

На правах рукописи

УДК 677.021.125:577.151.042



РГБ ОД

ЛАРИОНОВА АННА СЕРГЕЕВНА 6 ФЕВ 2000

**РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПЛЁНОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ
ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ**

Специальность 05.17.15 -
технология химических волокон и плёнок

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2000г.

Работа выполнена в Московской Государственной текстильной академии им. А.Н.Косыгина

Научный руководитель:
доктор химических наук
профессор

Гальбрайт Л.С.

Официальный оппонент:
доктор химических наук
профессор

Штильман М.И.

кандидат технических наук

Бибер Б.Л.

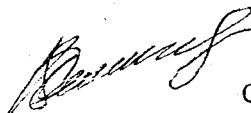
Ведущая организация: ГП Всероссийский научно-исследовательский институт полимерных волокон

Защита состоится « 2 » марта 2000 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета К 053.25.05 в Московской Государственной текстильной академии им. А.Н.Косыгина по адресу: 117918, г.Москва, Малая Калужская ул., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке академии.

Автореферат разослан « 26 » января 2000 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета:
доктор технических наук
профессор



Сафонов В.В.

Актуальность темы диссертации

Одним из современных типов перевязочных материалов являются полимерные пленочные покрытия на рану, структура и свойства которых должны обеспечивать выполнение ряда требований: защитное действие от микроорганизмов, воздухопроницаемость, атравматичность и др. Повышение эффективности лечебного действия таких материалов может быть обеспечено введением в их состав различных типов биологически активных соединений.

В случае использования пленочных покрытий при лечении глубоких гнойных ран, ожогов в состав полимерной композиции должны быть введены протеазы, а полимерный материал должен обладать высокой сорбционной способностью. Имеющийся в настоящее время ассортимент материалов не позволяет в полной мере решать эти задачи. Поэтому задача разработки биологически активных многокомпонентных пленочных материалов, содержащих в качестве биологически активного компонента ферменты различного происхождения и обладающих, благодаря особенностям структуры, необходимым комплексом сорбционных и диффузионных характеристик, является весьма актуальной.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является разработка способов получения биологически активных мембран на основе хитозана и синтетических биodeградируемых полимеров с регулируемыми физико-химическими и фармакодинамическими свойствами.

В связи с поставленной целью в задачи работы входило:

- изучение влияния состава и условий приготовления на свойства ферментсодержащих формовочных композиций и сформованных из них пленок из хитозана (ХТЗ) и полилактидов;
- изучение влияния структуры пленок на кинетику выделения протеолитических ферментов-трипсина (ТР) и протеазы С (ПР) и их полиэлектролитных комплексов в модельные среды;
- изучение влияния диффузионных факторов на кинетику превращения специфических субстратов в присутствии пленок, содержащих иммобилизованные ферменты.

Методика исследований

При выполнении экспериментальной части работы были использованы химические методы анализа, потенциометрия, фотоколориметрия, электронная микроскопия, элементный анализ. Для количественной характеристики процессов диффузии проведен расчет коэффициентов диффузии с использованием вычислительной техники.

Научная новизна

Выявлены закономерности формирования и установлен состав нерастворимого в воде слоя, образующегося при поверхностном модифицировании додецилсульфатом натрия ферментсодержащей хитозановой пленки. Установлено, что скорость выделения фермента из

хитозановой пленки, модифицированной додецилсульфатом натрия, определяется кинетикой ее набухания в воде.

Показано, что образование полиэлектролитного комплекса между макромолекулами фермента и высокомолекулярными компонентами формовочных композиций является условием замедления скорости выделения белка, необходимым как при создании высоконабухающих, так и биodeградируемых полимерных пленок медицинского назначения.

На основании изучения кинетики потери массы белоксодержащих биodeградируемых пленок на основе полимеров и сополимеров лактонов показана возможность регулирования скорости деградации путем изменения состава пленкообразующих полимеров и структуры сформованных пленок.

Практическая значимость работы и проверка результатов

Разработан способ получения поверхностно модифицированных высоконабухающих ферментсодержащих хитозановых пленок, состав и структура которых обеспечивают пролонгированное выделение протеолитического фермента.

