



УДК 615.355:577.152.34

© 2009

И. И. Романовская

Потенциальное раневое покрытие с трипсином, иммобилизованным в модифицированный поли-N-винилпирролидон

(Представлено академиком НАН Украины С. А. Андронатом)

З використанням модифікованого золем полікремнієвої кислоти полі-N-вінілпіролідону було розроблено нерозчинне в фізіологічних умовах потенціально раневе гідрогелеве покриття з іммобілізованим трипсином з високим виходом за активністю (75,6%), стабільністю при зберіганні та γ -стерилізації, пролонгованої дії. Розширення профілю протейолітичної активності в область кислих значень рН, визначення кінетичних параметрів іммобілізованого ферменту дозволяють оптимізувати дозу й активність іммобілізованого препарату.

Современные полимерные раневые покрытия с биологически активными веществами (БАВ) отличаются от традиционных текстильных материалов и представлены гелями, гидроколлоидами, пленками, пленкообразующими композициями и др. [1, 2]. Поскольку в настоящее время установлено, что процесс репарации раны является ферментативным с необходимым присутствием влажной среды, актуальна разработка нерастворимых в физиологических условиях неадгезивных полимерных гидрогелевых покрытий с иммобилизованными протеолитическими ферментами. Последние способны размягчать и лизировать некротические образования, обладают антимикробной активностью и охлаждающим действием, хорошо моделируются и не травмируют рану, позволяют визуально контролировать ее состояние [3].

Перспективным носителем для создания подобных материалов является широко используемый в медицине поли-N-винилпирролидон, который характеризуется собственной физиологической активностью, отсутствием токсичности, возможностью модификации [4].

Трипсин — протеолитический фермент с широкой субстратной специфичностью — избирательно деградирует некротизированные ткани, разжижает сгустки крови, снижает резистентность гнойной микрофлоры к антибиотикам, тем самым ускоряя процесс заживления гнойных ран, что позволяет использовать его в раневых покрытиях преимущественно сорбционного типа (текстильные повязки Дальцекс-трипсин, ПАКС-трипсин) [5, 6]. Однако

иммобилизация трипсина в нерастворимую полимерную матрицу в ряде случаев приводит к существенной потере исходной активности (на 33% в пленках из фторопласта [7], на 58% в гидрогелевых пленках хитозана, модифицированного додецилсульфатом натрия [8]).

В связи с этим представляет интерес разработка нового гидрогелевого раневого покрытия с трипсином на основе модифицированного золем поликремниевой кислоты поли-N-винилпирролидона и подробное исследование физико-химических характеристик препарата.

Материалы и методы исследований. В работе использовали трипсин (К. Ф. 3.4.21.4) (фирмы “Merck”, ФРГ) с исходной протеолитической активностью (216 ± 11) ПЕ/г фермента; поли-N-винилпирролидон (ПВП) ($MM\ 2 \cdot 10^6$), золь поликремниевой кислоты.

Протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [9], содержание белка — методом Лоури-Хартри [10]. ПВП модифицировали, согласно [3]. Вязкость растворов определяли, согласно данным работы [11]. Иммуобилизацию трипсина проводили в ходе модификации матрицы, смесь перемешивали до однородной консистенции, выливали в формы, высушивали при комнатной температуре до 45%-го содержания воды, герметично упаковывали и стерилизовали γ -облучением (15 кГр, ООО “Темопласт”). ИК-спектры ПВП снимали в пленках и таблетках KBr на спектрофотометре Specord IR-75.

Зависимости протеолитической активности свободного и иммобилизованного трипсина от pH и температуры изучали в одинаковых по активностям пробах после инкубации в буферных растворах (pH 3,0–12,0) и в диапазоне температур от 10 до 80 °C (pH 7,4). pK ионогенных групп активного центра фермента определяли графически [12].

Для исследования термостабильности равные по активности пробы термостатировали при 60 °C и определяли остаточную активность с интервалом 10–20 мин. Константы скорости термоинактивации ($K_{ин}$) вычисляли по тангенсу угла наклона прямой графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени методом линейной регрессии. Кинетику гидролиза свободным и иммобилизованным трипсином исследовали по начальным скоростям гидролиза казеина, представляли в графической форме в координатах Хейнса. Константу субстратного ингибирования фермента k_i , оптимальную концентрацию субстрата $S_{опт}$ и оптимальную скорость реакции $V_{опт}$ определяли методом Диксона [13].

