

УДК 544.23.02/03

ПОЛУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОРИСТЫХ ПЛЕНОК ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ

© 2006 г. Н. Р. Кильдеева*, Г. А. Вихорева*, Л. С. Гальбрайх*, А. В. Миронов*,
Г. А. Бонарцева**, П. А. Перминов*, А. Н. Ромашова*

*Московский государственный текстильный университет им. А.Н.Косыгина, г. Москва, 119071;

**Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, 119071; e-mail: bonar@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 23.01.2006 г.

Изучен процесс получения полимерных пленок из формовочных композиций на основе смешанных растворов поли-3-гидроксибутират и поли-ε-капролактона в хлороформе и метиленхлориде. Исследование морфологии сколов пленок методом электронной микроскопии показало, что в процессе испарения растворителя формируется гетерогенная структура с системой взаимопроникающих пор (1–20 мкм). Предложен метод включения в состав полиефириных пленок протеолитического фермента совместно с аминополисахаридом хитозаном. Полученные композиционные пленки, кроме некролитической активности, обладают повышенной гидрофильностью. Свойства полученных ферментсодержащих пленок из смеси полимеров (протеолитическая активность, характер пористой структуры, повышенная гидрофильность) являются предпосылкой для создания на их основе биодеградируемых раневых покрытий.

Наиболее перспективными направлениями применения биодеградируемых полимеров является их использование в медицинской практике в качестве полимерной матрицы для создания пролонгированных лекарственных форм, рассасывающихся шовных нитей и раневых покрытий, в генной и клеточной инженерии для разработки биоискусственных органов и тканей. Появление новых материалов на основе различных классов биодеградируемых полимеров позволяет решать все более сложные задачи в этих областях.

В последнее время возрос интерес к биосовместимым полиефирам, в особенности полимеру природного происхождения поли-3-гидроксибутирату, способному к деструкции *in vivo* [1–3]. В зависимости от назначения биодеградируемого материала изменяются требования к комплексу его эксплуатационных свойств. В этой связи в качестве важнейшей выступает задача направленного регулирования состава и структуры полимерного изделия. Эффективным методом регулирования надмолекулярной и пористой структуры волокон и пленок является формование из смешанных растворов полимеров в общем растворителе. Композиционные материалы, полученные на их основе, могут формировать различные типы структур, определяющих сроки биодеградации, адсорбционную способность, кинетику выделения лекарственных соединений из полимерных матриц.

Ранее нами было показано [4], что одним из наиболее перспективных биодеградируемых материалов может явиться полимерная композиция на основе полигидроксибутират (ПГБ) и синтетич-

ского полиефира поли-ε-капролактона (ПКЛ), способного к гидролитической деструкции в условиях организма. Пленки, полученные из раствора этих близких по химическому строению, но отличающихся по характеру надмолекулярной структуры кристаллизующихся полимеров, в широком диапазоне составов ПГБ–ПКЛ имели гетерогенную, а некоторые из них – пористую структуру, что является ключевым моментом при разработке изделий для заместительной хирургии. Такая структура формируется самопроизвольно в результате фазового разделения в процессе испарения растворителя без экстракции одного из полимеров и является предпосылкой для использования таких пленок в процессе лечения поражений различных тканей, способствуя их восстановлению.

Для получения раневого покрытия, предназначенного для использования на первой стадии раневого процесса, в его состав целесообразно вводить протеолитические ферменты, которые при местном применении расщепляют девитализированные ткани, снижают вязкость раневого экссудата и облегчают его элиминацию. На второй стадии – стадии заживления ран необходимо обеспечить условия для прорастания новой ткани: фибробластов и эпителия.

Цель работы – создание эффективного биодеградируемого пористого раневого покрытия, изучение процесса получения и свойств полиефириных пленок, сформованных из растворов в органических растворителях, содержащих протеолитический фермент трипсин.

