

Новые текстильные перевязочные материалы на основе биodeградируемых полимеров, содержащих протеиназы, для лечения ран и ожогов

А. А. Белов, А. А. Ванюшенкова, Э. Э. Досадина, А. А. Ханафина

Кафедра биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»
Россия, 125480 г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20

Контактное лицо: Алексей Алексеевич Белов, ABelov2004@yandex.ru

Иммобилизация различных терапевтических агентов на биodeградируемые носители способствует более эффективному участию активных веществ в процессе заживления ран. Избирательное накопление агента в очаге поражения позволяет одновременно решить несколько задач: повысить действенность препарата, снизить его расход и устранить нежелательное воздействие препарата на здоровые органы и ткани.

Основные задачи данного исследования:

- создание высокоэффективных раневых покрытий нового поколения и разработка промышленной технологии их получения;
- многоплановые исследования свойств, полученных иммобилизованных терапевтических агентов на модифицированных полисахаридных носителях.

Ключевые слова: диальдегидцеллюлоза, протеиназы, антимикробные средства, хитозан, перевязочные материалы, направленный транспорт лекарств, раны, ожоги.

Для цитирования: Белов А. А., Ванюшенкова А. А., Досадина Э. Э., Ханафина А. А. Новые текстильные перевязочные материалы на основе биodeградируемых полимеров, содержащих протеиназы, для лечения ран и ожогов. Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. 2018; 5 (1): 16–26

DOI: 10.25199/2408-9613-2018-5-1-16–26

New textile dressings based on biodegradable polymers containing proteinases for wounds and burns treatment

A. A. Belov, A. A. Vaniushenkova, E. E. Dosadina, A. A. Khanafina

Department of Biotechnology, The Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education
“Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia”
20, Geroev Panfilovtsev Str., Moscow, 125480, Russia

Immobilization of various therapeutic agents on biodegradable carriers facilitates the active participation of therapeutic materials in the wound healing process. Selective accumulation of the drug in the lesion allows simultaneously solving several problems: increase the efficacy of the drug, reduce its consumption, and eliminate the undesirable effects of the drug on healthy organs and tissues.

The main purpose of this study:

- the creation of high-performance wound coverings of a new generation for medical purpose, the creation and development of industrial technology for their production;
- multidimensional studies of the obtained immobilized therapeutic agents on modified polysaccharide carriers.

Key words: dialdehydcellulose, proteinases, antimicrobial agents, chitosan, drug transport, dressings, wounds, burns.

For citation: Belov A. A., Vaniushenkova A. A., Dosadina E. E., Khanafina A. A. New textile dressings based on biodegradable polymers containing proteinases for wounds and burns treatment. Wounds and Wound Infections. The Prof. B. M. Kostyuchenok Journal. 2018; 5(1): 16–26

Введение

Проблема создания медицинских материалов для лечения ран в последние годы вызывает повышенный интерес со стороны научного сообщества. Исследования, посвященные синтезу производных целлюлозы, содержащих ферменты и другие терапевтические агенты, разработке научных

основ получения подобных материалов, технологии их изготовления, а также изучению свойств и эффективных областей применения имеют большое научное и практическое значение [1, 2, 3].

Современные перевязочные средства по своему дизайну и свойствам существенно отличаются от своих предшественников. Под термином «раневое

покрытие» подразумеваются не только текстильные материалы, но и порошки, пленки, губки, гели и комбинации различных компонентов [1, 2, 3]. Разработаны порошкообразные лекарственные средства, содержащие фермент и водонабухающий сорбент [4].

Одно из актуальных направлений при создании раневых покрытий – это использование биодegradуемых полимеров [1, 3, 4, 5, 6]. Способ иммобилизации терапевтических агентов и выбор полимера-носителя должны определяться особенностями эксплуатации. При использовании раневых покрытий необходимо учитывать, что это одноразовые средства с небольшим сроком эксплуатации (до 72 часов), поэтому их биологическая активность должна максимально и полностью реализовываться при наложении на рану [1].

На сегодняшний день ранозаживляющие покрытия на основе целлюлозы (так называемые традиционные) остаются одними из наиболее широко применяемых в медицине [1, 2, 5]. Целлюлоза обладает рядом достоинств, делающих ее практически универсальным носителем для медицинских целей, а именно: инертностью по отношению к биологическим жидкостям и тканям, превосходными сорбционными свойствами, газопроницаемостью, низкой стоимостью, доступностью. Медицинские покрытия на основе целлюлозы способны хорошо драпироваться, что делает препараты атравматичными и защищающими рану не только от внешних повреждений, но и от возможной контаминации и потери влаги [2, 7, 8]. Волокна целлюлозы являются самым распространенным семейством текстильных волокон, входящих в группу волокнообразующих материалов природного полимера – целлюлозы, куда относят волокна природного происхождения, такие как лен, кенаф, хлопок и др., а также искусственно созданные волокна, синтезируемые посредством химической модификации природной целлюлозы и ее производных [2, 7].

По своему химическому строению целлюлоза является многоатомным спиртом, она легко вступает в химические реакции, в том числе окисляется под влиянием разнообразных агентов [1, 7]. На основе реакции окисления целлюлозы совершается множество процессов: отбеливание в процессе получения целлюлозы из древесины, при производстве вискозного волокна и многие другие. Реакция окисления целлюлозы является основополагающей при синтезе новых материалов на ее основе и позволяет получать широкий спектр модификаций, используемых в различных отраслях промышленности и медицине [7]. Основной целью данной реакции является введение новых функциональных реакционноспособных групп

– в основном карбоксильных или карбонильных. На начальном этапе процесса происходит частичное окисление гидроксильных групп, затем на дальнейших этапах может произойти деструкция молекулы с образованием низкомолекулярных моно- и дикарбоновых оксикислот. Возможное частичное окисление целлюлозы способно привести к образованию химически неоднородных продуктов, отличающихся по характеру и расположению функциональных групп.

При всех достоинствах использования целлюлозы в качестве носителя для ранозаживляющих препаратов существует и ряд недостатков. Одним из основных минусов раневых покрытий на основе нативной целлюлозы является ее низкая способность связывать иммобилизованный терапевтический агент. Несмотря на отмеченные ранее хорошие сорбционные свойства полимера, механически связанное лекарственное средство слишком быстро уходит из носителя, не обеспечивая нужный терапевтический эффект [1, 2]. Также нативная целлюлоза не относится к материалам, которые могут быть эффективно разрушены ферментами человеческого организма, т. е. не является биодegradуемой. Были описаны случаи прорастания новой ткани сквозь целлюлозный носитель, что в результате затруднило процесс смены повязки, травмировало рану и замедляло процесс заживления [2]. Все эти факторы заставили разработчиков раневых покрытий обратиться к модифицированным формам целлюлозы в качестве носителей для раневых покрытий.

Из многочисленных способов возможного окисления целлюлозы самым перспективным оказался метод перйодатного окисления, происходящий с разрывом глюкопиранозного кольца, с образованием двух альдегидных групп. Уникальность подобного продукта заключается в значительной реакционной способности образующихся альдегидных групп. Это является необходимым условием при использовании материала для дальнейшей иммобилизации, в том числе химической иммобилизации, на него терапевтических агентов. Данная реакция протекает в сравнительно мягких условиях (водная среда, комнатная температура, значения pH, близкие к нейтральному), а также не дает в качестве побочных продуктов токсичных соединений [1, 7]. Схема перйодатного окисления целлюлозы представлена на рис. 1.