Результаты и их обсуждение. Матрица для иммобилизации разработана совместно со с. н. с. И. И. Пашкиным (Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова). Модифицированный ПВП представляет собой органо-неорганический гибрид — продукт объединения кремнийсодержащего соединения и высокомолекулярного ПВП в целостную структуру, при этом носитель теряет способность растворяться в воде, что позволяет получать нерастворимые в физиологических условиях покрытия. Получению такой матрицы способствуют множественные водородные связи между атомами кислорода карбонильных групп молекул органического полимера и водорода силанольных групп золя поликремниевой кислоты, образующиеся в результате процессов структурообразования в мягких условиях.

В ИК-спектрах модифицированного ПВП наблюдается снижение интенсивности полосы поглощения при 3750 см^{-1} , которая характеризует свободные силанольные группы и появление широкой полосы с максимумом около 3350 см^{-1} , отвечающей силанольным группам, участвующим в образовании водородной связи.

Установлено оптимальное массовое соотношение фермент : ПВП 1 : 10, способствующее сохранению высокого уровня включения фермента и удовлетворительных органолептиче-

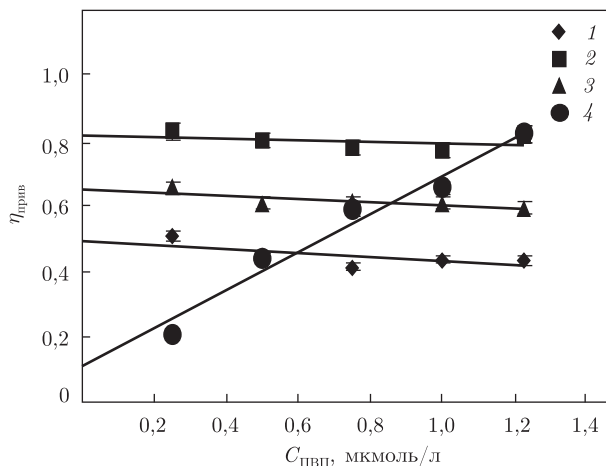


Рис. 1. Зависимость приведенной вязкости растворов от концентрации ПВП: 1 — ПВП; 2 — ПВП + золь поликремниевой кислоты; 3 — ПВП + фермент; 4 — ПВП + фермент + золь поликремниевой кислоты

ских характеристик материала. В результате иммобилизации получены прозрачные эластичные пленки с количественным включением белка, 75,6%-м сохранением протеолитической активности после иммобилизации и 100%-м в течение 8 мес. хранения при 0–4 °С.

Характеристики трипсина, иммобилизованного в модифицированный ПВП:

протеолитическая активность, ПЕ/г препарата:	163,4 ± 3,6;
содержание фермента, мг/г препарата:	8,11 ± 0,32;
содержание воды, %:	45,0;
органолептические характеристики:	однородные, эластичные пленки, без запаха;
площадь, см ² :	64,1 ± 1,9;
толщина, мм:	3,5 ± 0,3;
масса, г:	5,5 ± 0,2;
растворимость в воде, физ. растворе:	нерастворимы.

О наличии взаимодействия фермент — матрица свидетельствуют изменения реологических характеристик растворов ПВП, трипсина и модификатора. Нами показано, что вязкость растворов в присутствии в нем трех компонентов: ПВП, фермента и золя поликремниевой кислоты резко увеличивается при возрастании концентрации ПВП (рис. 1), что указывает на образование комплексов белка с компонентами матрицы [4]. Взаимодействие носит достаточно сложный характер и может быть обусловлено также механическим включением в сшитый золем поликремниевой кислотой полимер.

Экспериментальные исследования свойств полученного препарата показали расширение рН-оптимума на 4 ед. в область кислых значений (рН 4,0–9,0) (рис. 2, а), обусловленное влиянием высокого значения рН матрицы в процессе иммобилизации на рК ионогенных групп активного центра трипсина (табл. 1). Иммобилизованный трипсин стабилен при рН 5,5, характерном для содержимого раны, и после 3 ч инкубации полностью сохраняет активность, тогда как свободный за это же время утрачивает ее на 65%.