Таблица 1. Характеристика и свойства биодеградируемых полиэфиров

Полимер	Повторяющееся звено	Степень полимеризации	Мол. масса полимера, кДа	Плотность, г/см ³	T _{пл} , °C	Степень кристалличности, %
ПГБ	*[O-CH(CH ₃)-CH ₂ -C(=O)]*	3500	300	1.2	175	71
ПКЛ	*[O-(CH ₂) ₅ C(=O)]*	500	42	1.1	60	68

МЕТОДИКА

В качестве пленкообразующих полимеров в работе использовали полиэфиры: поли-3-гидроксибутират, полученный в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН и поли-ε-капролактон ("Sigma-Aldrich", США). Характеристика полимеров приведена в табл. 1. Кроме того, были использованы хитозан с молекулярной массой 180 кДа и степенью дезацетилирования 0.87 (ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии, Россия), трипсин (КФ 3.4.21.4, "Merck", Германия) с содержанием активных центров 68%, N-бензоил-L-аргинина метиловый эфир (БАМЭ, "Sigma-Aldrich", США) и глутаровый альдегид в виде 25%-ного водного раствора ("Merck", Германия).

Пленки для электронной микроскопии и термомеханических исследований формовали из 5%-ных растворов ПГБ и ПКЛ или их смеси в хлороформе методом полива на чашках Петри с испарением растворителя в течение 12 ч. Включение трипсина в структуру пленок осуществляли путем эмульгирования его раствора в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.8) в растворе пленкообразующих полимеров в несмешивающемся с водой органическом растворителе (хлороформ или метиленхлорид). Полученные эмульсии выдерживали в течение 30 мин для удаления пузырьков воздуха.

Формование пленок для исследования биокатализической активности проводили методом испарения растворителя из тонкого слоя формовочной композиции, полученного с использованием щелевых фильтров из тефлона с различными размерами щели. Из пленок вырезали участки одинаковой толщины (измерение проводили микрометром с точностью ± 5 мкм) и анализировали изменение ферментативной активности в результате иммобилизации и кинетику выделения трипсина.

Активность трипсина определяли спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза БАМЭ. За единицу активности принимали количество микромолей субстрата, прогидролизованного за 1 мин при рН 7.8 и 25°C. Активность иммобилизованного фермента выражали в единицах на 1 г пленки (ед./г) и в процентах от активности на-

тивного фермента. Кинетику выделения трипсина в 0.95 %-ный раствор NaCl изучали в статических условиях при соотношении полимерный материал-изотонический раствор 1 : 40 по изменению активности трипсина в растворе.

Термомеханические исследования проводились на термоанализаторе DMA/SDTA 861 фирмы "Mettler" (Швейцария) при скорости нагрева 5 К/мин, максимальной нагрузке 5Н, частоте нагружения 1 Гц.

Морфологию сколов пленок изучали методом электронной микроскопии на растровом микроскопе JSM-35 ("JEOL", Япония). Сколы готовили в жидком азоте. Поверхность образцов напыляли золотом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных табл. 1, ПГБ и ПКЛ имеют близкое химическое строение и, как было показано выше [4], близкие значения параметра растворимости, однако два кристаллизующихся полимера редко могут быть совместимыми и их взаимная растворимость может реализоваться только на уровне аморфных областей. Несмотря на то, что смешанные растворы ПГБ и ПКЛ прозрачны и однофазны, в процессе испарения растворителя происходит разделение раствора на фазы и формирование гетерогенных структур.

Морфология сколов пленок, полученных из растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе, а также из их эквивалентных смешанных растворов, была изучена методом электронной сканирующей микроскопии. Следует отметить, что оба полиэфира, ПКЛ и ПГБ, имеют степень кристалличности около 70%, и пленки, полученные из растворов индивидуальных полимеров, непрозрачны, поэтому мутность пленок из смешанных растворов ПГБ и ПКЛ не может являться свидетельством несовместимости этой полимерной пары. Морфология поверхности и скола пленок из ПГБ отличается от морфологии пленок из ПКЛ (рис. 1а, 1б) меньшим размером структурных элементов и отсутствием их ориентации вдоль поверхности пленки. Неровность скола и неодно-

