

УДК 541.64:547.995.12

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ХИТОЗАНОВЫХ ПЛЕНОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 2008 г. Е. И. Кулиш*, В. П. Володина**, Р. Р. Фаткуллина**, 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 02.10.2007 г.
Принята в печать 03.03.2008 г.

Рассмотрены особенности протекания ферментативной деструкции пленок хитозана, полученных из растворов в уксусной кислоте, под действием неспецифических ферментов – коллагеназы и лиразы. Обнаружено, что варьирование концентрации кислоты в исходном растворе существенно скаживается на структуре хитозана в сформированной пленке и, как следствие, на степени деструкции пленочных образцов.

Уникальные свойства получаемого из возобновляемого природного сырья природного полисахарида хитозана (совместимость с тканями человека, бионертность и бактериостатичность, влагопроницаемость, а также и другие свойства) делают его полимером, пригодным для использования в медицинских целях [1]. Среди многочисленных достоинств хитозана – его биоразрушаемость до обычных для организма веществ. Это определяет возможность использования данного полимера при создании биодеградируемых полимерных носителей в виде пленок [2], например в терапии ожоговых ран. В условиях медицинского применения хитозановых материалов их биодеградация осуществляется под действием неспецифических ферментов (в том числе ферментов, присутствующих на коже, – коллагеназы, гиалуронидазы и т.д.). Рассмотрение факта деструктирующего влияния на хитозан неспецифических ферментов представляется важной задачей как с научной, так и с практической точки зрения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили хитозан (ТУ 6-09-05-296-76, фирма “Химмед”, Россия), полученный щелочным дезацетилированием крабо-

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

вого хитина (степень дезацетилирования ~75%, $M_n = 1.2 \times 10^5$), протеолитический ферментный препарат коллагеназа, получаемый из гепатопанкреаса промысловых видов крабов, и ферментный препарат, выпускаемый под торговой маркой лираза (Государственное унитарное предприятие “Иммунопрепарат”, Уфа). Пленки хитозана получали методом полива раствора полимера на поверхность стекла. Массовая концентрация хитозана в исходном растворе составляла 2 г/дл. В качестве растворителя использовали 1%-ную водную уксусную кислоту. Толщину пленок во всех экспериментах поддерживали постоянной и равной 0.1 мм. Пленки сушили при 25°C. В работе провели две серии экспериментов. В одной ферментный препарат, предварительно растворенный в небольшом количестве воды, вносили в раствор хитозана непосредственно перед приготовлением пленки. Содержание ферментного препарата в пленке 0.5–10 мас. % по отношению к массе хитозана. Ферментативную деструкцию хитозановой пленки под действием введенного в пленку ферmenta изучали вискозиметрическим методом в буферном растворе, состоящем из 0.3 М уксусной кислоты и 0.2 М ацетата натрия, согласно стандартной методике [3]. Ошибка эксперимента не более 5%.

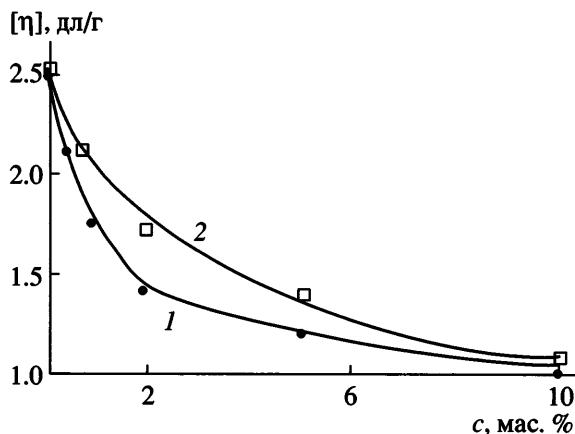


Рис. 1. Зависимость характеристической вязкости хитозана, выделенного из содержащей фермент пленки, от количества c введенной в пленку коллагеназы (1) и лиразы (2).

В другой серии экспериментов хитозановую пленку, не содержащую фермент, помещали на подложку, смоченную раствором ферментного препарата, и выдерживали при 35°C (температура, имитирующей температуру человеческого тела) в течение определенного времени (до 1 ч). Концентрацию ферментного препарата в растворе, контактирующем с хитозановой пленкой, варьировали от 0.1 до 50 мас. %, по отношению к массе хитозана. Кинетику деструкции оценивали по данным вискозиметрии по падению характеристической вязкости на вискозиметре Уббелоде при 25°C аналогично описанному выше случаю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение фермента коллагеназы в раствор хитозана на стадии приготовления пленок приводит к следующим закономерностям. Как видно из рис. 1 (кривая 1), присутствие в пленке фермента вызывает уменьшение характеристической вязкости хитозана. Это свидетельствует о том, что в процессе формирования пленки под действием введенного в пленку фермента происходит деструкция хитозана. Хорошо видно, что чем больше фермента введено в пленку, тем больше степень деструкции хитозана.