Как уже было отмечено выше, именно благодаря образованию высокореакционноспособных альдегидных групп диальдегидцеллюлоза (ДАЦ) может быть использована в качестве носителя для иммобилизации терапевтических агентов при создании современных перевязочных средств [1, 2, 8]. Различные действующие вещества (терапевтические

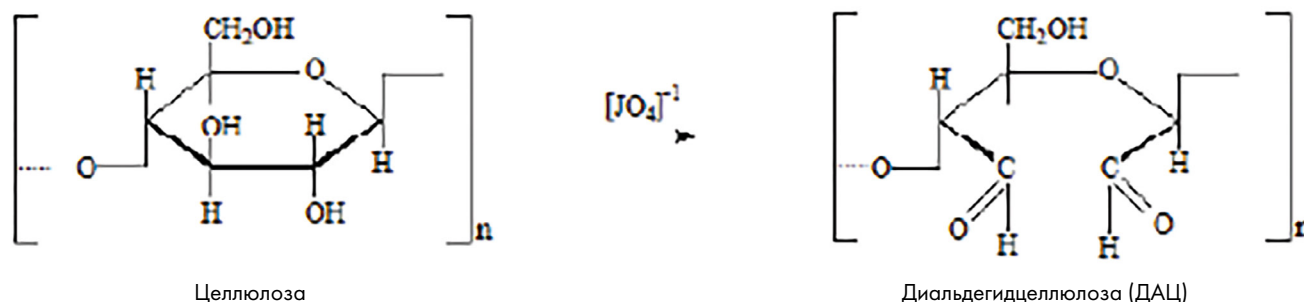


Рис. 1. Схема периодатного окисления целлюлозы
 Fig. 1. Scheme of periodate cellulose oxidation

агенты), в том числе ферменты, при наличии аминок групп способны ковалентно связываться с ДАЦ посредством образования азометиновой связи. Для этого необходимы две обратимые реакции: на первой стадии амин присоединяется к карбонилу с образованием промежуточного карбиноламина, а на второй происходит дегидратирование аминоспирта [1, 7].

Целлюлоза является основой большинства ранозаживляющих препаратов, доступных сегодня на фармацевтическом рынке. Раневые покрытия на основе целлюлозы разделяют на материалы без дополнительных терапевтических агентов, обладающие лишь сорбционными свойствами, и препараты с иммобилизованными лекарственными средствами. Большое разнообразие препаратов с иммобилизованными лекарственными средствами выпускается сегодня как в России, так и зарубежом [2, 8].

Попытки использования ферментов в клинической практике предпринимались давно. Еще в VIII веке н. э. врачи пытались ускорить заживление кожных язв при помощи желудочного сока. Сок дынного дерева (содержит такие протеолитические ферменты, как химопапаин, папаин, пептидаза А) использовали в древности для ускорения заживления ран, ожогов, ушибов, а также в качестве косметического средства [1, 2, 8].

С первой трети XX столетия началось широкое и целенаправленное медицинское использование ферментов для терапевтических целей. Однако на пути ферментной терапии встали серьезные трудности. Дело в том, что в живом организме ферменты и физиологически активные белки часто содержатся внутри клетки. При этом фермент находится в окружении, способствующем поддержанию его нативной структуры, и часто локализован в непосредственной близости от других ферментов, перерабатывающих продукт реакции первого. Ферментные системы взаимодействуют с субстратами через мембрану клетки с помощью различных транспортных механизмов. Если фермент

введен непосредственно в организм пациента, он может оказаться в условиях, способствующих его денатурации, и его активность будет стремительно снижаться сразу после инъекции или местного применения раствора [2, 8].

Различные авторы, в том числе и специалисты кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева и НИИ текстильных материалов, продемонстрировали, что смесь ферментов дает лучший результат, чем каждый фермент по отдельности [1]. Синергизм действия смеси ферментов был отмечен при лечении ожогов, обморожений, воспалительных заболеваний, окклюзий сосудов и онкологических заболеваний [3, 4, 5, 6].

Механизм терапевтического действия протеолитических ферментов, используемых при лечении гнойно-воспалительных заболеваний, сложен и многогранен. Он определяется, во-первых, некролитическим действием, поскольку протеиназы являются своеобразным «химическим скальпелем», расплавляют девитализированные ткани и способствуют их отторжению, не повреждая здоровые. Во-вторых, терапевтическое действие протеолитических ферментов основано на способности сокращать экссудативную фазу воспаления благодаря проникновению в воспалительный очаг, активации фибринолиза путем перевода неактивного плазминогена в активный плазмин, который, расплавляя интракапиллярные тромбы, восстанавливает микроциркуляцию в стенках раны, улучшает обменные процессы. В результате клинически отмечается уменьшение местного воспаления и снижение, а в ряде случаев и полное отсутствие аутоксических реакций. Кроме того, чрезвычайно важным свойством протеиназ, применяемых в гнойной хирургии, является их способность снижать антибиотикорезистентность патогенной флоры, повышать концентрацию антибиотиков в крови и тканях, а также их прямое антиоксическое действие. Энзимо- и антибиотикотерапия сочетают в

себе патогенетический и этиотропный компоненты комплексного лечения гнойной хирургической инфекции [3, 7].

Однако несмотря на высокую эффективность применения протеиназ в медицине и других областях, их использование ограничивают следующие факторы: инактивация при изменении pH и температуры, под действием ингибиторов тканей и крови, антигенные и пирогенные свойства. Нативные ферментные препараты имеют высокую рыночную стоимость и многие из них являются дефицитным продуктом, что приводит к ограничению их широкого применения. Преодолеть эти недостатки удалось путем использования протеолитических комплексов, а также иммобилизацией ферментов (или их комплексов) на различных природных и синтетических носителях [1, 2, 3].

В 1984 году в 40-й Армии, воевавшей в Афганистане, и в ряде военно-медицинских учреждений появилось новое средство для лечения гнойно-некротических ран под названием «Дальцекс-трипсин». 13 февраля 1989 года Приказом Министра Здравоохранения № 85 «О разрешении к медицинскому применению» в список Б был включен Дальцекс-трипсин – лекарственная форма трипсина кристаллического, иммобилизованного на диальдегидцеллюлозе. С этого момента Дальцекс-трипсин стал доступен для народного здравоохранения. Окончательное признание система получила после утверждения фармакопейными статьями ВФС 42-1862-88, ФС 42-3008-93 и ФС 42-3008-99 [8].

В настоящей работе рассмотрены различные композиции иммобилизованных препаратов,

разработанные специалистами кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева и НИИ текстильных материалов на основе модифицированной целлюлозы для лечения ран, изучены их свойства и основные характеристики, а также предложена возможная структурная схема полученных композиционных материалов.

Главные направления поиска в достижении этой цели – создание модифицированных ферментных производных комбинированного действия (т. е. обладающих несколькими видами терапевтической активности) и повышение сродства препаратов к участку поражения (т. е. увеличение селективности их биологического действия). Создание иммобилизованных форм физиологически активных соединений (ФАС) позволяет существенно продлить время активного функционирования лекарственных веществ в организме за счет их стабилизации, сократить расход применяемых препаратов и облегчить курс терапии. Кроме того, химическая модификация ФАС является удобным и информативным приемом для изучения взаимодействия структуры и функции ФАС.

Материалы и методы

Определение ферментативной активности препаратов проводили по гидролизу казеина и азоколла (использовали суспензию азоколла 3,5 мг/мл в 1/15 М фосфатном буферном растворе, pH 8,0). Для определения протеолитической активности использовали 2,0 % раствор казеина по Гаммерстону [1].

