

УДК 541.64.547.995

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ХИТОЗАНОВЫХ ПЛЕНОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОЛЛАГЕНАЗЫ

© 2006 г. Е. И. Кулиш*, В. П. Володина**, С. В. Колесов*, Г. Е. Заиков***

*Башкирский государственный университет
450074 Уфа, ул. Фрунзе, 32

**Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, пр. Октября, 71

***Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 20.02.2006 г.

Принята в печать 28.04.2006 г.

Рассмотрены особенности протекания ферментативной деструкции образцов хитозана, полученных в виде пленок из растворов в уксусной кислоте, под действием неспецифического фермента – коллагеназы. Варьирование концентрации кислоты в исходном растворе существенно сказывается на структуре хитозана в сформированной пленке и, как следствие, на степени деструкции пленочных образцов. Добавки поливинилового спирта при формировании хитозановой пленки приводят к увеличению степени ферментативной деструкции последней.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отмечается повышенный интерес специалистов к препаратам на основе хитина ракообразных, его производным и возможностям их использования в различных областях медицины. Одним из достоинств хитозана является его биоразрушаемость в организме. Это определяет возможность использования хитозана и его производных при создании биодеградируемых полимерных носителей фармацевтических препаратов в виде пленок [1]. В условиях медицинского применения хитозановых материалов их биодеградация осуществляется под действием неспецифических ферментов (например, пепсина, лизазы, коллагеназы и т.д.). В связи с этим рассмотрение факта возможного деструктирующего влияния на хитозан неспецифического фермента представляется важной задачей, как с научной, так и с практической точки зрения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования использовали образец хитозана производства фирмы “Химмед”, Россия (ТУ 6-09-05-296-76), полученный щелочным деацетилированием крабового хитина, со степенью деацетилирования ~75% и с $M_\eta = 12.0 \times$

E-mail: onlyalena@mail.ru (Кулиш Елена Ивановна).

$\times 10^4$ и ПВС марки 16/1 (ГОСТ 10779-78) с $M_\eta = 2.5 \times 10^4$. В качестве фермента применяли коллагеназу, взятую в количестве 4 мас. % по отношению к полимеру. Пленки хитозана, а также его смесей с ПВС из растворов в уксусной кислоте различной концентрации получали методом полива на стеклянную подложку. Массовая концентрация полимеров в исходном растворе составляла 2 г/дл. Концентрацию уксусной кислоты варьировали от 1 до 70 мас. %. Толщина пленок во всех экспериментах была постоянная – 0.1 мм. Для моделирования возможного процесса деструкции пленочного образца хитозана на раневой поверхности пленку помещали на подложку, смоченную раствором коллагеназы, и выдерживали при температуре 35°C в течение определенного времени. Кинетику деструкции исследовали методом вискозиметрии в буферном растворе, состоящим из 0.3 М уксусной кислоты и 0.2 М ацетата натрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная в работе методика вискозиметрической оценки степени изменения ММ позволяет установить факт протекания деструкции по уменьшению вязкости растворов хитозана под действием коллагеназы в зависимости от продолжительности выдержки в нем пленочного образ-

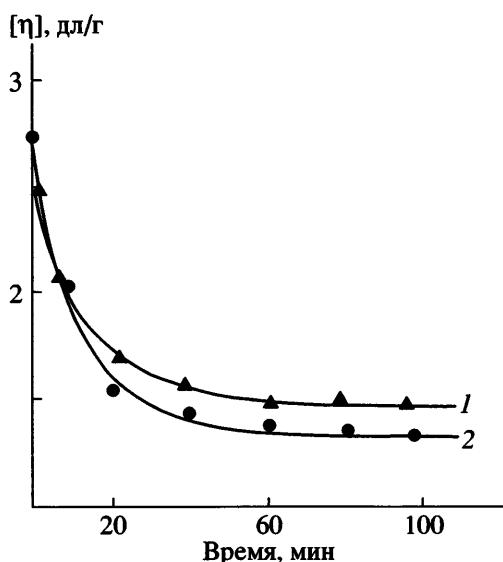


Рис. 1. Зависимость характеристической вязкости растворов хитозана, полученных из пленочных образцов, сформированных из 1% (1) и 10%-ной уксусной кислоты (2), от продолжительности контакта с коллагеназой.