Определены составы ферментсодержащих формовочных композиций на основе сополимеров лактонов и условия формования и структура пленок из них, обеспечивающие возможность регулирования скорости биodeградации пленкообразующего полимера и диффузии иммобилизованных ферментов в модельных средах, что позволяет рассматривать разработанные материалы как перспективные для использования в качестве эффективных перевязочных средств.

Результаты диссертационной работы являются основой для дальнейшей целенаправленной разработки процессов получения новых типов пленок, содержащих ферменты других классов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (МГТА, 1998 г.), Международном симпозиуме «Лекарственные препараты на основе модифицированных полисахаридов» (Минск, 1998 г.), 3-ей Международной конференции «Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов» (Москва, 1998 г.), пятой конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Москва-Щелково, 1999 г.), 2-ой Международной научно-методической конференции «Наука-сервису» (Москва, 1999 г.).

Объем работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, двух глав, в которых приведены основные экспериментальные результаты и их обсуждение, методической части, выводов и списка литературы.

Введение содержит общую характеристику работы, обоснование актуальности решения поставленной в диссертации научной задачи,

принципов ее решения, характеристику основных научных и практических результатов.

В литературном обзоре диссертации рассмотрены методы получения полимерных материалов, содержащих иммобилизованные ферменты, их свойства, некоторые аспекты применения волокнистых и пленочных материалов в медицине, а также получение и некоторые свойства полиэлектролитных комплексов и материалов на их основе.

Изложению основных экспериментальных результатов и их обсуждению посвящена гл. 2, в которой рассмотрены реологические свойства ферментсодержащих растворов хитозана, данные, являющиеся основой разработки способа получения поверхностномодифицированных хитозановых пленок, кинетика выделения фермента из хитозановых пленок композиционной структуры, принципы получения, структура и некоторые фармакодинамические свойства ферментсодержащих полилактидных пленок.

В гл.3 приведены характеристики методов и методик, использованных при выполнении экспериментальной части работы.

Диссертация содержит также выводы и список литературы, насчитывающий 145 ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка высоконабухающих покрытий на рану, обладающих протеолитической активностью

Поскольку введение белка (фермента), содержащего ионогенные группы кислотного и основного характера, в формовочную композицию на основе хитозана может оказать влияние как на ее структуру, так и на структуру и свойства сформованных пленок, с целью характеристики протекающих в системе процессов были исследованы реологические свойства формовочных композиций различного состава и свойства полученных из них пленок.

Таблица 1

Реологические характеристики формовочных растворов на основе ХТЗ и ТР и свойства пленок, полученных на их основе

№ п.п	Конц-ия р-ра уксусной к-ты, %	Кол-во ТР в форм. р-ре, % от массы ХТЗ	η_0 , Па·с	E_a , кДж/моль	Время разрушения пленок в воде, мин.
1	2	0	2,1	18,4	10
2	2	3	1,4	18,5	1
3	1	0	2,7	20,4	26
4	1	3	1,9	19,8	17

Согласно полученным данным (табл. 1), введение ТР в формовочный раствор приводит к уменьшению его вязкости, что может быть связано с нарушением системы межмолекулярных взаимодействий. Макромолекулы белка, в отличие от макромолекул ХТЗ, имеют глобулярную форму, поэтому в ферментсодержащем формовочном растворе реализуется структура, характеризующаяся большими расстояниями между макромолекулами полисахарида и меньшим числом межмолекулярных контактов. Следствием этих структурных изменений является изменение свойств пленок, полученных из ТР-содержащих растворов ХТЗ, скорость растворения которых значительно превышает скорость растворения пленок, не содержащих ТР.

2. Разработка способа получения ферментсодержащего композиционного материала на основе хитозана

Уменьшение скорости растворения пленкообразующего полимера – ХТЗ согласно литературным данным может быть осуществлено в результате присоединения небольших количеств дифильных ПАВ, например, додецилсульфата натрия (ДС). Исследования проводились в области концентраций и соотношений компонентов, при которых система кинетически устойчива, увеличение содержания ДС свыше 2,5% сопровождается появлением оптической неоднородности в результате мицеллообразования или образования нерастворимых комплексов ДС-ХТЗ.