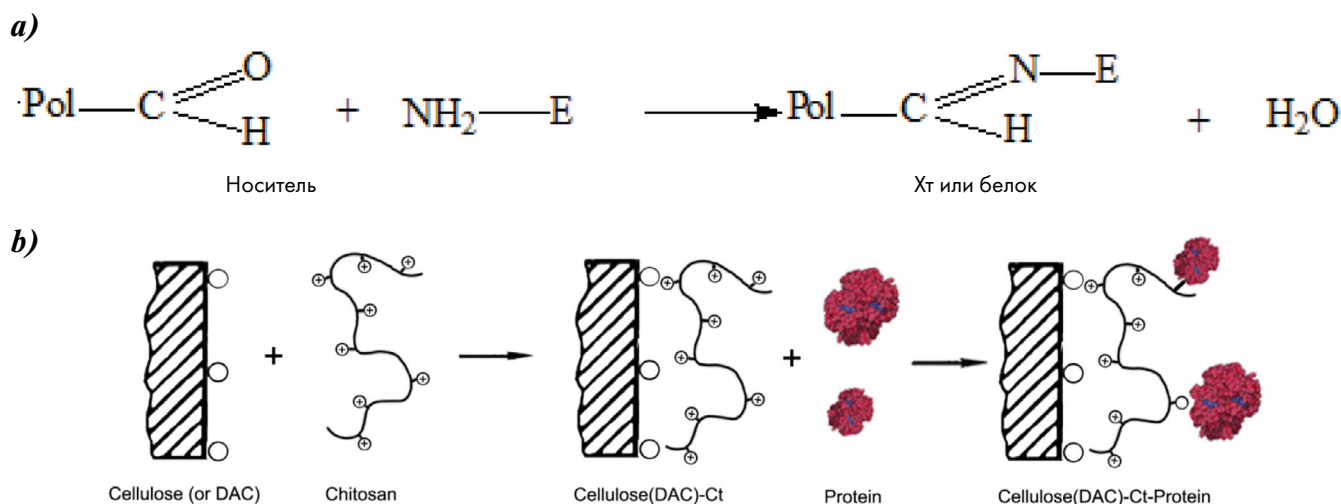


Рис. 2. Общая схема получения иммобилизованных препаратов: а) схема иммобилизации хитозана (хитозан-фермент) или фермента на ДАЦ; б) поэтапная схема получения иммобилизованного препарата
Fig. 2. General scheme for obtaining immobilized preparations: а) scheme for the chitosan immobilization (chitosan-enzyme) or an enzyme on DAC; б) stepwise scheme for obtaining an immobilized preparation

Активацию целлюлозного носителя проводили посредством периодатного окисления, как было описано и представлено на рис. 1 [1, 7].

Количество альдегидных групп на носителе определяли с помощью динитросалициловой кислоты (ДНСК), калибровочную кривую строили по глюкозе [9].

Препараты, не содержащие хитозановый гель, получали следующим образом: на целлюлозный носитель иммобилизовали раствор фермента, после чего высушивали на воздухе. При получении хитозаносодержащих материалов на ДАЦ иммобилизовали хитозановый гель и после высушивания на воздухе иммобилизовали растворы изучаемых ферментных препаратов или ферментосодержащий хитозановый гель.

Схема получения изучаемых нами препаратов состоит из нескольких стадий (рис. 2).

Высушенные образцы с остаточной влажностью не более 6,0 % хранили в полиэтиленовых пакетах при комнатной температуре (25 °С) в защищенном от света месте. В полученных образцах определяли биологическую активность.

Для определения влияния высушивания на сохранение биологической активности индивидуальных препаратов после полного растворения изучаемой композиции в растворе заданного состава (50 или 100 мкл в зависимости от активности) ее наносили на чистую сухую полиэтиленовую пленку. Препарат высыхал на воздухе. В процессе сушки и после полного высыхания вырезали кусочек пленки с изучаемым компонентом и по стандартной методике определяли остаточную биологическую активность (за 100,0 % принимали активность раствора до высушивания). Как было установлено в специально проведенных опытах, полиэтиленовая пленка не влияла на активность изученных ФАС.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 3 представлена предложенная нами схема строения получаемых препаратов [1, 10, 11, 12].

Способ производства формирует различия и достоинства новых материалов.

1. Пролонгированное действие, т. е. лечебный эффект и все виды терапевтической активности, сохраняется минимум 96 часов (обычно медицинские материалы, полученные стандартными методами, после наложения на рану сохраняют терапевтическую активность не более 2–4 часов, после чего такую повязку следует заменить).

2. Минимальная лекарственная нагрузка на организм больного, обеспечивающая полное отсутствие аллергических реакций. Массовое соотношение носитель/физиологически активное

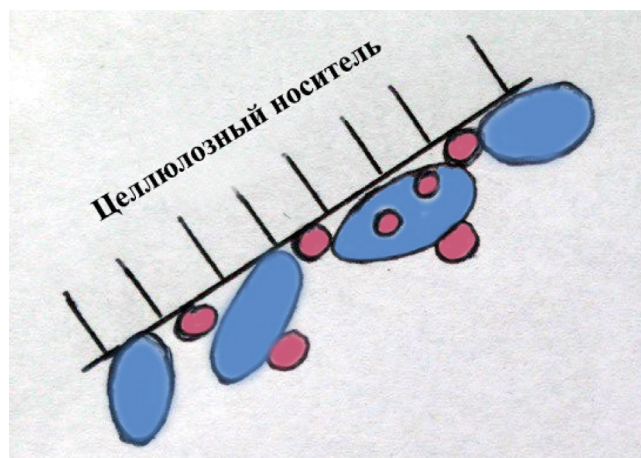


Рис. 3. Схема предполагаемого строения полученных иммобилизованных препаратов ФАС

Fig. 3. Hypothetical structure scheme of the obtained immobilized preparations of physiologically active compounds (PhAC)

вещество составляет менее чем 1 к 1000. Масса физиологически активного вещества оценивается в несколько мг препарата к 1 г носителя вещества. Все известные нам медицинские материалы имеют соотношение 1 к 200 и менее, как, например, немецкая мазь Мибе-Маус, содержащая нативный трипсин [2, 8].

3. Аатравматичность, т. е. способность не прилипать к раневой поверхности. Это происходит, потому что при нахождении раневого покрытия на ране содержащиеся в нем активные вещества в ходе гидролитической деструкции взаимодействуют с содержимым раны, образуя на поверхности тончайшую гелеобразную пленку, которая не препятствует очищению и заживлению раны, но обеспечивает атравматичность раневого покрытия. ДАЦ сама подвержена и гидролитической, и биологической деструкции [1]. Это исключает болевые ощущения при снятии повязки.

Для получения медицинских препаратов были найдены оптимальные условия, метод и степень модификации текстильного носителя для иммобилизации ФАС [1, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Выбор оптимальных условий иммобилизации (рН, температура, состав раствора для иммобилизации и т. д.) заключался в поиске таких параметров, чтобы в процессе иммобилизации относительная биологическая активность терапевтических агентов (ТА) достигала максимального значения и не изменялась до начала высушивания образцов, а высушенный препарат мог длительно храниться (рис. 4), выдерживать долговременную термоинактивацию (40 °С, 72 часа) и, при необходимости, стерилизацию, сохраняя необходимое значение биологической активности [1].

