

Введение При контакте природных полимеров с ферментативными средами происходит процесс их ферментативного разложения (биодеструкции) [1]. Например, биодеструкция хитозана, полимера, имеющего огромные перспективы для создания материалов медицинского назначения, протекает как процесс гидролиза макроцепей по β -гликозидным связям. Очевидно, что самыми подходящими из ферментов для осуществления процесса ферментативного гидролиза хитозана являются специфические для хитозана ферменты-хитиназы и хитозаназы, которые приводят к получению олигосахаридов со степенью полимеризации 2-5 [2]. Однако, в условиях медицинского применения хитозановых материалов их биоразрушение может происходить только под действием неспецифических ферментов [3,4], поскольку в человеческом организме отсутствуют и хитиназы, и хитозаназы. Изучение кинетических закономерностей процесса биодеструкции в конечном счете приводит к прогнозированию времени жизни полимера в соответствующих условиях функционирования [1]. И если закономерности процесса биодеструкции в растворе, в том числе и для хитозана, достаточно хорошо изучены [4-7], вопрос об особенностях ферментативного разрушения монолитных (пленочных) образцов, остается практически открытым, что и определило цель данной работы. Экспериментальная часть Для исследования использовали образец хитозана производства ЗАО «Биопрогресс» (Щелково, Россия) с молекулярной массой $M_{sh}=113000$. В качестве ферментного препарата использовали гиалуронидазу («Лириза») производства ЗАО «Микроген» (Москва, Россия). Концентрация ферментного препарата во всех экспериментах составляла 0,3 г/л. В качестве растворителя использована 1% уксусная кислота. Концентрация хитозана в растворе при проведении процесса ферментативного гидролиза ($Chyd$) варьировалась от 0,1 до 5 г/дл. Характеристическую вязкость хитозана $[h]$ в растворе уксусной кислоты определяли методом Иржака и Баранова [8] по тангенсу угла наклона на начальном участке кривой зависимости логарифма относительной вязкости $\ln h_{rel}$ от концентрации хитозана в растворе C , позволяющим исключить влияние эффекта полиэлектролитного набухания при определении вязкости [9]. Для определения значений исходной характеристической вязкости хитозана использовали раствор с концентрацией $C = 0,15$ г/дл. Для используемого в работе образца хитозана в 1% уксусной кислоте значение исходной характеристической вязкости образца, не подвергнутого биодеструкции, составляло $[h]_0 = 7,8$ дл/г. В экспериментах по определению значений характеристической вязкости хитозана в ходе ферментативного гидролиза $[h]_t$, раствор хитозана в уксусной кислоте, к которому был добавлен раствор ферментного препарата, выдерживали в течение определенного времени при температуре $36^\circ C$, после чего процесс биодеструкции останавливали кипячением исходного раствора в течение 30 минут на водяной бане. Далее, из раствора исходной концентрации $Chyd$

готовили разведением раствор для определения характеристической вязкости с концентрацией $C = 0,15$ г/дл. Для всех использованных концентраций хитозана при небольших временах деструкции (30-40 минут) зависимости уменьшения характеристической вязкости от времени имели линейный характер. Именно на этом участке определяли значение начальной скорости ферментативного гидролиза V_0 , которое рассчитывали по формуле [10]: $V_0 = \frac{C \cdot \alpha}{K + C}$ (1) где C - концентрация хитозана, подвергающегося процессу ферментативного гидролиза в растворе (г/дл); t - время гидролиза, мин.; K и α – константы в уравнении Марка-Куна-Хаувинка. Для определения констант K и α , необходимых для вычисления значений начальной скорости ферментативного гидролиза по уравнению (1) в 1% уксусной кислоте, образец исходного хитозана был расфракционирован на 10 фракций в диапазоне значений молекулярных масс от 20000 до 150000 Да. Абсолютное значение молекулярных масс фракций хитозана было определено сочетанием методов скоростной седиментации и вискозиметрии. Значение констант в уравнении Марка-Куна-Хаувинка в нашем случае составило $\alpha = 1,02$ и $K = 5,57 \cdot 10^{-5}$. Пленки хитозана получали методом полива 2% раствора хитозана на поверхность стекла в чашке Петри. Для изучения процесса биодеструкции пленок, из пленки по шаблонам вырезали образец с линейными размерами a и b . Толщину пленок поддерживали постоянной, равной 100 мкм. Точный объем пленочного образца рассчитывали исходя из значений массы и плотности пленки. Плотность пленочного образца хитозана, полученного из 1% уксусной кислоты, определяли пикнометрическим методом, которая для изучаемого нами образца хитозана составила $\rho = 1,37 \pm 0,03$ г/см³. Для проведения эксперимента, моделирующего процесс биодеструкции хитозана на раневой поверхности, пленочный образец хитозана помещали на подложку, смоченную раствором ферментного препарата в 1% уксусной кислоте, и выдерживали в течение определенного времени при постоянной температуре (36°C). Объем раствора ферментного препарата (0,05 мл) выбирали исходя из условия, чтобы только одна из поверхностей пленки соприкасалась с раствором фермента. После выдержки, процесс ферментативного гидролиза останавливали дезактивацией фермента кипячением в течение 30 минут на водяной бане. Далее пленку растворяли в 1% уксусной кислоте и определяли текущее значение характеристической вязкости полимера $[\eta]_t$. Обсуждение результатов. Задача определения скорости процесса в случае хитозана сводится к определению изменений во времени значений характеристической вязкости полимера, происходящих вследствие разрыва макроцепей при взаимодействии хитозана с ферментным препаратом. Как видно из данных рисунка 1, и в случае пленки, и в случае растворов хитозана, увеличение времени контакта хитозана с ферментом сопровождается уменьшением характеристической вязкости, что свидетельствует об уменьшении его молекулярной массы. При этом в обоих случаях зависимости

