

Е.В. Зиновьев¹, Р.Р. Рахматуллин², А.В. Апчел¹,
К.Ф. Османов¹, И.А. Алмазов¹, А.А. Сулица¹

Биопластические дерматотерапевтические системы на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Оренбургский государственный университет, Оренбург

Резюме. Разработана технология получения стабильной субстанции полимера на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса, используя методику макромолекулярного фотопринтирования. Способность гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса формировать новые типы функциональных химических связей в гидрогеле изучена с помощью абсорбционной спектроскопии путем оценки инфракрасных спектров поглощения. Последние позволили подтвердить наличие новых типов функциональных связей в полимере. Обнаружены две полосы поглощения гидрогеля с максимумами на длине волн 218 и 270 нм, что прямо опосредовано составом пептидных компонентов. С ростом концентрации гиалуроновой кислоты в водном растворе максимум поглощения смещался в длинноволновую область спектра, положение второго максимума на длине волны 270 нм существенно не изменялось. Именно на этой стадии происходит формирование фотохимических сшивок, пространственное сближение реакционно-способных групп. В этом процессе активная роль принадлежит функциональным химическим группам пептидного комплекса (прежде всего, аминокислоте десмозин). В итоге система ковалентных и лабильных связей формирует организованный пластинчатый каркас субстанции. Показано, что гидрогель гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса может служить основой для разработки новой фармацевтической технологии биопластических дерматотерапевтических систем.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, пептидный комплекс, макромолекулярное фотопринтирование, абсорбционная спектроскопия, химические связи, виды колебаний, биопластические дерматотерапевтические системы.

Введение. Одним из перспективных направлений современной фармакологии и биотехнологии признается разработка новых фармацевтических субстанций с депо-эффектом лекарственных веществ, разнообразностью которых являются трансдермальные терапевтические системы [1, 2, 4, 9]. Под ними понимают своеобразную лекарственную форму для наружного применения в виде пластырей или полимерных плёнок, способную пролонгированно высвобождать в зоне аппликации лекарственное средство, обеспечивая его постоянную терапевтическую концентрацию в подлежащих тканях и кровотоке [8, 12–16]. В настоящее время такие системы разрабатываются в основном для применения на интактных кожных покровах [1, 2, 8, 9, 13, 16, 17]. Применение таких систем в условиях раневого процесса в литературе не представлено. Не вызывает сомнения, что для оптимизации репаративной регенерации, быстрого неосложненного заживления ран патогенетически оправдано местное применение ранозаживляющих рецептур и субстанций, обеспечивающих постоянное дозированное поступление активного действующего начала лекарственных препаратов в рану. При этом важно, чтобы сама субстанция выполняла роль биологического раневого покрытия – биопластического материала, оказывающего сложное и многоплановое

воздействие на рану, способного защищать ее от инфицирования, предотвращать потери жидкости, поддерживать температурный оптимум, газохимический баланс подлежащих тканей и направленно стимулировать процессы репаративной регенерации. Разработка подобных субстанций находится на стыке фармакологии, дерматологии, биотехнологии и регенеративной медицины. С учетом рассмотренных свойств и способа получения предложено их именовать как «биопластические дерматотерапевтические системы» (БДТС).

Цель исследования. Разработать методику создания БДТС на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты (ГК) и пептидного комплекса (ПК) и экспериментально оценить ее свойства.

Материалы и методы. Материалом исследования служила рецептурная смесь гидрогеля ГК и ПК. Электронные спектры гидрогеля изучались с помощью абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом (УФ), видимом и ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне спектра с использованием спектрофотометра «Shimadzu UV-3600» (Япония) [2, 6, 7]. Аппарат использовался в спектральном и фотометрическом режимах работы, спектральный диапазон составил 185–3300

нм с разрешением $\pm 0,2$ нм в УФ/видимой области, $\pm 0,8$ нм в ближней ИК области; воспроизводимость по шкале длин волн $\pm 0,08$ нм в УФ/видимой области и $\pm 0,32$ нм в ближней ИК области, фотометрическая точность $\pm 0,003$ Abs. Подготовка проб гидроколлоида ГК и ПК для спектральных исследований осуществлялась по стандартной схеме в соответствии с технологической инструкцией спектрофотометра.

Структура разработанной субстанции полимера изучена с использованием методик светооптической микроскопии и гистохимически. Депарафинированные срезы для обзорных целей окрашивали гематоксилином Майера и эозином по Ван-Гизону, ШИК-позитивные вещества выявляли Шифф-реакцией по Мак-Манусу с докраской препаратов гематоксилином Гарриса [3].