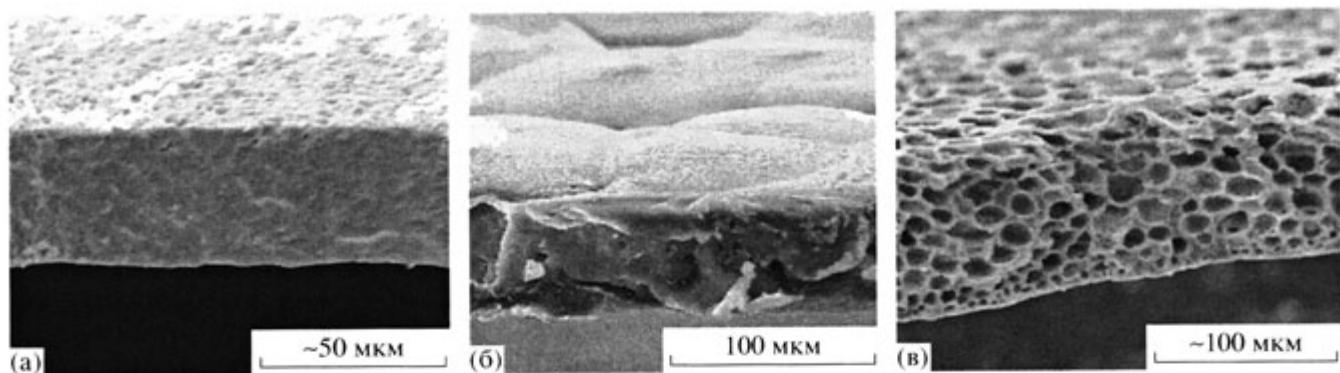


Рис. 1. Микрофотографии скола пленок из ПГБ (а), ПКЛ (б), и смеси ПГБ–ПКЛ (50 : 50) (в).

родность поверхности пленок связаны с наличием кристаллических образований.

Для смесей ПГБ–ПКЛ характерна гетерогенная структура. Пленки состава ПГБ–ПКЛ (50 : 50) имеют систему взаимопроникающих пор размечом от 1 до 20 мкм (рис. 1в), пронизывающих всю структуру материала и выходящих на поверхность. Непрерывность и взаимное проникновение фаз являются одним из признаков спинодального механизма фазового разделения [5]. По-видимому, в этом случае в процессе разделения фаз матрицу формирует более концентрированный раствор полимеров, а фазу – очень разбавленный раствор. В результате испарения растворителя такая система образует структуру, которая может обеспечивать возможность регенерации поврежденных тканей и их временного замещения в течение периода биодеградации пористого покрытия.

Пленка из смеси полимеров обнаруживает только одну температуру стеклования (табл. 2), что свидетельствует о частичной совместимости аморфных областей ПКЛ и ПГБ, однако механические свойства такой пленки не определяются правилом аддитивности: значения модуля Юнга (E) пленок из смеси ПГБ и ПКЛ (50 : 50) и чистого ПКЛ составляют 220 и 200 МПа соответственно (для пленок из ПГБ $E = 1200$ МПа). Этот факт объясняется снижением эффективной площади нормального сечения пленки из смеси полимеров за счет формирования высокопористой структуры.

Таблица 2. Термомеханические свойства пленок из ПГБ, ПКЛ и их смеси

Состав пленки, %		Температура стеклования T_c , °C	Модуль Юнга E (при 25°C), МПа
ПГБ	ПКЛ		
100	0	20	1200
0	100	-35	220
50	50	-30	200

Для получения раневого покрытия, предназначенного для использования на первой стадии раневого процесса, в его состав целесообразно вводить протеолитические ферменты, разрешенные для местного применения. Поэтому в настоящей работе в качестве формовочных композиций для получения пленок применяли эмульсии на основе растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе или метиленхлориде, а в качестве водной фазы эмульсии использовали раствор трипсина. С целью изучения возможности регулирования кинетики выделения из биосовместимых пленочных покрытий протеолитического фермента и увеличения влагопоглощения материала в состав водной фазы совместно с трипсином вводили гидрофильный аминополисахарид хитозан. Выбор хитозана для модификации трипсина обусловлен наличием в макромолекуле полисахарида первичных аминогрупп, которые, с одной стороны, придают ему рН-зависимую растворимость в воде, а с другой – обеспечивают реакционную способность в реакции с глутаровым альдегидом – бифункциональным сшивющим реагентом, широко используемым для иммобилизации белков. Хитозан и трипсин в формовочной композиции подшивали глутаровым альдегидом, который добавляли в эмульсию в виде 10%-ного водного раствора. Соотношение глутаровый альдегид/ NH_2 -группы выбирали на основании опытов по изучению скорости гелеобразования в растворах хитозана, содержащих трипсин [6].