Введение в раствор ХТЗ ДС приводит к повышению вязкости эквиконцентрированного раствора, которая увеличивается при увеличении содержания ПАВ (табл.2). Увеличение вязкости и энергии активации вязкого течения связано с протеканием в системе реакции между протонированными аминогруппами ХТЗ и сульфатными группами ДС и реализацией гидрофобных взаимодействий между алкильными радикалами ДС. При этом на изменение интенсивности межмолекулярного взаимодействия в исследованных растворах более заметное влияние оказывает взаимодействие ДС с ХТЗ, чем с аминогруппами белка.

Введение ДС в состав пленки из ХТЗ, содержащей ТР, не привело к пролонгированию выделения фермента из полимерного материала из-за высокой скорости растворения самой пленки в водной среде. Следует, кроме того, подчеркнуть, что сильные ионные взаимодействия, изменяя конформацию макромолекулы белка, приводят к инактивации значительной части фермента в формовочной композиции.

Таблица 2

Реологические характеристики 2%-ных формовочных растворов ХТЗ в 2% уксусной кислоте, содержащих ДС, ТР и свойства пленок, полученных на их основе

Кол-во ТР в форм. р-ре, % от массы ХТЗ	Кол-во ДС в форм р-ре, % от массы ХТЗ	η_0 , Па*с	E_a , кДж/моль	Время разрушения пленок в воде, мин.	Кол-во белка, выделившегося из пленки в течение 30 мин, % от вклоч. в пленку	Активность ТР, выделившегося из пленки в течение 30 мин, % от вклоч. в пленку
0	0	2,1	18,4	10,0	-	-
0	0,4	2,8	21,1	30,0	-	-
0	0,7	4,0	25,5	40,0	-	-
0	2,5	6,31	28,0	60,0	-	-
3	0	1,4	18,5	1,0	100	98,5
3	0,4	1,6	19,0	1,0	100	29,2
3	0,7	2,8	21,1	0,5	-	-
3	2,5	4,7	22,3	0,4	100	19,5

С целью получения на основе ХТЗ высоконабухающих пленочных покрытий на рану с гидрофобной поверхностью и некролитическим действием был предложен метод модифицирования белоксодержащих хитозановых пленок ДС. Модифицирование поверхностного слоя пленки, полученной по сухому способу, проводили погружением пленки в водные растворы ДС различной концентрации в течение 15-90 минут с последующей сушкой при комнатной температуре.

Для выбора условий обработки пленок раствором ДС было изучено влияние концентрации раствора ПАВ и времени обработки на максимальную степень набухания в воде пленок, полученных из растворов ХТЗ, содержащих ТР и не содержащих фермента.

Согласно полученным данным, концентрация ДС не оказывает определяющего влияния на степень набухания пленки, в то время как увеличение времени обработки раствором ПАВ приводит к снижению максимальной степени набухания, по-видимому, вследствие взаимодействия ХТЗ с ДС не только в поверхностных, но и во внутренних слоях пленки. Наблюдаемая зависимость в наибольшей мере проявляется в отсутствие фермента в составе полимерного материала.

При исследовании морфологии ХТЗ пленок разной толщины было показано, что набухшая модифицированная пленка представляет собой неоднородный материал, состоящий из нерастворимого слоя (мембраны) толщиной около 10 мкм и раствора ХТЗ, концентрация которого изменяется в зависимости от степени набухания пленки. Толщина поверхностной мембраны в выбранных условиях модифицирования (0,7 %-ный раствор ДС,

30 мин.) пленки практически не зависит ни от толщины пленки, ни от наличия в ее составе фермента. Установленное по данным элементного анализа в поверхностном слое значительное содержание серы при одновременном снижении содержания азота может свидетельствовать о том, что эта мембрана представляет собой комплекс ХТЗ-ДС.