ца. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что в пленках хитозана под действием коллагеназы проходит ферментативная деструкция, несмотря на то, что данный фермент является неспецифичным по отношению к хитозану и интенсивность взаимодействия последнего с коллагеназой (особенно учитывая его высокую кристалличность), очевидно, невелика. Поскольку специфичное действие коллагеназы на коллаген состоит в статистическом расщеплении белковых молекул, можно предположить, что и в случае хитозана деструкция макроцепей протекает по закону случая. Обращает на себя внимание факт, что при ферментолизе хитозановой пленки изменение характеристической вязкости во времени носит неравномерный характер — основное падение вязкости (в среднем на 30–40% от исходного значения) происходит за первые 30 мин, а далее изменение характеристической вязкости раствора, полученного из пленочных образцов, крайне незначительно (рис. 1). Кроме того, значение характеристической вязкости хитозана, определенное путем растворения пленочного образца, прошедшего стадию формования из раствора в уксусной кислоте и не подвергнутого ферментативной деструкции, не совпадает со значением характеристической вязкости исходного хитозана. Данный факт позволяет предположить протека-

ние структурных перестроек, которые происходят в растворе и сохраняются в пленке.

Известно [2], что концентрация уксусной кислоты существенно сказывается на степени протонирования аминогрупп хитозана α и вязкости растворов хитозана. Эквимольное соотношение уксусной кислоты : хитозан обеспечивает достижение величин α , не превышающих 0.5–0.7. Соответственно растворы хитозана в разбавленной уксусной кислоте (1–2 мас. %) характеризуются невысокой вязкостью и компактной формой макромолекул хитозана. Лишь при 7–10-кратном мольном избытке уксусной кислоты (10%-ная уксусная кислота) по отношению к хитозану степень протонирования аминогрупп становится равной единице. Повышение концентрации уксусной кислоты от 1 до 10% сопровождается возрастанием характеристической вязкости раствора. При увеличении концентрации кислоты выше 10% наблюдается снижение характеристической вязкости, связанное с повышением ионной силы раствора, экранированием аминогрупп полимера и компактизацией его макромолекул. Кроме влияния на степень протонирования хитозана, необходимо учесть тот факт, что растворы с различным содержанием уксусной кислоты являются растворителями разного термодинамического качества по отношению к хитозану. Известно, что растворы 70%-ной уксусной кислоты характеризуются наибольшим сродством к хитозану [3]. Кроме того, для растворов хитозана в 70%-ной уксусной кислоте отмечается высокая степень структурирования вследствие высокой степени структурирования самого растворителя и из-за образования большого числа межмолекулярных водородных связей. Как следствие, абсолютная вязкость достигает своего максимума именно для растворов хитозана в 70%-ной уксусной кислоте. Столь существенное различие в структуре исходных растворов сохраняется, очевидно, и в структуре пленок, сформированных из растворов. Зависимость характеристической вязкости растворов, полученных из пленочных образцов, от концентрации кислоты, из которой была сформирована пленка, имеет сложную форму (рис. 2). Наименьшая вязкость — у растворов, полученных из пленок, сформированных из 1%-ной уксусной кислоты. Максимального значения достигает характеристическая вязкость раствора хитозана из пленок, сформированных из 10 и 70%-ной уксусной кис-

лоты. Следовательно, структура хитозана, которую он имел в исходном растворе, во многом сохраняется и в пленках, полученных из этих растворов. Такая большая разница в значениях характеристической вязкости позволяет предположить, что использование уксусной кислоты различной концентрации для формирования пленок обеспечивает разную плотность.

В связи с этим существует принципиальная возможность, варьируя структуру полученного из раствора пленочного материала, регулировать доступность звеньев хитозана для взаимодействия с ферментом в процессе деструкции, и, следовательно, регулировать его скорость.

По данным вискозиметрических измерений можно оценить не только относительное уменьшение характеристической вязкости, но и ММ хитозана, пользуясь уравнением Марка–Куна–Хаувинка для растворов хитозана в используемом ацетатном буфере ($[\eta] = 1.38 \times 10^{-4} M^{0.85}$) (табл. 1).

Добавление к хитозану другого водорастворимого полимера – ПВС значительно улучшает физико-механические свойства композиций и позволяет получать тонкие, прочные, эластичные и прозрачные пленки [4, 5]. Более того, как отмечается в работе [6], независимо от концентрации используемой кислоты в исходном растворе, в сформированной пленке хитозан–ПВС увеличивается размер макромолекул по сравнению с аддитивными значениями. Данный факт, очевидно, обусловлен интерполимерным взаимодействием, т.е. образованием гетероагрегатов хитозан–ПВС, которые, как известно, характеризуются пониженной плотностью упаковки и большими размерами. Таким образом, введение второго полимера, очевидно, изменяет надмолекулярную структуру исходной пленки, что находит свое отражение при ферментативной деструкции хитозана в полимерной композиции.