Способность обратных эмульсий к сохранению агрегативной устойчивости определяется величиной межфазного поверхностного натяжения и соотношением вязкости дисперсной фазы и дисперсионной среды. При одинаковой концентрации белка, макромолекулы которого, как известно, обладают поверхностной активностью, и использовании одного и того же растворителя дисперсность и стабильность эмульсии определяется вязкостью дисперсионной среды. На основании изучения стабильности трипсинсодержащих эмульсий был определен нижний предел вязкости дисперсионной среды (раствора полиэфира в органическом

Таблица 3. Характеристика пленок* на основе ПКЛ, содержащих иммобилизованный трипсин

№ образца	Растворитель	Концентрация раствора, %	Модификация трипсина в эмульсии	Активность трипсина, введенная в пленку, ед./г	Активность иммобилизованного трипсина	
					ед./г	% от исходной
1	Метиленхлорид	5	—	20.0	4.4	22.1
2	»	5	+	20.0	4.0	20.0
3	»	7	+	20.0	2.9	14.4
4	Хлороформ	5	+	20.0	7.3	36.5
5	»	5	—	20.0	7.0	35.1

* Толщина пленок 50 ± 5 мкм.

Таблица 4. Характеристика содержащих трипсин пленок, полученных из эмульсий на основе растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе

№ образца	Соотношение полимеров в растворе, %		Количество трипсина, введенного в пленку,		Модификация трипсина в эмульсии	Активность иммобилизованного трипсина,	
	ПГБ	ПКЛ	мг/г	ед./г		ед./г	% от исходной
1	100	0	2	20	—	8.5	42.5
2	100	0	2	20	+	6.2	31.0
3	50	50	2	20	—	10.5	52.5

растворителе), обеспечивающий устойчивость эмульсии во времени. Он составил 50 МПа с, что соответствует концентрации в хлороформе и метиленхлориде ПГБ 4–6%, а ПКЛ 5–7%. В табл. 3 на примере ПКЛ приведены результаты изучения влияния концентрации полимерного раствора и природы растворителя на сохранение ферментативной активности иммобилизованного трипсина. Как видно из полученных данных, активность иммобилизованного в пленках трипсина падает с увеличением концентрации раствора (табл. 3, № 2, 3). Уменьшение выявляемой активности может быть связано с усилением влияния на кинетику гидролиза субстрата внутридиффузационных затруднений в результате формирования более плотной структуры пленки, полученной из 7%-ного раствора ПКЛ.

Несмотря на то, что температура кипения хлороформа (61°C) выше, чем метиленхлорида (42°C) и, соответственно, время испарения хлороформа при формировании пленок на 2 ч больше, активность трипсина в пленках, полученных из растворов в хлороформе заметно выше. Титрование активных центров трипсина в исследуемых образцах показало, что хлороформ оказывает меньшее влияние на конформацию белка, чем метиленхлорид. Для получения ферментсодержащих пленок на основе смеси ПГБ и ПКЛ был использован хлороформ.

Модифицирование трипсина в водной фазе эмульсии с использованием хитозана не привело к инактивации фермента (табл. 3, 4). Однако зна-

чительно снизилась скорость десорбции белка из пленок в физиологический раствор, что свидетельствовало о достигнутом эффекте пролонгирования действия трипсина (рис. 2, кривые 1, 2).