В ходе исследований разработана технология макромолекулярного фотопечата гидроколлоида ГК и ПК. Рецептурное количество гидрогеля ГК-ПК способом тонкоплёночной разлики наносили на кварцевые фотопринт поверхности, которые помещали в ламинарный шкаф с источником широкополосного и лазерного (270 нм) излучения, где создавались условия «мягкой» лиофилизации, по истечении которых извлекается готовая субстанция.

Результаты исследований обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение. В качестве основного компонента разрабатываемой субстанции для БДТС была выбрана ГК – линейный несультатированный гликозаминогликан, неразветвленный поли-

сахарид, содержащий от 2000 до 25000 дисахаридных единиц D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединённых между собой бета-1,3 и бета-1,4-гликозидными связями [5, 13]. Как полианион, ГК гигроскопична, эффективно связывает молекулы воды и образует вязкий гидрогель. Для формирования БТС в гидрогель ГК добавляли рецептурное количество ПК (табл. 1).

Из данных таблицы 1 следует, что в ПК преобладают алифатические (лейцин, изолейцин, аланин, глицин) и полярные незаряженные аминокислотные остатки: треонин, пролин, гистидин, серин, а также полярные заряженные аминокислотные остатки: аргинин, глутамин, аспарагин, лизин. В комплексе присутствуют димеры изолейцинов, полимерные трипептиды, в том числе пептиды, содержащие ароматические аминокислотные остатки (триптофан) и полярные незаряженные аминокислотные остатки. В составе пептидного комплекса присутствует аминокислота десмозин (производная лизина), имеющая разветвленную структуру, которая способна одновременно образовывать четыре пептидные цепи.

При углубленной оценке спектра поглощения гидрогеля ГК и ПК были обнаружены две полосы поглощения с максимумами на длине волн 218 и 270 нм, что прямо опосредовано составом пептидных компонентов. С ростом концентрации ГК в водном растворе максимум поглощения смещался в длинноволновую область спектра, положение второго максимума на длине волны 270 нм существенно не изменялось (рис. 1).

Таблица 1

Химический состав пептидного комплекса

Компонент	Химическая формула	Масса, Да	Дельта массы в нанопотоковом режиме	Масса, отн. ед.
Глицин-триптофан-изолейцин	$C_{19}H_{26}N_4O_4$	374	-2,33	10,692
Изолейцин-аспарагин-изолейцин	$C_{16}H_{29}N_3O_6$	359	12,97	8,674
Фенилаланин-аргинин-пролин	$C_{20}H_{30}N_6O_4$	418	-0,29	9,024
Глутамин-гистидин-гистидин	$C_{17}H_{24}N_8O_5$	420	-5,74	17,732
Аланин-триптофан-лизин	$C_{20}H_{29}N_5O_4$	403	-5,76	8,934
Пролин-гистидин-тирозин	$C_{20}H_{25}N_5O_5$	415	-11,1	14,407
Триптофан-триптофан-триптофан	$C_{26}H_{29}N_5O_5$	491	-12,84	9,46
Лизин-фенилаланин-треонин	$C_{19}H_{30}N_4O_5$	394	-7,25	8,854
Лизин-аргинин-метионин	$C_{17}H_{35}N_7O_4S$	433	10,73	9,102
Фенилаланин-цистеин-метионин	$C_{17}H_{29}N_3O_4S_2$	399	4,19	11,108
Изолейцин-изолейцин	$C_{12}H_{24}N_2O_3$	244	8,67	11,038
Аспарагин-лизин-лизин	$C_{16}H_{31}N_5O_6$	389	16,59	8,863
Триптофан-пролин	$C_{16}H_{19}N_3O_3$	301	-18,38	10,672
Глутамин-треонин	$C_9H_{16}N_2O_6$	248	3,47	5,5
Десмозин	$C_{24}H_{40}N_5O_8$	526	-15,37	9,523