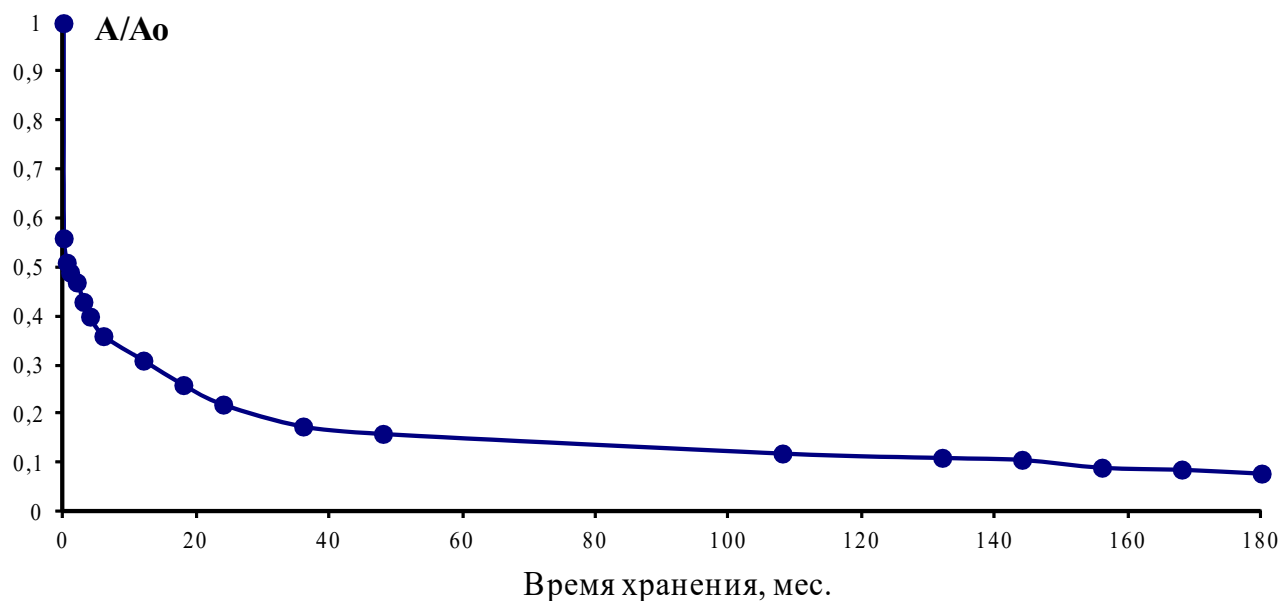


Рис. 4. Изменение ферментативной активности (A/A_0) высушенных образцов иммобилизованных на ДАЦ ферментов при длительном хранении
Fig. 4. Change in an enzymatic activity (A/A_0) of dried samples immobilized on DAC enzyme during the long-term storage

Выбор условий получения препаратов иммобилизованных протеиназ для медицинских целей заключается не только в достижении необходимой активности препарата в конце срока хранения (минимальное значение эффективной константы скорости инактивации), но и в соблюдении необходимых санитарно-гигиенических характеристик готового изделия (рН водной вытяжки, механическая прочность и др.).

Облучение является методом стерилизации, который применяется для изготовления медицинской продукции и может быть использован в промышленном масштабе. Стерилизацию кристаллических и иммобилизованных препаратов, запаянных в полиэтиленовые пакеты, осуществляли на гамма-установке РХМ-γ-20 при 293К в дозе 25 кГрей. Одним из требований, которым должны отвечать биологически активные соединения при использовании для их стерилизации ионизирующих излучений, является их радиационная устойчивость или радиорезистентность. Это не означает, что проникающая радиация не вызывает в таких веществах никаких изменений. Однако после облучения радиорезистентные препараты должны соответствовать нормативным требованиям как по физико-химическим, так и по санитарно-гигиеническим свойствам, в том числе по отсутствию токсических и аллергических воздействий, с одной стороны, и сохранению специфического, например, лечебного эффекта — с другой [1, 2, 8].

Отдаленные последствия действия ионизирующего излучения представляют собой

результат последовательного ряда реакций окисления и восстановления, образования и разрыва химических связей, сшивки или деструкции полимерных цепей, изменения вторичной структуры и конформации макромолекул.

Как показывает многолетняя практика использования излучения для стерилизации, доза 25 кГрей обеспечивает достаточный для безопасного применения уровень микробиологической чистоты. Именно эта доза является типичной для стерилизации изделий самого разного состава и медицинского назначения, хотя в ряде случаев допустимы меньшие дозы, а иногда, наоборот, требуются большие [1, 2].

Выявленное инактивирующее действие зависит в первую очередь от степени модификации носителя, количества иммобилизованного препарата и ряда других условий иммобилизации (рис. 5) [1].

В разрабатываемых нами препаратах ферменты являются наиболее лабильными веществами. Весьма существенной характеристикой фермента является его термическая стабильность. Химическая модификация (в том числе и иммобилизация), может существенно влиять на термостабильность ферментов [1]. Важно, что даже незначительная модификация белков часто приводит к существенному изменению их свойств. Следует помнить, что стабильность — это сложная многоплановая характеристика фермента, учитывающая как различные виды воздействия на белок, так и его реакции на них.

Использование иммобилизованных ферментов на модифицированных текстильных носителях способствует значительному сохранению

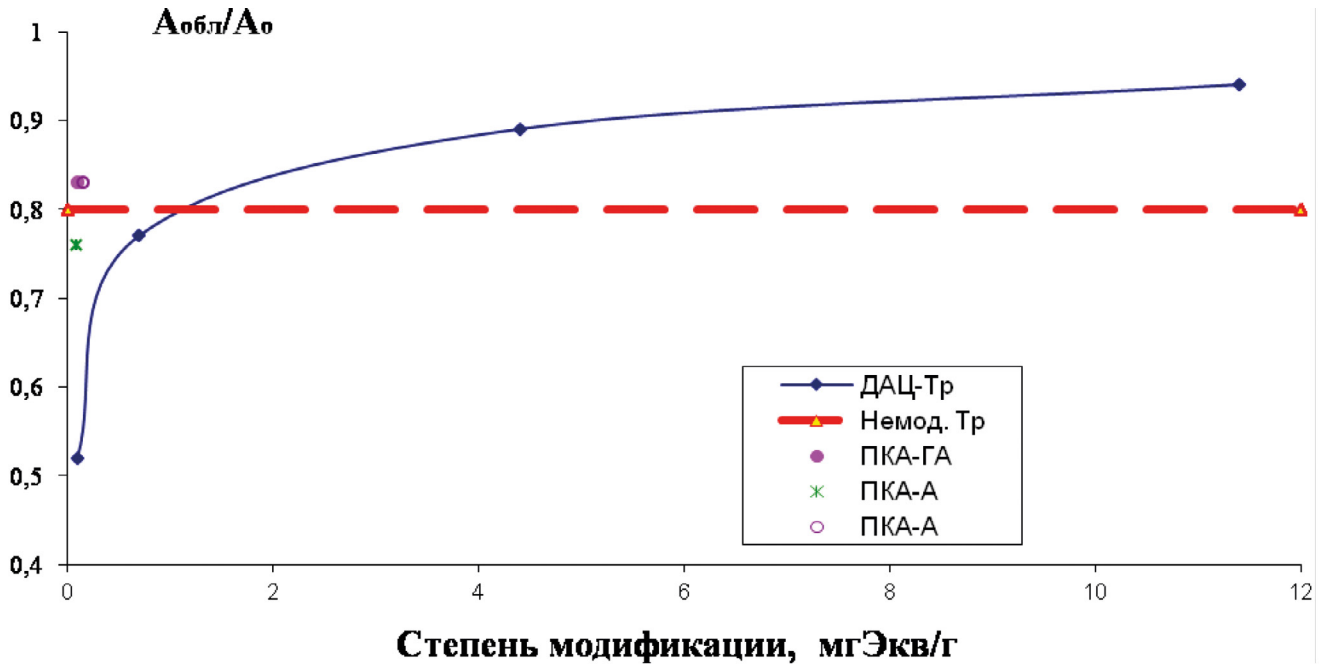


Рис. 5. Действие гамма облучения в дозе 25 кГрей на образцы немодифицированного и иммобилизованного на текстильные носители трипсина (Тр)

