентрация фермента составляла 0,5 мг/мл.

Таблица 2. Влияние условий инактивации и типа использованного субстрата на остаточную ферментативную активность ( $A_t/A_0$ ) и эффективные константы скорости инактивации ДАЦ-Хт-ПК в буферном растворе.

субстрат	25°C	37°C	45°C
	0,05 М трис-НСl (рН 8,0)		
ВАрНа	$k=0$	$k_1=0$	$k_1=0,43 \text{ ч}^{-1}$
	1/15 М ФБ (рН 6,2)		
ВАрНа	$k=0$	$k_1=1,72 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,03 \text{ ч}^{-1}$	-
казеин	$k=0$	$k_1=0,33 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,04 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=2,2 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,6 \text{ ч}^{-1}$
	1/15 М ФБ (рН 7,8)		
ВАрНа	$k=0$	$k_1=1,17 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,03 \text{ ч}^{-1}$	-
казеин	$k=0$	$k_1=0,35 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,03 \text{ ч}^{-1}$	$k_1=2,0 \text{ ч}^{-1} \quad k_2=0,2 \text{ ч}^{-1}$

Примечание: 1/15М ФБ - 1/15 М раствор К-На фосфатного буфера заданного значения рН.



## МЕДИЦИНСКИЙ ТЕКСТИЛЬ, СОДЕРЖАЩИЙ ХИТОЗАН И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Как было нами установлено в специально проведенных опытах, модифицированный целлюлозный носитель предохраняет иммобилизованный препарат от белковых ингибиторов (ингибиторы плазмы крови 18, поливалентный ингибитор протеиназы типа Кунитца, соевый ингибитор трипсина).

Разработанный нами новый перевязочный материал “Мультиферм” был испытан в отделе медико-биологических исследований ФГУ ГНЦ Лазерной медицины Росздрава под руководством проф., д.м.н. П.И Толстых. Используемый материал имел следующие свойства: степень модификации ДАЦ – 0,75 мгЭкв/г; содержание хитозана 5,0 мг/г; содержание ПК 8,0 мг/г; ПА (субстрат казеин по Гаммерстену) – 0,4 ПЕ/г; pH водной вытяжки 7,8, влажность 4,8%. В экспериментах на крысах показано, что под влиянием нового материала значительно ускоряется течение раневого процесса, что выражается в сокращении средней продолжительности некролиза ткани, а также сроков заживления экспериментальных гнойных ран. Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты лечения гнойных ран препаратами иммобилизованных ферментов.

п/п	Изучаемые образцы	Количество животных, п	Очищение ран, сутки	Заживление ран, сутки
1	Животные без лечения (контроль 1)	20	14,2±0,35	27,3±0,15
2	Диальдегидцеллюлоза (контроль 2)	20	13,3±0,6	24,2±0,5
3	Салфетка с трипсином «Дальцекс-трипсин» (контроль 3)	20	4,8±0,4	16,2±0,3
4	Аппликация «Мультиферм»	20	3,0±0,2	12,1±0,1

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Применение иммобилизованного ферментного комплекса на основе гепатопанкреаса краба позволило сократить сроки появления грануляций и эпителизации по сравнению с салфеткой с трипсином и диальдегидцеллюлозой. Сроки очищения сокращались до 3,0±0,2 суток, а сроки полного заживления ран в среднем, до 12,1±0,1 суток.

Таким образом, нами показано, что по степени ускорения процессов очищения и заживления аппликация “Мультиферм” значительно превосходит действие иммобилизованного на той же основе трипсина.