Установлено, что иммобилизация приводит к деформации термопрофиля активности и расширению температурного оптимума (37–50 °С) препарата (см. рис. 2, б), что предполагает его меньшую склонность к инактивации в условиях повышенных температур и под-

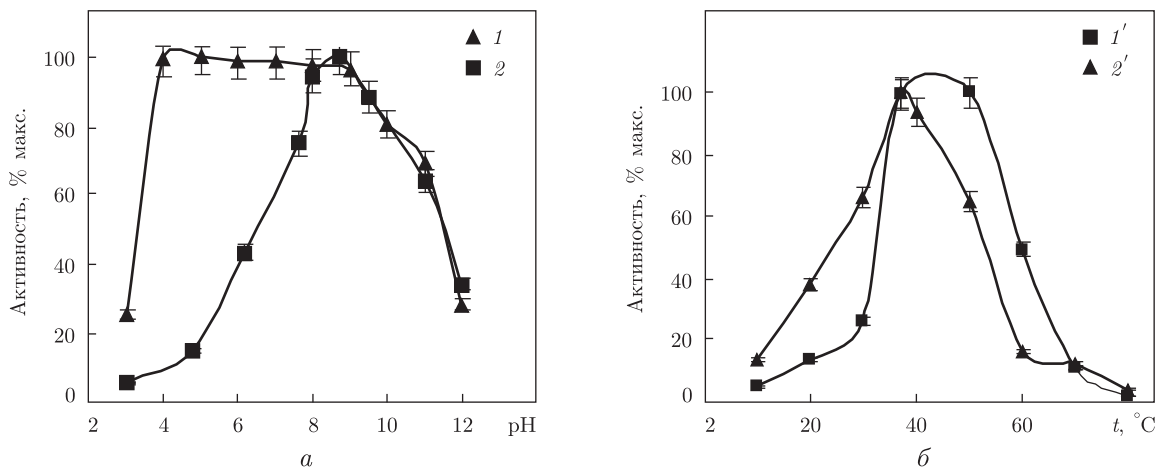


Рис. 2. Зависимость протеолитической активности свободного и иммобилизованного трипсина от рН (а) и температуры (б) инкубационной среды. Трипсин: 1, 1' — иммобилизованный; 2, 2' — свободный

тверждается найденными $K_{ин}$, составившими для свободного и иммобилизованного трипсина 0,75 и 0,41 мин⁻¹ соответственно.

Кинетические параметры реакции гидролиза казеина двумя формами трипсина приведены в табл. 2. Следует отметить, что иммобилизация фермента приводит к изменению K_M вследствие увеличения в условиях гетерогенного катализа сродства фермента к субстрату, образования более прочного фермент-субстратного комплекса с уменьшением скорости его распада и, поскольку эта стадия является лимитирующей, то соответственно снижается скорость всего процесса. Уменьшение $V_{макс}$ обусловлено также диффузионными ограничениями матрицы. В диапазоне концентраций, превышающих 3,1 г/дм³ для свободного трипсина и 1,0 г/дм³ для иммобилизованного, наблюдается ингибирование фермента субстратом: k_i для свободного и иммобилизованного фермента составили 12,5 и 1,44 г/дм³ соответственно. Вычисленные $S_{опт}$ и $V_{опт}$ характеризуют концентрацию субстрата и скорость реакции в условиях минимального проявления ингибирования субстратом. Проведенные кинетические исследования позволяют в определенной степени прогнозировать скорость лизиса некротических образований и необходимую дозу препарата.

О десорбции иммобилизованного трипсина из матрицы судили по активности фермента, обнаруженного в инкубационной среде (рис. 3). Установлено, что после 1 ч инкубации по-

Таблица 1

Трипсин	рН-оптимум	pK_1	pK_2
Свободный	8,0–9,0	6,5	11,5
Иммобилизованный	4,0–9,0	3,2	11,4

Таблица 2

Трипсин	K_M , г/дм ³	$V_{макс}$, мкмоль/(г · мин)	k_i , г/дм ³	$S_{опт}$, г/дм ³	$V_{опт}$, мкмоль/(г · мин)
Свободный	0,67	608,6	12,5	3,1	458,25
Иммобилизованный	0,24	72,68	1,44	1,0	72,68

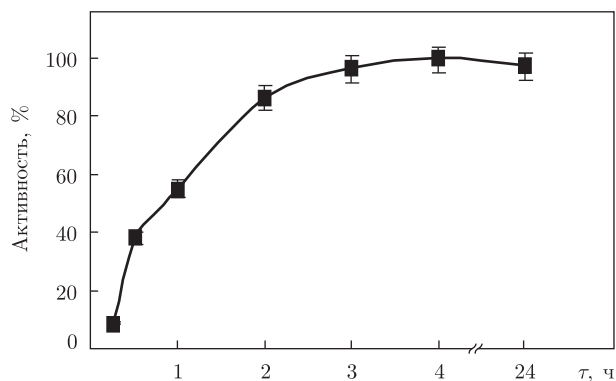


Рис. 3. Изменения протеолитической активности иммобилизованного трипсина при десорбции