Введение небольшого количества (от общей массы пленки) фермента не должно было бы сказаться на аналитически определяемых характеристиках элементного состава. Однако поверхностный слой трипсинсодержащей пленки характеризуется пониженным содержанием серы и повышенным азота. Это позволяет сделать вывод о наличии в поверхностном слое пленки, содержащей трипсин, заметного количества фермента. Этот вывод подтверждается способностью поверхностной мембраны к гидролизу специфического субстрата ТР-этилового эфира N-бензоил-L-аргинина. На основании полученных результатов сформулированы предположения о механизме поверхностного модифицирования хитозановой пленки ПАВ, в соответствии с которыми на начальной стадии процесса происходит адсорбция молекул ДС на поверхности пленки. В результате образования ионных связей при взаимодействии ионизованных сульфатных групп ДС с аминогруппами хитозана резко уменьшается количество гидрофильных групп. Вследствие этого поверхностный слой пленки превращается в нерастворимую в воде мембрану, в то время как не участвующий в реакции ХТЗ во внутренних областях сохраняет растворимость в воде. В ферментсодержащей пленке аминогруппы белка, расположенного на ее поверхности, также принимают участие в образовании ионных связей с ДС, что приводит к возникновению более рыхлой структуры по сравнению со структурой поверхностного слоя хитозановой пленки, полученной в аналогичных условиях.

3. Изучение взаимосвязи набухания в воде ферментсодержащего композиционного материала на основе хитозана и кинетики выделения белка

Для определения степени набухания пленок в воде их выдерживали при 20 °С с периодическим взвешиванием до достижения набухшей пленкой постоянной массы. В ряде опытов набухание изучали обычным методом, измеряя геометрические размеры образца пленочного материала (площадь, толщина). Как следует из полученных экспериментальных данных, графическая зависимость кинетики набухания $H = f(\tau)$ имеет вид кривой с насыщением, характерный для ограниченного набухания полимера, что свидетельствует о принципиальном отличии процесса набухания модифицированной пленки от поведения ХТЗ, который в форме уксуснокислой соли набухает в воде неограниченно.

Изучение кинетики набухания полученных пленок показало, что наибольшее значение H_{max} наблюдается у пленок с большей поверхностью контакта с адсорбатом. Толщина пленки влияет как на значение H_{max} , так и на время, за которое достигается максимальное набухание. Для пленок большой

толщины (150 мкм) увеличение давления набухания приводит к разрыву пленки раньше, чем достигается соответствующее значение H_{\max} .

Значительное набухание пленок оказывает влияние на кинетику диффузии трипсина из пленки во внешнюю среду. Изучаемая ферментсодержащая поверхностномодифицированная пленка, погруженная в воду, является диффузионной системой, в которой массоперенос осуществляется через полупроницаемую мембрану модифицированного ХТЗ. В процессе набухания пленки ее объем меняется более, чем на порядок, соответственно меняется концентрация трипсина внутри пленки. Кроме того, в процессе набухания поверхностная мембрана испытывает деформации, приводящие к уменьшению ее толщины и изменению пористости, в результате чего может увеличиваться эффективный коэффициент диффузии.

Многокомпонентность изучаемой системы, изменение ее структуры и диффузионной проницаемости в процессе набухания делает достаточно сложной задачу количественного описания протекающих в системе процессов. С учетом этих обстоятельств в работе дано феноменологическое описание как процесса набухания ХТЗ пленки, поверхность которой модифицирована ДС, так и процессов выделения из нее иммобилизованного в ее структуре трипсина.

Согласно полученным данным (рис.1), образование поверхностного неонрастворимого слоя приводит к существенному замедлению диффузии фермента из пленки, завершающейся в течение длительного времени (суток и более).

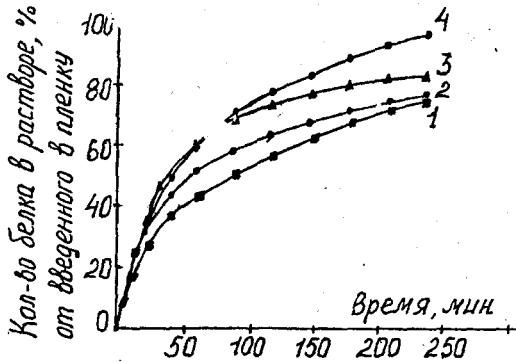


Рис.1. Кинетика выделения белка из хитозановых пленок, товершнономодифицированных ДС. Толщина пленки, мкм: 1-50, 2,3,4- 100.

