

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ПОЛИГЛИКОЛИДА

*Карпухина С. Я., Гумаргалиева Е. З., Даурова Т. Т.,
Миронова В. А.*

Деструкция полимерных имплантатов в организме является многофакторным процессом, в котором распад химических связей может происходить под действием воды, солей, а также, возможно, и ферментов.

При анализе действия этих катализирующих агентов на полимеры чаще всего неоднозначность встречается при объяснении роли ферментов в деструкции имплантата. В работе [1] было найдено, что распад ряда полиуретанов идет значительно быстрее в организме, чем в экстрактах печени, почек, а также в растворах различных протеолитических ферментов (эластаза, трипсин, химотрипсин). В то же время имеются данные [2], что полигликолид теряет ~25% прочности при инкубировании в растворе химотрипсина (в трис-буфере с pH 7,4) в течение 15 сут. В результате изучения вязкости растворов полигликолида после выдерживания в 0,1%-ном растворе химотрипсина в фосфатном буфере с pH 7,18 авторы работы [3] пришли к выводу, что полигликолид (ПГ) деструктирует, хотя и не был проведен анализ активности самого фермента и влияния состава буферного раствора на полимер. Описанные явления бактериальной деструкции полимеров также можно объяснить в конечном счете как результат действия внеклеточных ферментов [4].

Цель настоящего исследования — изучение действия ферментов на деструкцию ПГ.

В предыдущих работах было показано, что ПГ распадается под действием воды и фосфатов, однако суммарная скорость деструкции под действием этих низкомолекулярных компонентов с учетом их концентрации в организме оказалась значительно ниже скорости распада ПГ в живом организме, причем эта разница увеличивается с ростом глубины превращения полимера [5–8].

Часть ферментов, обнаруженных в капсуле полиглактина — сополимера молочной и гликолевой кислот [2, 10], была нами использована для изучения ферментативной деструкции ПГ.

При распаде ПГ единственным продуктом деструкции является гликолевая кислота. За деструкцией ПГ, представляющего собой хирургическую шовную нить Дехоп № 3 (фирма «Davis and Geck», США), следили двумя методами по накоплению гликолевой кислоты. С помощью ультрафильтрации отделяли фермент от водорастворимых низкомолекулярных продуктов деструкции на ультрафильтрационной ячейке 8МС (Амикон) с мембранией Диапор. Концентрацию гликолевой кислоты в фильтрате определяли спектрофотометрически на приборе «Рье Unicam SP8-100» при $\lambda=200$ нм.

Второй независимый метод количественного контроля за накоплением продуктов распада ПГ — титрование выделяющейся гликолевой кислоты раствором 0,005 н. NaOH до pH 7,4 при 37° на титраторе TTT2 «Radiometer».

Для каждого фермента с использованием специфических низкомолекулярных субстратов определяли их концентрацию и временной интервал, в течение которого активность фермента менялась не более чем на 10%.

На рис. 1 приведена типичная кинетическая кривая накопления гликолевой кислоты в процессе деструкции ПГ в воде и водном растворе фермента β -глюкуронидазы (β -Г) активности 500 Ф в течение 15 сут. Поскольку активность β -Г уменьшалась во времени, то каждые 12 ч реакционную смесь фильтровали таким образом, чтобы в фильтрат переходило 2 мл

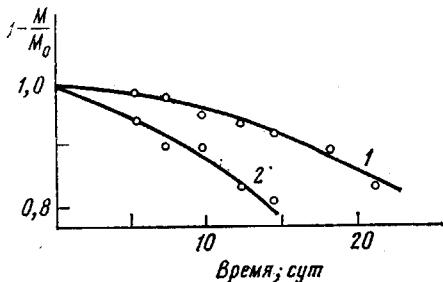


Рис. 1. Степень превращения по массе волокна полигликолида в воде (1) и в водном растворе фермента β -Г активности 500 Ф в течение 15 сут (2) при 37°

кинетические кривые накопления гликоловой кислоты в присутствии β -Г различной активности, при этом использовали нити ПГ, предварительно деструктированные на 15 вес.%.

На рис. 2, б показано замедление процесса разложения ПГ, предварительно деструктированного на 25 вес.% при добавлении неспецифического ингибитора общего типа для гидролитических ферментов α -иодацетамида. При этом оказалось, что добавление малого количества ингибитора приводит к заметному замедлению процесса деструкции, сводя его скорость к значению скорости неферментативного распада. Интересным экспериментальным фактором является уменьшение скорости деструкции ПГ в присутствии трипсина в отличие от данных работ [1, 3].

В случае использования водных растворов эластазы, липазы, щелочной фосфатазы при приведенных выше условиях не получено заметного ускорения выделения гликоловой кислоты. Поэтому, хотя эти ферменты и были найдены в капсуле полиглактина, можно полагать, что они не проявляют активности по отношению к ПГ.