Fig. 5. Gamma radiation effect (dose equal to 25 kGr) on samples of unmodified and immobilized on textile carriers trypsin (Tr)

О р и г и н а л ь н ы е с т а т ь и

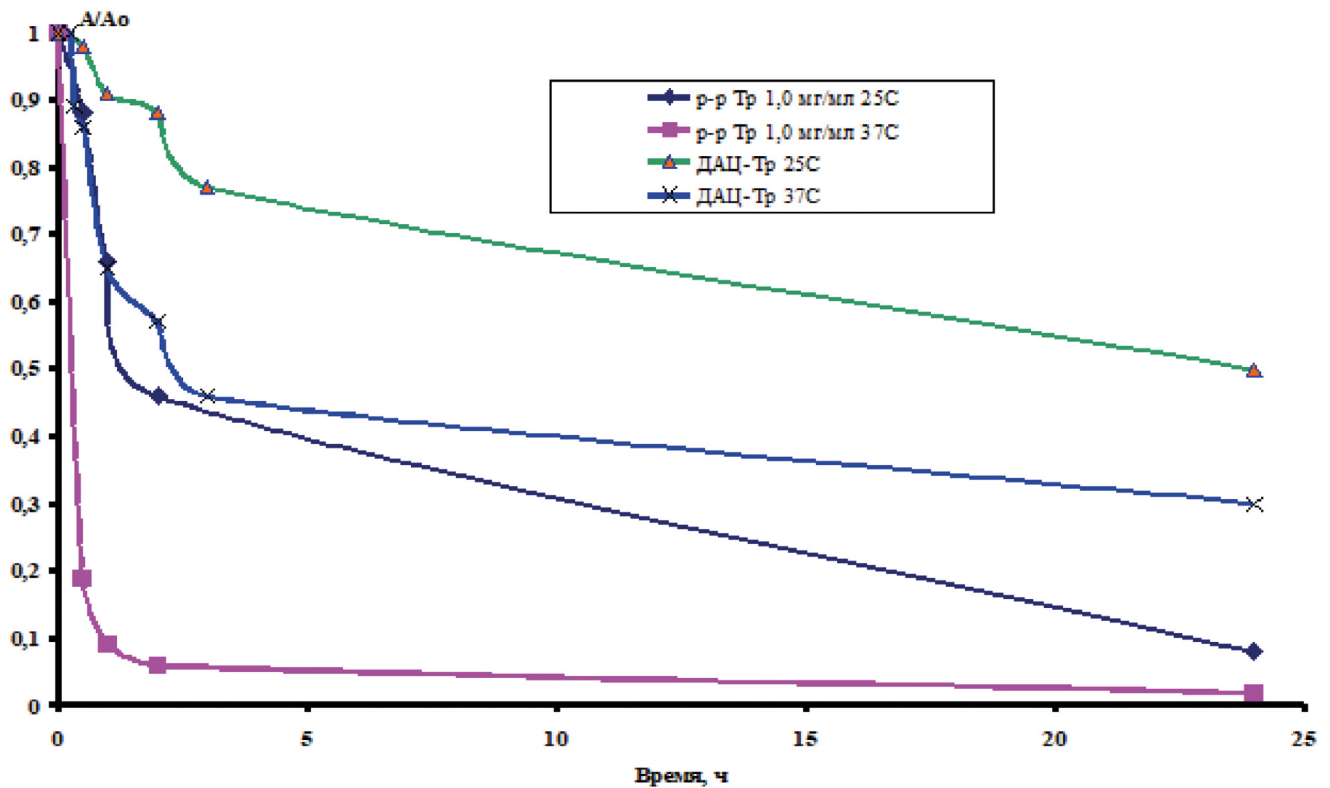


Рис. 6. Действие температуры и времени инкубации на образцы немодифицированного и иммобилизованного на ДАЦ Тр в 1/15 М фосфатном буферном растворе рН 6,2

Fig. 6. Temperature and incubation time effect on samples of unmodified and immobilized on DAC Tr in a 1/15 M phosphate buffer solution pH 6,2

протеолитической активности (рис. 6) по сравнению с растворами фермента, используемыми в медицинских целях (лечебная концентрация Тр более 5 мг/мл) [1, 8, 19].

Одной из важнейших характеристик ферментов, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, является их устойчивость к действию ингибиторов, содержащихся в организме человека, и, в особенности, ингибиторов крови [1, 2, 8, 20]. Изучение взаимодействия ферментов с ингибиторами крови представляет также большой интерес в связи с выяснением механизма действия фермента на макроорганизм в целом, поскольку такое взаимодействие, возможно, определяет токсичность и некоторые другие фармакологические характеристики препаратов [1]. Разрабатываемые нами композиции планируется использовать в качестве терапевтических систем для лечения гнойно-некротических и ожоговых ран различной этиологии, а также в качестве косметических средств. Следовательно, при использовании этих препаратов в качестве раневых покрытий (перевязочных средств) необходимо учитывать взаимодействие иммобилизованных веществ и носителей с белками плазмы крови.

Действию биологически активных веществ, входящих в состав плазмы крови, на ферментативную активность немодифицированных и иммобилизованных ферментов посвящено большое количество исследований [2, 20]. Иммобилизация, как следует из опубликованных и собственных данных авторов, предохраняет модифицированный фермент от инактивирующего действия белков плазмы крови и многих других белковых ингибиторов.

В первой фазе раневого процесса патогенетически обоснованно применение тех или иных протеолитических ферментов, которые ускоряют очищение раны от гнойно-некротического содержимого и способствуют более раннему появлению грануляций и эпителизации. Во второй фазе этого процесса угнетение активности протеолитических ферментов в ране с помощью ингибиторов является патогенетически обоснованным, стимулирующим процессы регенерации в ране, в несколько раз сокращает сроки заживления.

Во ВНИ и испытательном институте медицинской техники (г. Москва), проводивших исследования наших перевязочных материалов на основе целлюлозы, содержащих разнообразные ФАС, в том числе поливалентный ингибитор протеиназ, ферменты и разнообразные ферментные комплексы, было установлено отсутствие цитотоксического эффекта (на половых клетках крупного рогатого скота) и гемолитической активности экстрактов из материалов и изделий [1]. Санитарно-химические

испытания экстрактов из наших текстильных материалов продемонстрировали химическую стабильность (изменение рН водной вытяжки, содержание восстановительных примесей, органических соединений).

Таким образом, проведенные химические, биохимические, физические и биофизические исследования показали, что раневые покрытия, в состав которых входят рассмотренные иммобилизованные биологически активные вещества, обладают достаточными для раневых покрытий механическими и гигиеническими свойствами, а по показателям нетоксичности могут быть с успехом использованы в клинике для лечения ран и ожогов различной этиологии.

На основе проведенных экспериментов были разработаны препараты, на данный момент выпускаемые серийно.