лученного препарата уровень обнаруженной протеолитической активности составил 38,1%, достигая максимального через 4 ч и оставаясь неизменным в последующие 24 ч, т. е. иммобилизованный в структуру модифицированного полимера трипсин обеспечивает пролонгированное действие препарата, обусловленное стабилизирующим влиянием матрицы. Выявленное свойство отвечает современным требованиям оптимального времени нахождения повязки на ране (1–3 сут) [14], в течение которого должно проявляться биологическое действие лечебного покрытия.

После стерилизации протеолитическая активность иммобилизованного препарата составила 54,1% от исходной.

Таким образом, в результате иммобилизации трипсина в поли-N-винилпирролидон, модифицированный золем поликремниевой кислоты, получено потенциальное раневое гидрогелевое полимерное покрытие с высоким уровнем сохранения исходной активности, стабильностью в условиях значений pH раневого содержимого, при хранении и к стерилизации γ -облучением, пролонгированного протеолитического действия.

1. Юданова Т. Н., Решетов И. В. Современные раневые покрытия: получение и свойства: Обзор // Хим.-фарм. журн. – 2006. – **40**, № 2. – С. 24–31.
2. Валуев Л. И., Валуева Т. А., Валуев И. Л. и др. Полимерные системы для контролируемого выделения биологически активных соединений // Успехи химии. – 2003. – **43**, № 2. – С. 307–328.
3. Пат. РФ 2198685 С1. Медицинский полимерный гелевый материал и лечебные средства на его основе / И. И. Пашкин, В. Ю. Богачев, В. П. Зубов. – № 2001134048/14; Заявл. 18.12.01; Опубл. 20.02.03.
4. Кириш Ю. Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды: Синтез и физико-химические свойства. – Москва: Наука, 1998. – 252 с.
5. Эфендиев А. И., Толстых П. И., Дадашев А. И., Маршавя О. М. Местная пролонгированная энзимотерапия гнойных ран // Хирургия. – 1991. – № 7. – С. 48–50.
6. Назаренко Г. И., Сугурова И. Ю., Глянцев С. П. Рана. Повязка. Большой. – Москва: Медицина, 2002. – 472 с.
7. Вирник А. Д., Гостищев В. К., Кильдеева Н. Р. и др. Получение пленок и волокон, содержащих протеолитические ферменты // Прикл. биохимия и микробиология. – 1987. – **23**, № 2. – С. 78–83.
8. Кильдеева Н. Р., Бабаж В. Г., Меркович Е. А. и др. Включение ферментов в оболочки из ПАВ-полиэлектролитных комплексов на основе хитозана // Материалы VI Междунар. конф. “Новые достижения в исследовании хитина и хитозана”. – Москва: ВНИРО, 2001. – С. 350–352.
9. Польшгаллина Г. В., Чередниченко В. С., Римарева Л. В. Определение активности ферментов. – Москва: ДеЛи принт, 2003. – С. 230–231.
10. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, No 1. – P. 422–427.
11. Бартепьев Г. М., Френкель С. Я. Физика полимеров. – Ленинград: Химия, 1990. – 332 с.

12. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 320 с.
13. Корнши-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – Москва: Мир, 1979. – 280 с.
14. Биологически активные перевязочные средства в комплексном лечении гнойно-некротических ран / Под ред. В. Д. Федорова, И. М. Чижана. – Москва: МЗ РФ, 2000. – 36 с.

Физико-химический институт
им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

Поступило в редакцию 16.03.2009

I. I. Romanovskaya

The potential wound coating with trypsin immobilized in modified poly-N-vinylpyrrolidone

Basing on poly-N-vinylpyrrolidone modified by polysilicic acid sol, the wound water-insoluble hydrogel coating with immobilized trypsin, with high yield of activity (75.6%), stable at the storage and γ -sterilization, and with prolonged action is developed. The widening of catalytic activity in the acidic region of pH and the determination of kinetic parameters of the immobilized enzyme provides a possibility of the dose optimization and preparation activity, respectively.