Следовательно, на основании проведенных экспериментов можно считать, что, по-видимому, β -Г является, в какой-то мере «специфическим» ферментом по отношению к ПГ, который и может быть ответственным за распад его в организме, особенно при глубоких степенях превращения. Действительно, этот фермент находится в достаточном количестве в крови, суммарная активность его составляет 300–500 Ф [8].

Таким образом, установив, что β -Г является самым активным ферментом по отношению к ПГ, можно предположить, что в первом приближении увеличение массы гликоловой кислоты должно быть пропорционально активности фермента и концентрации доступных сложноэфирных связей, тогда

$$\frac{m}{m_0} = k_{\text{аф}} \cdot C_{\text{а.с}} \cdot C_{\Phi},$$

где $m_0 = M_0/M_{\infty}$, M_0 – исходная масса ПГ, $M_{\infty} = 58$ (молекулярная масса осново-моля ПГ), m – число молей выделившейся гликоловой кислоты, C_{Φ} – активность фермента, $C_{\text{а.с}}$ – концентрация доступных сложноэфирных связей, $k_{\text{аф}}$ – эффективная константа брутто-распада ПГ.

При близких степенях превращения можно принять, что концентрация доступных сложноэфирных связей будет в первом приближении постоянной, и, следовательно, скорость ферментативной деструкции определяется активностью фермента

$$\frac{m}{m_0} = k_{\text{аф}} \cdot C_{\Phi}$$

раствора. К оставшемуся концентрату (4 мл) добавляли 2 мл раствора β -Г с рассчитанной активностью, так, чтобы восстановить общую активность фермента в реакционной смеси до первоначальной величины.

Из рис. 1 видно, что в присутствии β -Г нити ПГ распадаются гораздо быстрее, чем в воде.

Методом потенциометрического титрования процесс ферментативной деструкции нитей ПГ исследовали 3–4 ч; в течение этого времени активность фермента изменялась не более чем на 10%.

На рис. 2, а приведены типичные

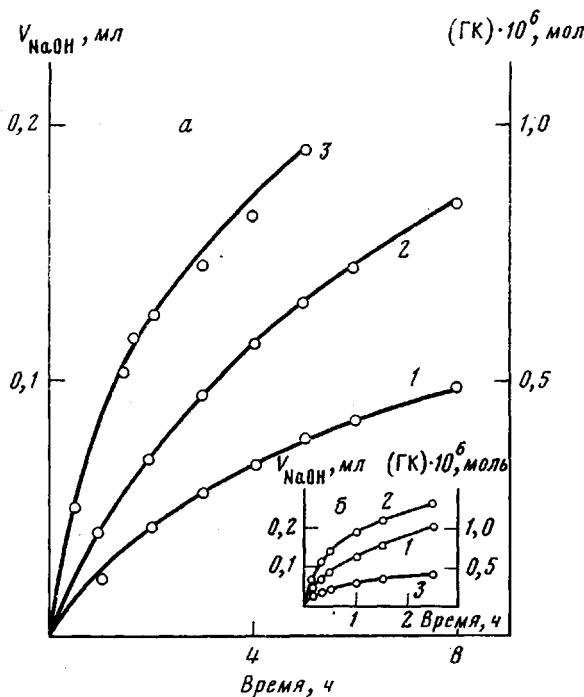


Рис. 2. Кинетические кривые накопления гликолевой кислоты (ГК) в процессе деструкции ПГ при 37°: а – в водных растворах фермента \$\beta\$-Г с концентрацией 0,1 (1), 0,3 (2), 1,0 мг/мл (3) (степень преддеструкции ПГ 15%); б – в воде (1), водном растворе фермента \$\beta\$-Г с концентрацией 1 мг/мл (2) и водном растворе \$\alpha\$-иодацетамида с концентрацией 1,75 мг/мл (3) (степень преддеструкции ПГ 25%)

Действительно, при сопоставлении начальных скоростей с активностями фермента получена прямолинейная зависимость и

$$k_{\text{аф}} = (0,35 \pm 0,05) \cdot 10^{-6} \Phi^{-1}$$

Из полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что в гетерогенных условиях нити ПГ подвергаются деструкции под действием фермента \$\beta\$-глюкуронидазы; это дает возможность объяснить расхождения величин скоростей распада в модельных средах и живом организме.