В ходе выполнения данной работы на основе хитозана, ПК и модифицированной целлюлозы было разработано медицинское изделие “Мультиферм” для которого были проведены токсикологические, медико-биологические и клинические исследования, приказом МинЗдрав и Соц. развития оно разрешено к промышленному выпуску и применению в лечебных учреждениях РФ для лечения гнойно-некротических и ожоговых ран, пролежней и т.п.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И.В., Клесов А.А., Казанская Н.Ф. и др. (1987) в кн.: Биотехнология, том 8. Инженерная энзимология, М., сс. 113-143.
2. Москвичев Б.В., Поляк М.С. (1992) Иммобилизованные ферменты, М.-Серпухов, 112 с.
3. Вольф М., Рансбергер К. (1976) Лечение ферментами, М.: Мир. с. 46-47.

4. Варфоломеев С.Д. (2005) Химическая энзимология, М.: Академия, 472 с.
5. Марквичева Е.А. (2005) Клетки, белки, пептиды, иммобилизованные в композитные гидрогели: получение, свойства, применение в биотехнологии и биомедицине. Автореф. дисс. докт.наук, НИИ биоорганической химии РАН Москва .
6. Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. (ред.) (2002) Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М., Наука.
7. Цыган В.Н., Жоголев К.Н., Никитин В.Ю. (2002) Рынок БАД, 4(2).
8. Машиковский М.Д. (2002) Лекарственные средства. 14-е изд.
9. Белов А.А., Филатов В.Н., Белова Е.Н., Кузьмина И.В. (2006) в Сб. научн. тр. ФГУП НИИТМ М.: Дипак, сс. 34-42.
10. Белов А.А., Гриценко С.И., Рыльцев В.В. (1990) в Сб. научн. тр. ВНИИТГП М., ЦНИИТЭИ Легпром, сс. 36-39.
11. Белов А.А., Плеханова Н.Ю., Вирник Р.Б., Игнатюк Т.Е. (1988) в Сб. научн. тр. ВНИИТГП М., ЦНИИТЭИ Легпром, сс. 25-29.
12. Белов А.А., Рыльцев В.В., Игнатюк Т.Е. (1992) Хим.-фарм. журн., №11-12, 101-103.
13. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) Arch. Biochem. Biophys., **95**(2), 271-278.
14. Шатерников В.А. (1969) в кн.: Биохимические методы исследования в клинике (ред. Покровский А.А.) М.: Медицина, сс. 206-209.
15. Белов А.А., Филатов В.Н., Белова Е.Н., Филатов Н.В. Медицинская повязка, содержащая комплекс протеолитических ферментов, включая коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса краба. Патент РФ № 2268751.
16. Белов А.А., Казанская Н.Ф., Филатов В.Н., Белова Е.Н. (2006) Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2, Химия **47**(1), 87-90.
17. Кузин М.И., Костюченко Б.М. (ред.) (1990) Рана и раневая инфекция. Руководство для врачей. М.: Медицина.
18. Белов А.А., Белова Л.А., Филатов В.Н. и др. (2003) Вестн. Моск. Ун-та, сер.2., Химия, **44**(1), 16-19.

Поступила: 02. 07. 2007.

# THE TEXTILE MATERIALS CONTAINING CHITOSAN AND PROTEOLYTIC COMPLEX FROM HEPATOPANCREAS OF THE CRAB, FOR THE MEDICAL PURPOSES

*A.A. Belov, E.N. Belova, V.N. Filatov*

Research Institute of Textile Materials, Moscow, Mendeleyev Russian University of Chemical Engineering, Moscow, tel/fax: (495) 3690207; e-mail: ABelov2004@ yandex.ru.

Positively charged carriers were synthesized on the basis of the cellulose, oxidized cellulose and chitosan; they were used for immobilization of the proteolytic complex from crab hepatopancreas (CHP). Optimum conditions, a method of updating and a degree of updating of the textile carrier for immobilizations at which practically does not occur inactivation the CHP in process immobilizations were found. Under optimal conditions inactivation kinetics during storage of CHP immobilized on the textile carriers was similar to the inactivation kinetics of immobilized pancreatic trypsin.

Experiments on rats have shown, that employment of a new material accelerated wound healing process.

**Key words:** immobilization, chitosan, proteolytics enzymes, collagenase, inactivation, purulent wounds.