Салфетка с трипсином «Протеокс-Т» ТУ 9393-011-05824192-2003

Представляет собой биосистему, состоящую из модифицированной целлюлозы, на которую иммобилизован протеолитический фермент трипсин. Связь фермента с носителем оставляет интактным активный центр фермента и, таким образом, не затрагивает его действие на субстрат. Благодаря наличию химической связи препарат обладает пролонгированным действием до 72 часов. Салфетка обладает мощным протеолитическим действием, ускоряет процессы регенерации и полностью атравматична (эффект «неприклеивания»). Салфетка с трипсином «Протеокс-Т» — это четырехслойная аппликация из ДАЦ с присоединенным к ней ферментом трипсином. Не обладает антигипоксическим действием, но имеет выраженный дренирующий эффект за счет материала носителя.

Салфетка с трипсином и мексидолом «Протеокс-ТМ» ТУ 9393-010-05824192-2003

Представляет собой биологически активный лечебный материал на основе медицинской марли в форме ДАЦ. Мексидол — структурный аналог витаминов группы В, является антиоксидантом, т. е. ингибитором свободнорадикальных процессов. Оказывает выраженное антигипоксическое действие и эффективен при разных видах гипоксии. Введение в молекулу ДАЦ двух биологически активных веществ разных классов обеспечивает пролонгированное антиоксидантное и протеолитическое действие. В период нахождения в ране салфетка должна сохранять влажность, что обеспечивает проявление специфической активности входящих в нее компонентов и исключает прилипание к раневой поверхности.

Повязка с трипсином «Пам-Т» ТУ 9393-012-05824192-2003

Повязка атравматическая с трипсином «ПАМ-Т» является многослойным медицинским материалом. Лечебный прилегающий к ране слой представляет собой лекарственный препарат Дальцекс-трипсин, соответствующий требованиям фармакопейной статьи Министерства здравоохранения Российской Федерации ФС 42-3008-99. Достоинство полученного материала заключается в возможности использования минимального количества лекарственного препарата, способного длительно взаимодействовать с раной.

Впитывающий слой представляет собой медицинский не прилипающий к ране адсорбирующий материал Сион LN 004 0. Материал производится компанией «Сион» (Израиль), его международное название — International nonproprietary name (INN) — впитывающий слой. По российской терминологии он представляет собой текстильный композит. Сион LN 004 0 изготовлен из нетканого материала, с обеих сторон покрытого перфорированной полиэтиленовой пленкой. По международной классификации это материал для медицинских салфеток и повязок: класс 510К, ОТС. Основная область применения — экстремальная медицина или медицина катастроф. Вес материала — 260 ± 10 г/м². Впитывающая способность — более 800,0 % за 1 с. Материал имеет Европейский классификационный номер EN 4 6002 CE и номер Израильского института стандартов SI ISO 9000. Лечебный и впитывающий слои повязки Дицетромат-И соединены между собой двухугольным трехниточным цепным стежком.

Повязка «ПАМ-Т» закрывает рану, при помощи лечебного слоя расщепляет денатурированные гнойно-некротические массы и активно впитывает раневое отделяемое благодаря впитывающему слою. Использование повязки «ПАМ-Т» в два раза сокращает сроки очищения раны по сравнению с традиционными способами лечения. На полный курс лечения сложной гнойно-некротической раны требуется 1-3 повязки «ПАМ-Т».

Изделия атравматичны, они легко снимаются с поверхности или вынимаются из глубины раны, не травмируя живые ткани и не вызывая болевых ощущений при смене повязки.

Повязка с трипсином и лизоцимом «Пам-ТЛ» ТУ 9393-013-05824192-2003

В фармакопее России известно два бактериолитических фермента: лизоцим яичного белка и лизоамидаза, которая является ферментным комплексом микробного происхождения. Лизоцим — наиболее изученный фермент как среди представителей своего класса (гидролаз), так и среди ферментов вообще. Лизоцим оказывает влияние

на стимуляцию Т-лимфоцитов, есть данные о стимулирующем действии лизоцима на синтез антител, фермент участвует в регуляции проницаемости тканевых барьеров, клеточной дифференцировке. Лизоцим относится к классу гидролаз, подклассу гликозидаз и катализирует гидролиз 1,4-связей между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина в мукополисахаридах и мукопептидах. Это фермент бактериолитического действия, и реакции, катализируемые им, приводят к деградации бактериальной клеточной стенки. Лизоцим оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие на рост и развитие бактерий. К нему чувствительны стафилококки, стрептококки, протей.

При местной лизоцимотерапии было отмечено быстрое освобождение раневой поверхности от остатков некротических тканей, уменьшение количества гнойного отделяемого, ускорение эпителизации ран. При длительно незаживающих гнойных ранах и трофических язвах наблюдается значительное снижение содержания лизоцима в сыворотке крови, что говорит об ослаблении неспецифической резистентности и отрицательно сказывается на процессах регенерации. Все это свидетельствует о необходимости применения лизоцима для лечения ран.

Все вышесказанное относится к нативной форме лизоцима, и она обладает всеми недостатками нативных ферментов, для устранения которых и с целью создания препаратов пролонгированного действия используется вышеуказанный метод химической иммобилизации ферментов на полимерных носителях.

Повязка с трипсином и лизоцимом «ПАМ-ТЛ» предназначена для лечения гнойно-некротических ран и обладает ярко выраженным антибактериальным и некролитическим действием.

Повязка «ПАМ-ТЛ» изготавливается в виде трехслойной текстильной композиции размером 10 x 10 см. Прилегающий к ране лечебный слой изготавливается из ДАЦ с соиммобилизованными ферментами трипсином и лизоцимом. Ферменты присоединены к материалу-носителю различными связями. Протеолитическая активность лечебного слоя повязки — не менее 0,1 ПЕ/г воздушно-сухого материала. Бактериолитическая активность — не менее 10 ЛЕ/г воздушно-сухого материала. Остаточная влажность — не более 10,0 %. Цвет от белого до кремоватого, без запаха. Второй, впитывающий экссудат, слой изготавливается из нетканого медицинского полотна в соответствии с ТУ-17-14-283-87. Третий слой, защитный, изготавливается из полиэтиленовой пленки.

Повязка предназначена для лечения гнойно-некротических ран различной этиологии,

обладает пролонгированным протеолитическим и бактериолитическим действием. Ее применение предупреждает инфицирование раны, способствует отторжению некротизированных тканей, разжижению гноя и его эвакуации, улучшает процесс регенерации тканей. В отличие от нативных препаратов, иммобилизованные трипсин и лизоцим в меньшей степени инактивируются ингибиторами, не уносятся током экссудата, не проникают в органы и ткани и, следовательно, не вызывают аллергических реакций.

Особенно эффективны такие повязки при первичном закрытии ран с высокой микробной обсемененностью, таких как колотые и резаные раны, ожоги, минно-осколочные и пулевые раны. Благодаря особенностям своего химического строения повязки способны оказывать профилактическое и лечебное воздействие на рану в течение 72 часов, при этом они атравматичны, т. е. во влажном состоянии не прилипают к раневой поверхности.

Аппликация Мультиферм ТУ 9393-025-05824192-2006

Обладает протеолитической, эластолитической и коллагенолитической активностью. Входящие в состав макромолекулы сополимера хитозана и многокомпонентный протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба обеспечивают изделию широкий спектр терапевтической активности. Протеолитическое действие приводит к очищению поврежденной поверхности от некротизированных

тканей, эластолитическая и коллагенолитическая активности протеолитического комплекса, а также присутствие хитозана способствуют процессам регенерации и препятствуют формированию рубца. Впитывающий слой сорбирует раневое отделяемое и косвенным образом способствует понижению микробной обсемененности. Повязки удобны в применении и существенно облегчают труд медицинского персонала. Расход дорогих и дефицитных лекарственных средств сокращается в 10–30 раз по сравнению с использованием тех же веществ в нативном виде. Показания к применению аппликации: заживление и эпителизация вялотекущих язвенно-некротических процессов у лежачих больных, лечение трофических язв на фоне сахарного диабета.