Аналогичное падение характеристической вязкости имеет место и в том случае, когда сформированную без фермента хитозановую пленку помещали на влажную подложку, смоченную рас-

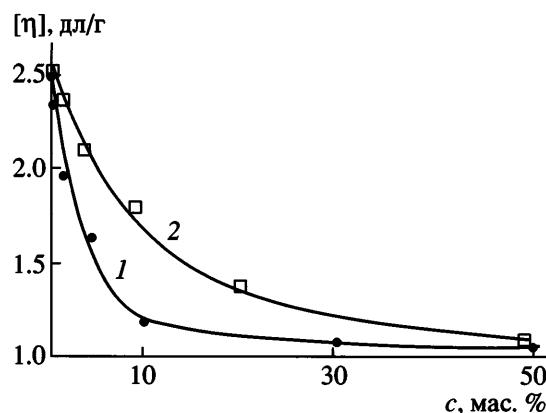


Рис. 2. Зависимость характеристической вязкости хитозана, выделенного после контактирования хитозановой пленки в течение 1 ч с раствором коллагеназы (1) и лиразы (2), от количества фермента в растворе c .

твором коллагеназы (рис. 2, кривая 1). При этом наблюдаются следующие закономерности.

Во-первых, резкое падение характеристической вязкости наблюдается только в первые 10–15 мин контакта пленки с ферментом. Дальнейшее увеличение времени проведения ферментативной деструкции практически не сказывается на значениях характеристической вязкости хитозана. Во-вторых, при повышении концентрации коллагеназы в растворе, в контакте с которым находится пленка, увеличиваются степень падения характеристической вязкости и соответственно ММ хитозана. При значительной концентрации фермента в растворе биодеструкция хитозановой пленки в течение 1 ч приводит к падению ММ хитозана в ~2 раза.

В принципе, протеолитический фермент не должен вызывать деструкцию хитозана, являющегося полисахаридом. Однако препарат коллагеназа представляет собой комплекс ферментов. Этот комплекс обнаруживает высокую гликозидазную активность. Таким образом, более вероятным объяснением ферментативной деструкции хитозановых пленок в присутствии коллагеназы представляется воздействие ферментов с гликозидазной активностью на хитозан. Например, ферментом, сопутствующим коллагеназе, является гиалуронидаза, которая, очевидно, может расщеплять гликозидную связь не только в гиалуроновой кислоте, но и в самом хитозане.

С целью проверки данной гипотезы был использован другой ферментативный препарат – лираза, представляющий собой группу ферментов под общим названием гиалуронидаза, катализирующих реакции гидролитического расщепления и деполимеризации основного компонента соединительной ткани гиалуроновой кислоты. Из рис. 1 и 2 (кривые 2) следует, что наблюдаемые закономерности ферментативной деструкции хитозана в присутствии лиразы аналогичны тем, что имели место при использовании в качестве фермента коллагеназы; это позволяет утверждать, что собственно деструкция макромолекул хитозана происходит именно под действием гиалуронидаз как действующих начал обоих используемых ферментов.

Тот факт, что закономерности ферментативной деструкции, наблюдаемые в присутствии двух указанных ферментов, совпадают и качественно, и количественно, можно вероятно объяснить тем, что доступность фермента для взаимодействия с хитозаном невелика, особенно если учесть высокую степень кристалличности хитозана и полимерную природу ферментов. Очевидно, гликозидазы могут воздействовать только на доступные ей звенья хитозана. Дальнейшее увеличение концентрации фермента или времени контакта плен-

ки с ферментом доступность звеньев не изменяет. В результате этого характеристическая вязкость хитозана меняется не монотонно, а достигает определенного предела, после чего перестает изменяться.

Таким образом, обнаруженный факт падения характеристической вязкости хитозана, полученного в виде пленок из уксуснокислого раствора, под действием ферментных препаратов коллагеназы и лиразы как при введении фермента непосредственно в пленку, так и при контакте пленки с подложкой, содержащей раствор ферментного комплекса, может быть обусловлен тем, что ферментативная деструкция хитозана происходит под действием гликозидаз, находящихся в ферментных препаратах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muzzarelli R.A. Chitin. Oxford: Pergamon Press, 1977.
2. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002.
3. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров. М.: Наука, 1978.

Enzymatic Degradation of Chitosan Films under the Action of Nonspecific Enzymes

E. I. Kulish^a, V. P. Volodina^b, R. R. Fatkullina^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. Kosyginaya 4, Moscow, 119991 Russia

e-mail: onlyalena@mail.ru

Abstract—The features of the enzymatic degradation process mediated by the nonspecific enzymes collagenase and Lyraze are discussed for chitosan films prepared from acetic acid solutions. It was shown that variations in the acid concentration in the initial solution have a substantial effect on both the structure of chitosan in the film formed and the degree of degradation of film samples.