линейны на начальном этапе реакции. В случае раствора наблюдаемые зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза, рассчитанные по уравнению (1), от концентрации хитозана в растворе (рис. 2) хорошо описываются в рамках схемы Михаэлиса-Мэнтен. Рис. 1 - Зависимость характеристической вязкости хитозана, выделенного из пленочного образца (1) и из раствора (2,3) с концентрацией хитозана в растворе 0,5 (2) и 1,0 (3) г/дл от времени экспозиции с раствором ферментного препарата. Значение константы Михаэлиса, определенное графическим методом Лайнуивера-Берка[11], составило 3,42 г/дл, значение максимальной скорости ферментативного гидролиза V_{max} , определяющей максимальную возможность образования продукта реакции при данной концентрации фермента в условиях избытка субстрата, составило $1,50 \cdot 10^{-6}$ мин⁻¹. Значение параметра V_{max}/K_m , имеющего физический смысл константы скорости процесса биодеструкции, составило $V_{max}/K_m = 0,44 \cdot 10^{-6}$ (дл/г) × мин⁻¹. Именно прямой с наклоном V_{max}/K_m . Аппроксимируется зависимость скорости ферментативного гидролиза V_0 от концентрации субстрата на начальном этапе. Рис. 2 - Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза хитозана от его концентрации в растворе. В самом первом приближении задачу описания кинетики деструкции пленки можно представить как определение скорости деструкции в растворе с концентрацией хитозана (г/дл), соответствующей концентрации поверхностных звеньев в объеме раствора фермента, т.е.: $V_0 = \frac{m_s}{V_{sol}} \cdot k$ (2) где m_s - масса мономерных звеньев хитозана на поверхности пленки, г; V_{sol} - объем раствора ферментного препарата, с которым контактирует пленка, дл. Для оценки массы мономерных звеньев хитозана на поверхности пленки использованы следующие рассуждения. Зная массу m_f пленочного образца, можно рассчитать число мономерных хитозановых звеньев n_{unit} , приходящихся на весь объем пленки: (3) где M_{unit} - молекулярная масса звена хитозана; N_A - число Авогадро. Допустим, что мономерное звено хитозана вписано в куб с гранью d . Объем, занимаемый мономерным звеном в объеме пленки, равен $v_{unit} = V_f / n_{unit}$, где V_f - объем пленочного образца. Отсюда, размер грани $d = (v_{unit})^{1/3}$. Теперь можно оценить, сколько мономерных звеньев n_{unit} , каждое из которых занимает площадь $s_{unit} = d^2$, размещается на поверхности пленки с площадью S_f , контактирующей с раствором ферментного препарата (4) Определив n_{unit} , можно найти искомую величину c_s . Таким образом, варьируя размер пленочного образца, можно получить ряд пленок с различной концентрацией c_s звеньев хитозана и определить для них значение скорости процесса биодеструкции по уравнению (1) (рис.3). Рис. 3 - Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза хитозана от поверхностной концентрации звеньев хитозана в пленочных образцах. Обращает на себя внимание тот факт, что значение тангенса угла наклона на зависимости скорости ферментативного гидролиза хитозана в растворе V_0 от концентрации субстрата на начальном этапе (рис.1) и

зависимости скорости ферментативного гидролиза хитозана в пленках от поверхностной концентрации хитозана, совпадают и составляют $V_{\max}/K_m = 0,44 \cdot 10^{-6} \text{ (дл/г)} \cdot \text{мин}^{-1}$. Таким образом, можно считать доказанным, что, несмотря на то, что процесс биодеструкции подвергается монолитный пленочный образец, деструкция пленки подчиняется тем же закономерностям, что и ферментативный гидролиз в растворе при малых концентрациях субстрата. Выводы 1. Впервые определены кинетические параметры процесса ферментативного гидролиза хитозана под действием гиалуронидазы, а именно значение константы Михаэлиса $K_m = 3,42 \text{ г/дл}$ и значение максимальной скорости ферментативного гидролиза $V_{\max} = 1,50 \cdot 10^{-6} \text{ мин}^{-1}$; 2. Показано, что ферментативный гидролиз пленочных образцов, полученных из раствора, подчиняется тем же кинетическим закономерностям, что и биодеструкция хитозана в растворе при малых концентрациях субстрата.