Столь существенное замедление процесса диффузии белка через тонкую (~ 10 мкм) полимерную мембрану позволило предположить, что молекула фермента внутри набухшей пленки находится в виде полиэлектrolитного комплекса, размеры которого превышают размеры молекулы белка. Подтверждением предположения об образовании полиэлектrolитного комплекса ТР с ХТЗ являются данные гель-

хроматографии на биогеле Р-60, согласно которым при элюировании раствора смеси трипсина и ХТЗ белок на выходе из колонки определяется достоверно позже, чем при элюировании раствора фермента. Кинетические кривые, описывающие процесс массопереноса, могут быть разделены на 2 участка, различия в рассчитанных эффективных коэффициентах диффузии для которых

($D_1=2 \cdot 10^{-7}$ см²*мин⁻¹ и $D_2=10^{-8}$ см²*мин⁻¹ соответственно), подтверждают предположение о существенном изменении структуры поверхностного слоя в процессе набухания пленки.

Анализ активности трипсина, выделившегося из пленки в модельную среду, показал, что фермент сохраняет 70% первоначальной активности. Из этого следует, что поверхностная модификация пленки ДС, а также образование комплекса трипсина и ХТЗ не приводит к инаktivации фермента.

4. Иммуобилизация протеолитических ферментов в структуре пленок из полилактоидов

Способность полилактоидов растворяться в метилхлориде является предпосылкой для получения волокон и пленок с некротической активностью путем формирования из эмульсий, содержащих в качестве дисперсной фазы водные растворы протеолитических ферментов. В диссертации рассмотрены возможности метода включения ферментов в структуру полимерных материалов путем формирования из эмульсий при получении из синтетических биodeградируемых полимеров материалов медицинского назначения. Для получения пленок, содержащих иммобилизованные ферменты, были использованы полилактоид и сополимеры лактида с гликолидом или этиленоксалатом.

В качестве протеолитических ферментов использованы как кристаллический препарат трипсина, так и комплекс протеаз, обладающий дополнительно коллагенолитической активностью - протеазу С (ИР). Белкодержащие композиции получали путем диспергирования водного раствора фермента в растворах полилактоидов. Концентрация формовочных растворов пленкообразующих полимеров была либо одинаковой, либо обеспечивающей их одинаковую вязкость. Следует отметить, что при приготовлении формовочных дисперсий на основе 12%-ного раствора полилактоида в метилхлориде из-за высокой вязкости дисперсионной среды удается ввести только 1 мл раствора белка на 1 г триацетата целлюлозы. Дальнейшее увеличение доли дисперсной фазы

приводит к реверсии фаз эмульсии. Пленки формовали при температуре 20° С путем испарения растворителя или осаждением различными осадителями. Толщина полученных пленок варьировалась от 20 до 70 мкм, масса 1 см² пленки от 0,9 до 3,5 мг. Ферментативную активность нативных иммобилизованных трипсина и протеазы определяли по скорости гидролиза метилового эфира N-бензоил-L-аргинина.

Сравнительный анализ активности пленок, полученных из формовочных композиций на основе эквипонцентрированных растворов (табл.3), показывает, что относительная активность ПР, включенной в структуру пленок из полилактидов при одинаковом содержании ее в материале выше, чем активность ПР, иммобилизованной в триацетатной пленке. При этом протеолитическая активность пленок на основе сополимеров лактида снижается при увеличении концентрации пленкообразующего полимера в формовочной дисперсии.