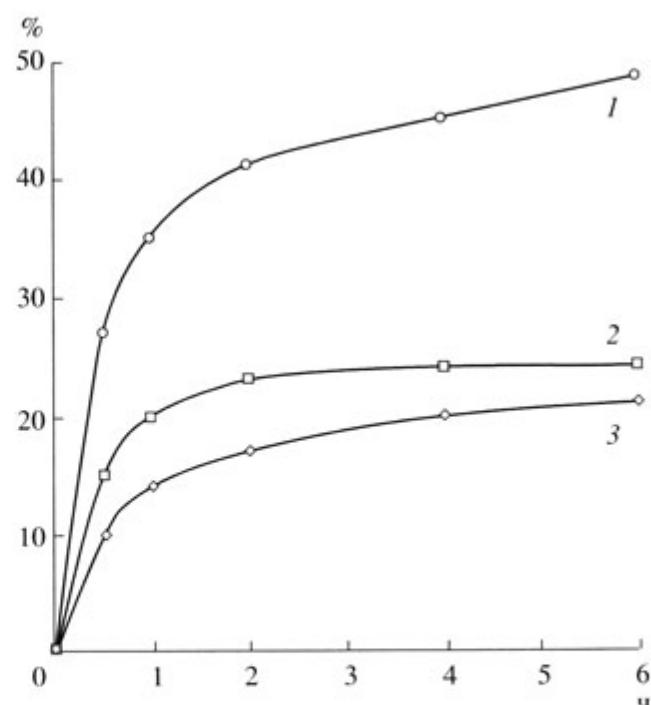


Рис. 2. Кинетика выделения белка из пленок на основе ПГБ в 0.9%-ном растворе NaCl (40 мл/г пленки). Номера кривых соответствуют номерам образцов табл. 4.

Высокопористая структура пленки на основе смеси ПГБ–ПКЛ с системой взаимопроникающих пор должна была обеспечить интенсивный массоперенос при контакте с физиологическим раствором. Как видно из результатов, приведенных на рис. 2, кривая 3, этого не произошло, и скорость десорбции белка из этой пленки даже ниже, чем из остальных. Учитывая высокую выявляемую активность трипсина, эти факты можно объяснить только адсорбцией амфи菲尔ных молекул белка из водных растворов на развитой внутренней поверхности гидрофобных пленок.

В результате можно заключить, что использование смешанных растворов биодеградируемых полиэфиров ПГБ и ПКЛ в хлороформе для получения пористых полимерных пленок, содержащих иммобилизованный трипсин, позволяет направленно регулировать их структуру и создавать полимерные раневые покрытия с заранее заданными свойствами: пористость, скорость биодеструкции, гидрофильность и кинетика выделения биологически активных соединений.

Авторы выражают благодарность сотруднику фирмы Mettler Dr. Juergen Schawe за помощь в проведении термомеханических исследований и

с.н.с. Оболонковой Е.С. ИСПМ РАН за получение микрофотографий.

Работа выполнена при поддержке Комплексного проекта ЖС-КП.4/002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васнев В.А. // Высокомолекулярные соединения. 1997. Т. 39. № 12. С. 2073–2086.
2. Полищук А.Я., Казакова М.В., Заиков Г.Е. // Пластические массы. 2000. № 4. С. 31–34.
3. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины. Новосибирск: Изд-во. СО РАН. 2003. 330 с.
4. Кильдеева Н.Р., Гальбраих Л.С., Вихорева Г.А., Бычук М.А., Иорданский А.Л., Миронов А.В. // Структура и динамика молекулярных систем. / Ред. Ю.Б. Грунина. Йошкар-Ола–Уфа–Казань–Москва: Изд. МарГТУ. 2005. Вып. 12. ч. 1. С. 342–345.
5. Пол Д., Ньюмен С. Полимерные смеси. Т. 1. М.: Мир, 1981. 550 с.
6. Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Ефременко Е.Н., Перегудов А.А., Перминов П.И. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Матер. 7-ой Междунар. конф. М.: Изд. ВНИРО, 2003. С. 395–398.

Preparation of Biodegradable Porous Films for Use as Wound Coverings

N. R. Kil'deeva^a, G. A. Vikhoreva^a, L. S. Gal'braitkh^a, A. V. Mironov^a,
G. A. Bonartseva^b, P. A. Perminov^a, and A. N. Romashova^a

^a Moscow State Textile University, Moscow, 119071 Russia

^b Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

Received January 23, 2006

Abstract—We studied the preparation of polymeric films formed from solutions of poly-3-hydroxybutyrate and poly-ε-caprolactone in chloroform and methylene chloride. A morphological study of film chips (electron microscopy) showed that solvent evaporation results in the formation of a heterogeneous structure with interpenetrating pores (1–20 μm). We proposed a new method for introducing the proteolytic enzyme and the amnopolysaccharide chitosan into the composition of polyester films. Composite films possessed necrolytic activity and were characterized by increased hydrophilicity. Properties of enzyme-containing films from a mixture of polymers (proteolytic activity, porous structure, and increased hydrophilicity) account for their use in the preparation of biodegradable wound coverings.