Отметим, что в выбранных условиях ПВС ферментативной деструкции не подвергается. Об этом свидетельствует факт постоянства его относительной и характеристической вязкости в течение длительного времени. Однако введение ПВС не остается индифферентным для процесса деструкции хитозана. Если в контакт с ферментом вступают образцы хитозан–ПВС, полученные в виде пленок из 1%-ного раствора в уксусной кислоте, ферментолиз хитозановых звеньев при всех

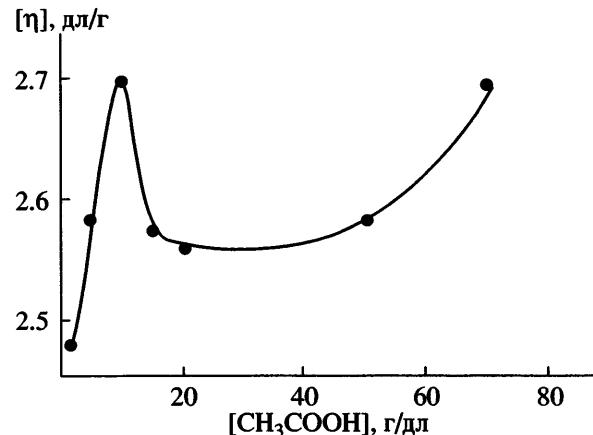


Рис. 2. Зависимость характеристической вязкости растворов хитозана, полученных из недеструктированных пленочных образцов, от концентрации уксусной кислоты в исходном растворе.

изученных соотношениях полимеров в смеси происходит в большей мере, чем в случае индивидуального хитозана (табл. 2).

Факт увеличения степени ферментативной деструкции при введении в пленку хитозана ПВС, который сам деструкции не подвергается, может быть объяснен только с позиции образования смешанных агрегатов хитозан–ПВС с пониженной плотностью упаковки. Доступность хитозана для взаимодействия с коллагеназой в таких рыхло упакованных агрегатах больше, чем в случае гомоагрегатов хитозан–хитозан с высокой плотностью упаковки, а соответственно выше и степень деструкции хитозана.

Таким образом, процесс ферментативной деструкции пленочных образцов хитозана оказывает

Таблица 1. Изменение ММ и $[\eta]$ пленочных образцов хитозана, полученных из исходных растворов с различным содержанием уксусной кислоты после выдержки их в растворе коллагеназы в течение 1 ч (ММ исходного хитозана 1.26×10^5 , $[\eta] = 3.0$ дL/g)

[CH ₃ COOH], мас. %	$\Delta[\eta]$, дL/g	$\Delta M_\eta \times 10^{-3}$
1	1.03	36
5	1.28	47
10	1.33	49
15	1.15	28
20	1.08	38
50	1.12	40
70	1.59	60

Таблица 2. Изменение ММ и $[\eta]$ пленочных образцов хитозан–ПВС, полученных из растворов в 1%-ной уксусной кислоте после выдержки их в растворе колагеназы в течение 1 ч (ММ исходного хитозана 1.26×10^5 , $[\eta] = 3.0$ дл/г)

[ПВС] в смеси, мас. %	$\Delta[\eta]$, дл/г	$\Delta M_\eta \times 10^{-3}$
0	1.03	36
20	1.32	48
40	1.35	50
60	1.35	50
80	1.40	52

ется чувствительным к надмолекулярной структуре полимера, которая в свою очередь определяется его структурой в исходном растворе, из которого готовятся пленки. Это позволяет формировать хитозановые покрытия с регулируемой биоразрушаемостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muzzarelli R. Chitin. London: Pergamon Press, 1977.
2. Вихорева Г.А., Роговина С.З., Пчелко О.М., Гальбрайх Л.С. // Высокомолек. соед. Б. 2001. Т. 43. № 6. С. 1079.
3. Агеев Е.П., Вихорева Г.А., Матушкина Н.Н., Пчелко О.М., Гальбрайх Л.С. // Высокомолек. соед. А. 2000. Т. 42. № 2. С. 333.
4. Мухина В.Р., Пастухова Н.В., Семчиков Ю.Д., Смирнова Л.А., Кирьянов К.В., Жерненков М.Н. // Высокомолек. соед. А. 2001. Т. 43. № 10. С. 1797.
5. Николаев А.Ф., Прокопов А.А., Шульгина Э.С., Голенишева С.А., Клубикова Л.Е., Мусихин В.А. // Пласт. массы. 1987. № 11. С. 40.
6. Кулиш Е.И., Колесов С.В. // Журн. прикл. химии. 2005. № 9. С. 1511.

Enzymatic Degradation of Chitosan Films by Collagenase

E. I. Kulish^a, V. P. Volodina^b, S. V. Kolesov^a, and G. E. Zaikov^c

^a Bashkortostan State University,

ul. Frunze 32, Ufa, 450074 Bashkortostan, Russia

^b Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
pr. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Bashkortostan, Russia

^c Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

e-mail: onlyalena@mail.ru

Abstract—Special features of enzymatic degradation of chitosan samples prepared as films from solutions in acetic acid, under the action of collagenase as a nonspecific enzyme are considered. Variations in acid concentration in the casting solution had a substantial effect on the chitosan structure in the formed film and, as a consequence, on the degree of degradation of film samples. The addition of poly(vinyl alcohol) upon the formation of a chitosan film led to an increase in the extent of enzymatic degradation of the film.