Таблица 3

Влияние химического строения и состава пленкообразующего полимера на активность ПР, включенной в структуру пленок

№ п.п	Пленкообразующий полимер	Содержание лактида в сополимере, %	Конц. пленкообразующего полимера в, %	Количество раствора ПР, мл/ г полимера	Активность иммобилизованной ПР,	
					Е/г пленки	% от введенной в пленку
1	ТАЦ		7	2	11,5	16
2	Полилактид	100	7	2	14,2	20
3	Полилактид	100	2	1	4,3	14
4	СЛЭ	85	7	2	15,1	19
5	СЛГ	83	10	2	14,2	6
6	СЛГ	83	12	2	9,9	20
7	СЛГ	68	12	2	13,5	16
8	СЛГ	68	14	2	11,4	21
9	СЛЭ	72	14	2	10,1	14

Заметное влияние на протеолитическую активность фермента оказывают как химическое строение, так и – в случае сополимеров – их композиционный состав. Уменьшение содержания лактидных звеньев в сополимере приводит к увеличению относительной активности ПР. Наибольшую активность имеют пленки, полученные на основе 7%-ного раствора в метилхлориде сополимера лактида с этиленоксалатом, содержащие 85% лактида.

Для того, чтобы определить степень влияния диффузионных факторов на скорость ферментативного процесса при иммобилизации протеазы в структуре пленок из полилактида и сополимеров на основе лактида, нами была изучена зависимость относительной активности фермента от параметров, определяющих как скорость диффузии субстрата внутрь пленки (концентрация пленкообразующего полимера) и размеры диффузионного пространства (толщина пленки), так и скорость ферментативной реакции

внутри волокна (количество введенного в пленку фермента, степень очистки ферментного препарата).

Было показано, что изменение параметров, определяющих соотношение скоростей диффузии субстрата внутрь полимерного материала и ферментативной гидролиза субстрата, предсказуемо влияет на относительную активность протеолитического фермента, включенного в структуру пленок из полилактида и сополимеров на основе лактида. Этот факт свидетельствует о том, что диффузионные факторы играют существенную роль в кинетике ферментативного гидролиза под действием иммобилизованных в полилактидах протеаз, что особенно заметно для пленок большой толщины, полученных на основе растворов полилактоидов в метиленхлориде высокой концентрации, содержащих высокоактивный белок. Установлены различия в кинетике выделения фермента из полилактидных пленок, полученных из растворов разной концентрации, в частности, в пленках, полученных из формовочной композиции на основе 9%-ного раствора полилактида в метиленхлориде, после контакта с физиологическим раствором сохраняется до 20 % первоначальной активности. При формировании пленки из низкоконцентрированных композиций и при уменьшении толщины сформованной пленки активность пленок за время эксперимента уменьшается в значительно большей степени.

5. Разработка методов регулирования скорости выделения ферментов из полилактидных пленок

Выявленная для пленок на основе полилактоидов значительная скорость десорбции фермента не обеспечивает длительного некротического воздействия при использовании этих пленок для лечения ран. С целью устранения этого недостатка была изучена возможность изменения кинетики выделения белка из биodeградируемых пленок за счет изменения их структуры и композиционного состава.

Для изучения влияния условий формирования пленок из полилактида, содержащих иммобилизованный трипсин, была использована формовочная композиция на основе 7 %-ного раствора полилактида в метиленхлориде, в котором диспергирован водный раствор трипсина с концентрацией 12,5 мг/мл (2 мл на 1 г полимера). Процесс формирования осуществляли по сухому способу и мокрым способом формированием в осадители с разной осаждающей способностью. В качестве осадителей применяли изопропиловый спирт и гексан.

Как показывает анализ полученных кинетических данных (рис.2) выделение белка из пленки, полученной сухим методом формирования прекращается уже в первые 30 минут.

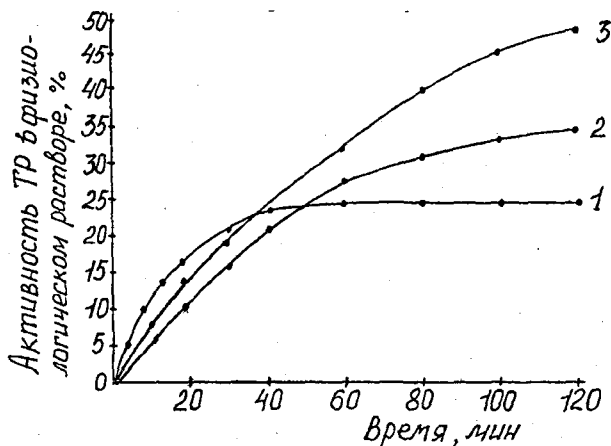


Рис. 2. Кинетика выделения ТР в физ. раствор из полилактидных пленок, сформованных по сухому (1) и по мокрому (2,3) способу осаждением в гексан (2) и изопропанол (3)