Авторы благодарят У. И. Хургина и Л. В. Моисеева за внимание и участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

- Липатова Т. Э., Пхакадзе Г. А. В кн.: Применение полимеров в хирургии. Киев: Наукова думка, 1977, с. 62.
- Williams D. F. In: III Int. Conf. Plastics in Medicine and Surgery, Nether land: 1979, p. 1041.
- Баталов А. П., Маленеева И. Г., Савин В. А. Физ.-хим. основы синтеза и переработки полимеров. 1977, с. 47.
- Matham J. V., Maier W. I. Biotechnol. and Bioengng, 1978, v. 20, № 6, p. 865.
- Moiseev Y. V., Daurova T. T., Voronkova O. S., Gumargalieva K. Z., Privalova L. G. J. Polymer Sci. Polymer Symp., 1979, v. 66, p. 269.
- Разумова Л. Л., Даурова Т. Т., Веретеникова А. А., Привалова Л. Г., Гумаргалиева К. З., Воронкова О. С. Полимеры в медицине, 1979, т. 9, № 2, с. 119.
- Привалова Л. Г., Гумаргалиева К. З., Воронкова О. С., Заиков Г. Е., Моисеев Ю. В., Разумова Л. Л. Высокомолек. соед. А, 1980, т. 22, № 8, с. 1981.

8. Гумаргалиева К. З., Мусеев Ю. В., Даурова Т. Т. Качественные основы биосовместимости и биодеградируемости полимеров. М.: ЦБНТИмедпром, 1981, с. 32.
9. Salthouse T. N., Matlaga B. F. Surg., Gynecol. and Obstetr., 1976, v. 142, № 4, p. 544.
10. Salthouse T. N. J. Biomed. Mater. Res., 1976, v. 10, № 2, p. 197.
11. Fishman W. H., Springer B., Brunetti R. J. Biol. Chem., 1948, v. 173, № 2, p. 449.
12. Neumann H. J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 18, p. 4671.
13. Garen A., Levinthal C. Biochim. Biophys. Acta, 1960, v. 38, № 3, p. 470.
14. Naughton M. A., Sanger F. Biochem. J., 1961, v. 78, № 1, p. 156.
15. Desnuelle P., Rovery M. In: Advances Protein Chemistry, N. Y.-L.: Acad. Press Inc., 1961, v. 16, p. 139.

Институт хирургии им. А. В. Вишневского
АМН СССР

Поступила в редакцию
21.I.1982

УДК 541.64:547.463

ДЕГИДРОЦИКЛИЗАЦИЯ ПОЛИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ИХ КОМПЛЕКСАХ С ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНОМ

*Казарин Л. А., Барановский В. Ю., Литманович А. А.,
Паписов И. М.*

Согласно современным представлениям, в полимер-полимерных комплексах достаточно протяженные непрерывные («лестничные») последовательности межцепных связей существуют с несвязанными участками — «петлями». Подвижность участков цепей в лестничных участках и петлях может заметно различаться, поэтому и способность звеньев макромолекуллярных компонентов поликомплекса в свободном и связанном состояниях к вступлению во внутри- и межмолекулярные реакции может быть существенно различной. Например, как показано в работе [1], реакция образования циклических ангидридных звеньев (дегидроциклизация) в макромолекулах полиметакриловой кислоты (ПМК), связанных в комплекс с полиэтиленгликолем или полиакриламидом, протекает только в петлях поликомплексов. Однако вопрос о том, влияют ли подобные внутримолекулярные превращения в петлях одной из макромолекул на устойчивость поликомплекса, оставался открытым.

В данной работе на примере поликомплексов ПМК и полиакриловой кислоты (ПАК) с поливинилпирролидоном (ПВП)¹ исследована устойчивость поликомплексов в процессе внутримолекулярного превращения в одном из компонентов (в данном случае поликислоте). Указанные поликомплексы выбраны по той причине, что степень связывания макромолекул в них удобно контролировать методом ИК-спектроскопии.

В работе использовали ПМК и ПАК, полученные радикальной полимеризацией в бензole при 60° с ДАК (0,1% от веса мономера). Молекулярные массы ПМК (2,6·10⁵) и ПАК (2·10⁵) определяли вискозиметрически соответственно в 0,002 н. HCl при 25° и в 2 н. NaOH при 30° [2].

Образцы для ИК-спектроскопии в виде пленок на пластине KRS-5 получали испарением растворителя (воды) при комнатной температуре: поликомплексы получали, смешивая растворы полимерных компонентов в эквимольном соотношении. Образцы помещали в кювету с подогревом и регистрировали ИК-спектры в интервале 700–2000 см⁻¹ на спектрофотометре UR-20 (ГДР), выдерживая при заданной температуре (30–260°) в течение 20 мин (призма NaCl).

На рис. 1 приведены ИК-спектры поликомплексов (ПМК·ПВП) и (ПАК·ПВП), а также их компонентов в свободном состоянии. Как видно из рисунка, в спектрах поликомплексов изменяется структура полосы ν_{C=O} в области 1700 см⁻¹, что для системы ПАК – ПВП отмечалось также в работе [3]. Полоса поглощения ν_{C=O} карбоксильных групп поликислот в комплексах с ПВП (1730 см⁻¹) смещена в высокочастотную область по

¹ Образцы ПВП молекулярных масс 1900 и 11 000 были любезно предоставлены Ю. Э. Киршем.