Медико-биологические исследования

Все медико-биологические данные были получены под руководством профессора Толстых П. И. (ФГУ ГНЦ Лазерной медицины Росздрава, г. Москва) в отделе медико-биологических исследований.

Лечение животных начинали через 48 часов после появления гнойного воспаления. На рану накладывали повязку, увлажняли физиологическим раствором. Перевязочный материал меняли в течение первых нескольких суток ежедневно до очищения раны. После очищения раны на нее накладывали ежедневно сменяемую медицинскую марлю, увлажненную физиологическим раствором [1]. Для лечения в стадии экссудации использовали следующие перевязочные материалы:

Таблица 1. Результаты лечения гнойных ран у крыс с использованием иммобилизованных протеиназ
Tabl.1. Results in treatment of purulent wounds in rats by using immobilized proteinases

Материал и метод лечения Material and treatment method	Срок, сутки Term, twenty-four hours		Ускорение заживления Acceleration of healing processes
	очистения раны wound cleansing	полного заживления full cleansing	%
Без лечения (контроль) Without treatment (control)	14,9 ± 0,8	27,2 ± 0,2	—
Медицинская марля Medical gauze	11,6 ± 0,7	23,7 ± 0,5	12,9
ДАЦ-трипсин DAC-trypsin	7,1 ± 0,5	19,1 ± 0,5	29,8
ДАЦ-коллитин DAC-collitin	4,9 ± 0,5	15,1 ± 1,3	44,5
Аппликация «ДАЦ-Хт-ПК» Application «DAC-Cht-PC»	3,0 ± 0,2	12,1 ± 0,1	55,5
Местное применение 0,1 % раствора трипсина Local appliance of 0,1 % trypsin solution	8,5 ± 0,4	21,6 ± 0,4	20,6
Местное применение 0,1 % раствора коллитина Local appliance of 0,1 % collitin solution	7,8 ± 0,5	21,2 ± 0,3	22,1

1) ДАЦ-трипсин — трипсин, иммобилизованный на ДАЦ, ПА 0,2 ПЕ/г;

2) ДАЦ-коллитин (коллитин, иммобилизованный на ДАЦ), ПА 0,2 ПЕ/г;

3) ДАЦ-Хт-ПК: степень модификации ДАЦ — 0,75 мгЭкв/г; содержание хитозана 5,0 мг/г, содержание ПК 8,0 мг/г;

4) ПА (субстрат казеин по Гаммерстену) — 0,4 ПЕ/г, рН водной вытяжки 7,8, влажность 4,8 %.

В контрольных группах использовали медицинскую марлю, смоченную 0,1 % раствором фермента. Полученные данные приведены в табл. 1.

В экспериментах на крысах было показано, что под влиянием нового материала значительно ускоряется течение раневого процесса, что выражается в сокращении средней продолжительности некролиза ткани и сроков заживления экспериментальных гнойных ран. Как видно из приведенных выше данных, использование иммобилизованных ферментов на 30–40 % увеличивало скорость заживления раны и было эффективнее, чем применение растворов ферментов.

Анализ сроков очищения ран от гнойно-некротических масс и сроков полного заживления показал, что иммобилизованные формы ферментов значительно эффективнее в лечении по сравнению с соответствующими нативными препаратами [1, 2, 8]. Это объясняется тем, что нативные (немодифицированные) ферменты быстро инактивируются и смываются раневым отделяемым, в то время как иммобилизованные препараты более

стабильны и обладают пролонгированным действием.

Введение в комплекс лечебных мероприятий биологически активных материалов, содержащих иммобилизованные протеиназы, значительно стимулирует макрофагальную реакцию, активирует биосинтетическую функцию фибробластов, ангиогенез и фибриллогенез, способствует более быстрому созреванию грануляционной ткани и ее фиброзной трансформации [1, 2, 8, 21].

По данным проведенных клинических, планиметрических и морфологических исследований препараты иммобилизованных протеиназ значительно превосходят традиционные методы по эффективности при лечении трофических язв венозного генеза, что позволяет сократить сроки санации патологических очагов и эпителизации язв в 1,5–2 раза [21].

Заключение

Разработанные нами материалы могут быть использованы в виде аппликаций, ваты, корпии или порошка, как перевязочные или косметологические средства для лечения пролежней, гнойно-некротических, ожоговых и других ран. Для стерилизации иммобилизованных биологически активных веществ мы используем гамма-излучение в дозе 25 кГрей при 293 К. Выпускаемые медицинские изделия являются раневыми покрытиями нового типа. Они позволяют снизить лекарственную нагрузку (до 10–30 раз) и сокращают сроки заживления экспериментальных ран в 1,5–2 раза, не вызывая аллергических реакций.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Белов А.А. Разработка промышленных технологий получения новых медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически активные белковые вещества. Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук. М.: РХТУ, 2009. с. 385. [Belov A.A. *Industrial technologies development for the production of new medical materials based on modified fiber-forming polymers, containing biologically active protein substances. Degree dissertation for the Doctor of Technical Sciences, M., Russian University of Chemical Technology (RUCT), 2009. p. 385.*]

2. Назаренко Г.И. Рана. Повязка. Большой. М.: Медицина, 2002. 472 с. [Nazarenko G.I. *Wound. Bandage. The patient. Moscow: Medicine, 2002. p. 472.*]
3. Boateng J. S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. of Pharmaceutical Sciences*. 2008, 97(8):2892-2923.
4. Биологически активные перевязочные средства в комплексном лечении гнойно-некротических ран. Методические рекомендации. № 2000/156. Мин. Здрав. РФ. М.: 2000, 37 с. [Biologically active dressings in the complex treatment of purulo-necrotic wounds.

Guidelines. № 2000/156. Health Ministry of The Russian Federation. Moscow, 2000, p. 37.]

5. Simona Strnad, Olivera Šauperl and Lidija Fras-Zemlji ch. 9 - Cellulose fibres functionalised by chitosan: characterization and application in Biopolymers Ed. by M. Elnasha. 2010, p. 181-200.