Структура пленок, полученных формованием в изопропанол из 12 % - ного раствора полилактида в метиленхлориде и эмульсий водного раствора ТР в 12% - и 7%- ных растворах полилактида в метиленхлориде, была изучена методом электронной сканирующей микроскопии. Было показано, что пленки обладают высокопористой структурой с макропорами размером 5-10 мкм, образованными дисперсной фазой. Размер этих пор изменяется при изменении вязкости дисперсионной среды, объемной доли дисперсной фазы и скорости перемешивания. В результате фазового разделения образуются поры меньшего диаметра (0,1 мкм), в основном, выполняющие роль транспортных каналов в процессе выделения макромолекул белка.

В 0,2 М фосфатном буфере $pH = 7,0$ при $37 \pm 1^{\circ} C$ была изучена кинетика потери массы пленок из полилактида, а также сополимеров лактида с этиленоксалатом различного состава, полученных по сухому способу, в условиях, моделирующих условия рассасывания перевязочного пленочного материала. Согласно полученным данным, за счет изменения состава сополимера можно существенно изменять скорость разрушения пленки: одинаковый уровень потери массы может быть достигнут за несколько недель и даже месяцев. Было также показано, что на скорость деградации пленок из полилактида оказывает влияние характер пористой структуры пленки, изменяющейся при варьировании способа получения полимерного материала.

Для изменения транспортных характеристик диффундирующего вещества (фермента) в работе предложен метод модифицирования, основанный на образовании в водной фазе эмульсии полиэлектролитного комплекса белок- полисахарид. С этой целью в водный раствор фермента вводили водорастворимые полисахариды, содержащие ионогенные группы

кислотного или основного характера: карбоксиметилцеллюлозу или хитозан. Однако использование формовочных композиций, содержащих в качестве дисперсной фазы растворы белка и полисахарида, привело лишь к незначительному снижению количества десорбированного белка (ТР). Для дальнейшего снижения скорости десорбционного процесса в формовочную эмульсию были введены растворы альгината натрия и глюконата кальция. Образование в результате коалесценции капель этих растворов геля альгината кальция привело к уменьшению скорости десорбции фермента и количества белка, десорбирующегося из пленок, сформованных из таких композиций. За счет этого эффект пролонгирования действия фермента в материале достигает суток.

Для регулирования скорости выделения трипсина из полилактидных пленок был использован также метод, использованный для модифицирования ферментсодержащих хитозановых пленок, взаимодействие ХТЗ с ДС. При добавлении раствора ДС в формовочную эмульсию на основе полилактида, содержащую раствор ХТЗ и трипсина заданной степени дисперсности, на поверхности частиц дисперсной фазы происходит образование комплекса ХТЗ-ПАВ. В этом случае диффузии макромолекул белка по транспортным каналам пленки должны предшествовать диффузия через тонкую межфазную пленку ПАВ-полиэлектrolитного комплекса. Эта стадия является, очевидно, лимитирующей, что приводит к замедлению выделения белка из композиционной полилактидной пленки при увеличении соотношения ДС:ХТЗ. Следует отметить, что скорость десорбции белка из этих пленок и физиологический раствор мало отличается в течение всего исследованного периода (24 часа). Этот факт, а также биосовместимость и ранозаживляющие свойства ХТЗ позволяют рекомендовать этот метод для получения биodeградируемых пленок с пролонгированным некролитическим действием. Введение в состав ферментсодержащих биodeградируемых пленок из полилактида хитозана увеличивает гидрофильность материала и приводит к значительному увеличению максимальной степени набухания в воде.

Таким образом, в настоящей работе на примере создания высоконабухающих композиционных пленочных материалов и биodeградируемых пленок с комплексным биологическим действием был экспериментально обоснован принцип многокомпонентности при создании изделий медицинского назначения.