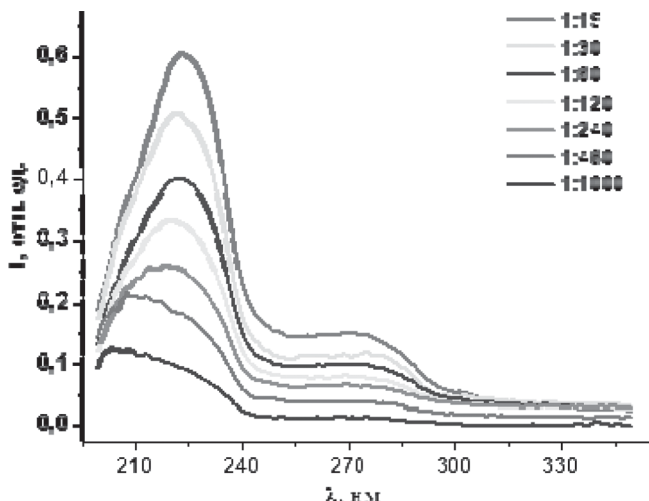


Рис. 1. УФ-спектры поглощения различных концентраций водных растворов гидроколлоида ГК и ПК

Облучение гидрогеля ГК и ПК на гидрофобных кварцевых фотопринт-поверхностях в условиях мягкой лиофилизации широкополосным УЗ- и УФ-лазером при длине волны 270 нм сопровождалось удалением излишков воды (рис. 2), данная технология обозначена нами термином «макромолекулярное фотопринтирование».

Именно на этой стадии происходит формирование фотохимических сшивок, пространственное сближение реакционно-способных групп. В этом процессе активная роль принадлежит функциональным химическим группам ПК (прежде всего, аминокислоте десмозин). В итоге система ковалентных и лабильных связей формирует организованный пластинчатый каркас субстанции (рис. 3).

При спектральном исследовании полученной субстанции и необлученного гидрогеля установлено наличие максимума в области 870 см^{-1} (рис. 4).

Известно, что при прохождении ИК-излучения через вещество происходит его поглощение на ча-



Рис. 3. БТС на основе гидрогеля ГК и ПК после макромолекулярного фотопринтирования

стотах, совпадающих с некоторыми собственными колебательными и вращательными частотами молекул [2, 3, 5]. Другими словами, каждый максимум на ИК-спектре отвечает колебаниям различных связей в соединении. Таким образом, в результате проведения так называемого макромолекулярного фотопринтирования происходит образование новых связей между функциональными группами молекул гидрогеля ГК и разработанного сложного ПК.

Для выяснения природы вновь образовавшихся химических связей в формирующемся гидрогеле данные соотносились с таблицей характеристических частот поглощения различных групп атомов (табл. 2).

Данные таблицы 2 позволяют заключить, что на частотах 870 см^{-1} могут проявлять себя валентные С–С колебания, симметричные и асимметричные С–О–С,