6. Легонькова О.А., Васильев В.Г., Асанова Л.Ю. Исследование эксплуатационных свойств полимерных перевязочных средств. Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. 2015, 2 (2): 32-39. [Legon'kova O.A., Vasil'ev V.G., Asanova L.Yu. *Investigation of polymeric wound*

- dressings' operational properties. Wounds and Wound Infections. The Prof. B. M. Kostyuchenok Journal = Rany' i ranevy'e infekcii. Zhurnal im. prof. B. M. Kostyuchyonka. 2015, 2 (2): 32-39 (In Russ.)]*
7. Роговин З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия. 1972, с. 125-244 [Rogovin Z.A. *Cellulose chemistry, Moscow: Chemistry. 1972, p. 125-244]*
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства, М.: Новая волна. 2012, 1216 с.
[Mashkovskiy M.D. *Medicines, Moscow: New Wave. 2012, p. 1216]*
9. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar Anal. Chem., 1959, 31 (3): 426-428.
10. Досадина Э.Э., Савельева Е.Е., Евдокименко А.Ю. и др. Биомедицинские материалы с пролонгированным действием на основе модифицированной целлюлозы. Бутлеровские сообщения. 2017, 50 (5): 109-117. [Dosadina E.E., Savelyeva E.E., Evdokimenko A.Y. and others *Biomedical materials with prolonged action based on modified cellulose. Butlerov's Communications = Butlerovskie soobshheniya. 2017, 50 (5): 109-117 (In Russ.)]*
11. Dosadina E.E., Savelyeva E.E., Belov A.A. The effect of immobilization, drying and storage on the activity of proteinases immobilized on modified cellulose and chitosan// Process Biochemistry. 2018, 64 (1):213-220 doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.002
12. Dosadina E. E., Kulmetyeva M.A., Belov A. A. The changing of enzymatic activity of hydrolases immobilized on natural polysaccharide matrix for purulent and burn wounds treatment during storing and exploitation. Biointerface research in applied chemistry. 2016, 6 (3): 1291-1298.
13. Белов А.А., Игнатюк Т.Е., Рыльцев В.В., Филатов В.Н.; А.С. № 1773067 СССР, МКИЗ А 61 L15/38. Способ получения перевязочных целлюлозных материалов, содержащих иммобилизованный трипсин / № 4774863/05; заявление: 24.11.89; зарегистрировано: 01.07.92. [Belov A.A., Ignatyuk T.E., Ryltsev V.V., Filatov V.N.; A.S. № 1773067 USSR, MKI3 A 61 L15/38. Method for obtaining cellulose dressing materials containing immobilized trypsin / № 4774863/05; claimed 24.11.89; registered 01/07/1992].
14. Рыльцев В.В., Игнатюк Т.Е., Филатов В.Н., Стекольников Л.И., Пронин В.И., Толстых П.И., Гостищев В.К., Арутюнян Б.Н., Вельшер Л.З., Белов А.А.; А.С. №1683323 СССР, МКИЗ А 1. Способ получения перевязочного материала, содержащего фермент / № 4721644/13; заявление: 20.06.89; зарегистрировано: 08.06.91. Не подлежит публикации. [Ryltsev V.V., Ignatyuk T.E., Filatov V.N., Stekolnikov L.I., Pronin V.I., Tolstykh P.I., Gostishchev V.K., Arutyunyan B.N., Velsher L.Z., Belov A.A.; A.S. № 1683323 USSR, MKI3 A 1. Method for obtaining a dressing that contains an enzyme / № 4721644/13; claimed 20.06.89; registered 08.06.91. Not subject to publication].
15. Грачев С.В., Кассин В.Ю., Воробьева В.М., Павлова Л.А., Белов А.А., Рыльцев В.В., Игнатюк Т.Е., Филатов В.Н. Патент: 2108077 РФ, МКИЗ С2. Способ получения перевязочного материала. Заявитель и патентообладатель Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова - № 93033732; заявление: 30.06.93; опубликовано: 10.04.98 [Grachev S.V., Kassin V.Y., Vorobyova V.M., Pavlova L.A., Belov A.A., Ryltsev V.V., Ignatyuk T.E., Filatov V.N.; № 2108077 RF, MKI3 C2. Method for obtaining dressing material. Applicant and patent holder is Moscow medical Academy named after I. M. Sechenov. № 93033732; claimed 30.06.93; published 04.10.98].
16. Промоненков В.К., Бурмака В.В., Рыльцев В.В., Филатов В.Н., Медушева Е.О., Белов А.А., Филатов Н.В., Толстых П.И., Толстых М.П., Мельниченко В.И., Петушков Д.В. Патент № 2203684 РФ, МКИЗ С2. Способ получения перевязочного материала. Заявители и патентообладатели ГУП НИИ текстильных материалов, ГНЦ лазерной медицины, ООО Тринити фарма. № 2000128812; заявление: 20.11.2000; опубликовано: 10.05. 2003 [Promononkov V.K., Burmaka V.V., Ryltsev V.V., Filatov V.N., Medusheva E.O., Belov A.A., Filatov N.V., Tolstykh P.I., Tolstykh M.P., Mel'nichenko V.I., Petushkov D.V. // № 2203684 RF, MKI3 C2. Method for obtaining dressing material / Applicants and patent holders are the State Unitary Enterprise Research Institute of Textile Materials, SRC of Laser Medicine, Trinity Pharmaceuticals Ltd. - № 2000128812; claimed 20.11.2000; published 10.05.2003].
17. Белов А.А., Филатов В.Н., Белова Е.Н., Филатов Н.В. Медицинская повязка, содержащая комплекс протеолитических ферментов, включая коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса краба // Заявители и патентообладатели авторы № 2003111997; заявление 25.04.03; опубликовано 27.01.06 (Патент: 2 268 751 РФ, МКИЗ С2). [Belov A.A., Filatov V.N., Belova E.N., Filatov N.V. / № 2 268 751 RF, MKI3 C2. Medical dressing containing a complex of proteolytic enzymes includes collagenolytic proteases from the crab hepatopancreas. Applicants and patent holders are authors - № 2003111997; claimed 25.04.03; published 27.01.06].
18. Белов А.А., Филатов В.Н., Белова Е.Н. Медицинская повязка, содержащая комплекс ферментов из гепатопанкреаса краба, и способ ее получения. Заявители и патентообладатели авторы № 2006105155; заявление 21.02.06; опубликовано 10.05.08 (Патент: 2 323 748 РФ, МКИЗ С2). [Belov A.A., Filatov V.N., Belova E.N. / № 2 323 748 RF, MKI3 C2. Medical dressing containing a complex of enzymes from the crab hepatopancreas and the method for its production // Applicants and patent holders are authors - № 2006105155; claimed 21.02.06; published 10.05.08].
19. Белов А.А., Филатов В.Н., Белова Е.Н., Казанская Н.Ф. Изменение протеолитической активности трипсина иммобилизованного на альдегидсодержащие текстильные носители в процессе иммобилизации и хранения. Вестник МГУ, серия 2. Химия. 2006, 47 (2): 87-90. [Belov A.A., Filatov V.N., Belova E.N., Kazanskaya N.F. Changes in the proteolytic activity of trypsin immobilized on aldehyde-containing textile carriers during immobilization and storage, Herald MSU, part 2, Chemistry = Vestnik MGU, seriya 2. Ximiya. 2006, 47 (2): 87-90. (In Russ.)].
20. Белов А.А., Белова Л.А., Филатов В.Н. и др. Взаимодействие ингибиторов протеиназ плазмы крови с иммобилизованным на диальдегидцеллюлозе протеолитическим комплексом из гепатопанкреаса краба. Вестник МГУ, серия 2. Химия. 2003, 44 (1): 16-19. [Belov A.A., Belova L.A., Filatov V.N. and others Interaction of plasma proteinase inhibitors with proteolytic complex immobilized on dialdehyde cellulose of crab hepatopancreas. Herald MSU, part 2, Chemistry = Vestnik MGU, seriya 2. Ximiya. 2003, 44 (1): 16-19. (In Russ.)].
21. Луцевич О.Э., Толстых П.И., Медушева Е.О. и др. Современные биологически активные раневые покрытия и окклюзионные повязки в комплексном лечении больных с трофическими язвами нижних конечностей венозного генеза. Хирург. 2011, (1):13-18. [Lutsevich O.E., Tolstykh P.I., Medusheva E.O. and others Modern biologically active wound coverings and occlusive dressings in the complex treatment of patients with lower limbs trophic ulcers of the of venous genesis. Surgeon = Xirurg. 2011, (1):13-18. (In Russ.)].