ВЫВОДЫ

1. Изучены пути регулирования физико-химических и фармакодинамических свойств полимерных пленок для медицинских целей на основе хитозана и биodeградируемых синтетических полимеров.
2. Исследованы реологические свойства формовочных композиций различного состава на основе уксуснокислых растворов хитозана. Показано, что введение в формовочный раствор фермента, а также взаимодействие

хитозана с додецилсульфатом натрия приводит к изменениям вязкости, обусловленным изменением интенсивности и характера межмолекулярных взаимодействий в системе.

Путем поверхностного модифицирования ферментсодержащих хитозановых пленок додецилсульфатом натрия получены высоконабухающие мембраны композиционной структуры, характеризующиеся наличием водорастворимого внутреннего и нерастворимого в воде поверхностного слоев.

Изучена кинетика выделения фермента из поверхностномодифицированных хитозановых пленок в процессе их набухания в воде и рассчитаны значения коэффициентов диффузии на начальном и заключительном участках кинетической кривой. Показано, что белок находится во внутреннем слое пленки в виде полиэлектролитного комплекса с хитозаном, что, наряду с диффузионным сопротивлением поверхностной мембраны, обеспечивает пролонгирование выделения фермента.

Установлена возможность получения биodeградируемых полилактидных пленок из ферментсодержащих формовочных дисперсий и регулирования скорости десорбции из них ферментов за счет изменения строения пленкообразующего полимера, состава и структуры формовочной композиции и условий формования.

Показано, что в процессе приготовления формовочной дисперсии и формования полилактидных пленок не происходит существенной инактивации фермента, а низкие значения активности фермента, определяемые по скорости гидролиза специфического субстрата, обусловлены влиянием внутридиффузионных затруднений.

На основании кинетики деградации полилактидных пленок в опытах *in vitro* показана возможность изменения скорости этого процесса при изменении структуры полимерного материала.

Основные материалы диссертации изложены в следующих публикациях:

Ларионова А.С., Гальбрайт Л. С. Разработка композиций для создания полимерных систем с регулируемым выходом лекарственного вещества // Сборник научных трудов аспирантов. -М.:МГТА, 1998.-№ 2. —С. 75-79.

Кильдеева Н.Р., Гальбрайт Л.С., Ларионова А.С. Современные тенденции создания биологически активных материалов для хирургии // Тезисы докладов научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов.-М.:МГТА, 1998.-С.45.

Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Ларионова А.С., Гальбрайт Л.С. Перспективы использования хитозана для создания терапевтических систем // Тезисы докл. Международного симпозиума «Лекарственные препараты на основе модифицированных полисахаридов».-Минск, 1998.-С. 14-15.

4. Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Ларионова А.С., Гальбрайт Ж. Биологически активные сорбирующие пленки на основе хитозана // Тезисы докл. 3-тней Международной конференции «Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов полимерных имплантатов». -М., 1998.-С.130-131.
5. Ларионова А.С., Журавлева Е.М., Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Гальбрайт Ж.С., Мороз Н.А., Ларионова Н.И. Ферментсодержащие высоконабухающие хитозановые пленки // Тезисы докл. Пятой конференции « Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана». -Москва-Щелково 1999.-С.273-275.
6. Ларионова А.С., Кильдеева Н.Р., Овчинникова Т.Н., Гальбрайт Ж.С., Шалашева В.В., Вершинина Л.И. Разработка ферментсодержащих биodeградируемых пленок для лечения ран // Тезисы докл. 2 Международной научно-методической конференции « Наука-сервису». -1999.-С.70.
7. Dimitrov D.V., Kildeyeva N.R., Larionova A.S., Vikhoreva G.A., Galbraikh J. Surface-modified chitosan films for local enzyme delivery // Proceed . 26 Int Symp. On Controlled Release of Bioaktive Materials.- Boston, USA, 1999. 451-452.

ЛР N 020753 от 23.04.98

Подписано в печать 11.01.2000
Сдано в производство 11.01.2000
Формат бумаги 60x84/16 Бумага множ.
Усл. печ. л. 1,0 Уч.-изд. л. 0,75
Заказ 5 Тираж 80

Электронный набор, МГТУ, 117918, Москва, Малая Калужская, 1