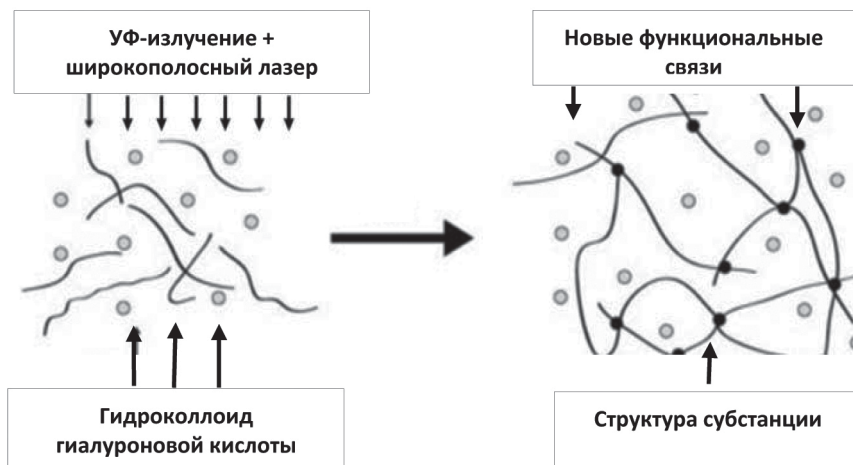


Рис. 2. Схема технологии УФ-структурирования гидрогеля ГК и ПК

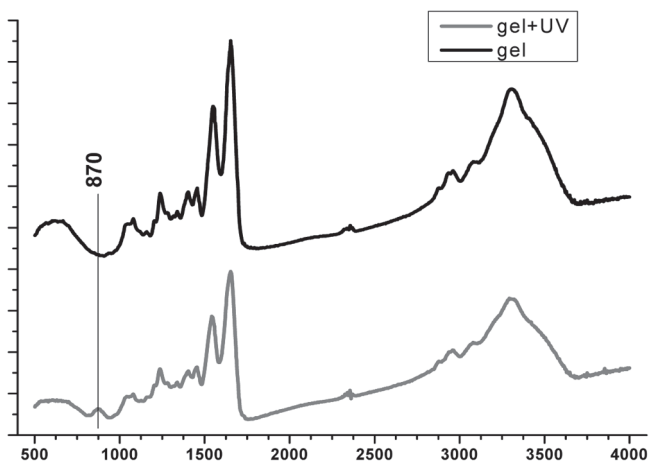


Рис. 4. ИК-спектры облученного и необлученного образцов гидрогеля ГК и ПК



Рис. 5. Структура гидроколлоида ГК с ПК. Окраска по Ван-Гизону, ув. ×400

Таблица 2
Характеристические частоты поглощения, виды колебаний функциональных групп и химических связей

Волновое число, см ⁻¹	Вид колебаний	Функциональная группа
800–900	Валентные колебания	C–C
830–940	Симметричные и асимметричные валентные колебания в алифатических простых эфирах	C–O–C
840–870	Ковалентно-связанные колебания	N=O
780–975	Деформационные колебания	C–H

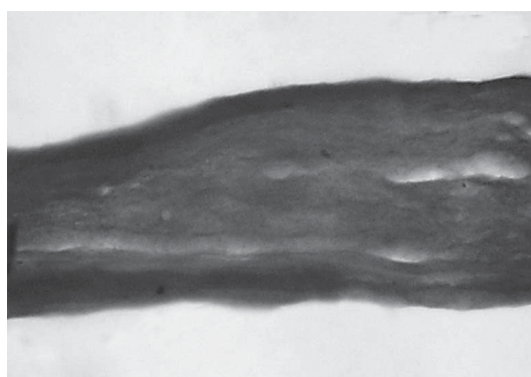


Рис. 6. Структура гидроколлоида ГК с ПК. Окраска: ШИК-реакция с предварительной обработкой срезов амилазой слюны, ув. ×400

ковалентно-связанные N=O, деформационные C–H колебания. Появление новых связей между функциональными группами компонентов гидрогеля (ГК и ПК) после макромолекулярного фотопринтирования обуславливает формирование устойчивой пластинчатой структуры разработанной субстанции (полимера).

Для оценки структуры сформировавшейся субстанции полимера проведено ее гистологическое и гистохимическое изучение. Установлено, что субстанция гидрогеля представлена аморфным матриксом, преимущественно формирующимся за счет ГК. Ее микроструктура (рис. 5, 6) обусловлена формированием новых типов связи между компонентами гидрогеля.

Структурированное гомогенное построение полимера ГК-ПК (см. рис. 5) включает небольшие зёрна вещества, при это отмечается более значительная концентрация аморфного вещества полимера на периферии и некоторое его разрежение к центру субстанции. Отмечается наличие нескольких «волнообразных» слоёв, напоминающих строение эпидермиса (см. рис. 6).

Выводы

1. Разработана технология макромолекулярного фотопринтирования, позволяющая получать пластинчатую субстанцию на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса, стабилизированную новыми химическими связями между функциональными группами молекул полимера по типу валентных C–C, симметричных и асимметричных C–O–C, ковалентно-связанных N=O и деформационных C–H колебаний.

2. Гидрогель гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса может служить основой для разработки новой фармацевтической технологии – биопластических дерматотерапевтических систем.

Литература

1. Артемьев, Д.В. Ротиготин – трансдермальная терапевтическая система: новые возможности для лечения болезни Паркинсона / Д.В. Артемьев // Современная терапия в психиатрии и неврологии. – 2013. – № 1. – С. 19–24.
2. Воробьева, В.М. Методологические основы разработки лекарственных препаратов на основе полимеров / В.М. Воробьева, В.Ф. Турцова // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 2. – С. 45–46.

3. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
4. Друзь, Е.А. Трансдермальные терапевтические системы с растительными биофлавоноидами / Е.А. Друзь, Н.Б. Фельдман, С.В. Луценко // Сб. мат. XVII Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство» (Москва, 12–16 апреля 2010 г.). – М.: ЗАО РИЦ «Человек и лекарство», 2010. – С. 608.
5. Левшин, Л.В. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч. 1. Молекулярная спектроскопия: уч. пособ. / Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 320 с.
6. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 томах / А. Ленинджер; пер. с англ. В.В. Борисова, М.Д. Гроздовой, С.Н. Преображенского. – М.: Мир, 1985. – 365 с.
7. Литвиненко, И.В. Ротиготин: трансдермальный подход к дофаминергической терапии болезни Паркинсона / И.В. Литвиненко // Атмосфера. Нервные болезни. – 2011. – № 1 (4). – С. 13–16.
8. Лосенкова, С.О. Доклиническое токсикологическое изучение трансдермального пластыря с гипоксеном / С.О. Лосенкова, Г.Н. Фёдоров // Токсикол. вестн. – 2012. – № 5. – С. 23–28.
9. Лосенкова, С.О. Морфологические особенности кожи морских свинок при применении трансдермального пластыря с мексидолом / С.О. Лосенкова, С.М. Баженов, Г.Н. Фёдоров // Вестн. новых мед. технологий. – 2012. – Т. XIX, № 4. – С. 160–162.
10. Наканиси, К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений: практ. рук. / К. Наканиси; пер. с англ. Н.Б. Куплетской, Л.М. Эпштейн. – М.: Мир, 1965. – 210 с.
11. Пешкова, В.М. Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии: уч. пособ. для университетов / В.М. Пешкова, М.И. Громова. – М.: Высшая школа, 1976. – 280 с.
12. Трансдермальный пластырь: патент № 2445084, Российская Федерация / С.О. Лосенкова, Э.Ф. Степанова, В.Е. Новиков; заявитель и патентообладатель Смоленская государственная медицинская академия. – № 2010116752/15; заявлено 27.04.2010; опубликовано 20.03.2012, бюллетень № 8. – 10 с.
13. Трансдермальный пластырь: патент № 2445123, Российская Федерация / С.О. Лосенкова, Э.Ф. Степанова, В.Е. Новиков; заявитель и патентообладатель Смоленская государственная медицинская академия. – № 2010123973/15; заявлено 11.06.2010; опубликовано 20.03.2012, бюллетень № 8. – 10 с.
14. Трансдермальная терапевтическая система: патент № 2450805, Российская Федерация / П.М. Гарджиуло [и др.]; заявитель и патентообладатель Новартис АГ, Эл-Т-ЭС Ломанн Терапи-Зистеме АГ. – № 2008126459/15; заявлено 10.10.2006; опубликовано 20.05.2012, бюллетень № 3. – 11 с.
15. Хабаров, В.Н. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойко, М.А. Селянин. – М: Практ. мед., 2012. – 134 с.
16. Borojerdi, B. The long-term impact of early vs delayed treatment with rotigotine transdermal system in patients with early parkinson's disease / B. Borojerdi [et al.] // Mov. disord. – 2011. – Vol. 26. – Suppl. 2. – S. 121.
17. Rektor, I. High doses of rotigotine transdermal patch: results of an open-label, dose-escalation trial in patients with advanced-stage, idiopathic Parkinson disease / I. Rektor [et al.] // Clin. neuropharmacol. – 2009. – Vol. 32. – P. 193–198.

E.V. Zinoviev, R.R. Rakhmatullin, A.V. Apchel, K.F. Osmanov, I.A. Almazov, Sulitsa A.A.

Bioplastic dermatological therapeutic systems based on hydrocolloid and hyaluronic acid peptide complex

Abstract. The technology of obtaining stable substance hydrocolloid-based polymer hyaluronic acid and peptide complex macromolecular photoprint method is worked out. The ability of the hyaluronic acid and peptide complex to form new types of functional chemical bonds in the hydrogel was studied using procedures of absorption spectroscopy, measuring the infrared absorption spectra confirmed the existence of new types of functional bonds in the polymer. We found two bands with maximum absorption of hydrogel at 218 and 270 nm, directly mediated peptide composition components. As the concentration of hyaluronic acid in aqueous solution absorption maximum shifted to longer wavelengths, the position of the second peak at 270 nm has not significantly changed. At this stage the formation of photochemical cross-linking happens, the spatial convergence of reactive groups ends. In this process the active role belongs to the functional chemical groups of peptide complex (primarily amino acid desmosine). As a result, the system of covalent bonds and labile forms organized plate frame substance. It is shown that hydrocolloid hydrogel of hyaluronic acid and peptide complex can serve as a basis for the development of new pharmaceutical technology for bioplastic dermatological therapeutic systems.

Key words: hyaluronic acid, peptide complex macromolecular fotoprintirovanie, absorption spectroscopy, chemical bonding, vibration modes, bioplastic dermatological therapeutic systems.

Контактный телефон: 8 (812) 983-6392; e-mail: evz@list.ru