

На правах рукописи



СТОЛБУШКИНА ПОЛИНА ПЕТРОВНА

ПОЛУЧЕНИЕ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ
АМИНОПОЛИСАХАРИДОВ

Специальность 02.00.06. – Высокомолекулярные соединения

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2003 г.

Работа выполнена на кафедре технологии химических волокон Московского государственного текстильного университета имени А.Н. Косыгина

Научные руководители:

доктор химических наук Вихорева Галина Александровна

кандидат химических наук Банникова Галина Евгеньевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук Бабиевский Кирилл Константинович

кандидат химических наук Марквичева Елена Арнольдовна

Ведущая организация: Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН

Защита состоится "___" _____ 2003 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.139.01 в Московском государственном текстильном университете имени А.Н. Косыгина по адресу: 119 991, г. Москва, М. Калужская ул., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного текстильного университета имени А.Н. Косыгина.

Автореферат разослан "___" _____ 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук



Зубкова Н.С.

2003-А
16006

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Биополимеры – хитин, хитозан, а также некоторые их эфиры и соли широко применяются в медицинской, фармацевтической, косметической, пищевой отраслях промышленности. Это связано с биологической активностью данных полимеров, их биосовместимостью и биоразрушаемостью, иммуномодулирующим, противомикробным, фунгистатическим, противоопухолевым, радиозащитным, гемостатическим действием и низкой токсичностью. Особый интерес представляют сульфатированные производные хитозана (СХ) как наиболее близкие структурные аналоги природного антикоагулянта крови гепарина (Г), дефицит и высокая стоимость которого стимулирует поиск и синтез его заменителей.

В последнее время большое внимание уделяется исследованию и созданию лекарственных форм на основе низкомолекулярных гепаринов (молекулярная масса 3-6 кД) и других мукополисахаридов, поскольку такие препараты обладают лучшими фармакокинетическими свойствами и меньшей токсичностью. Ферментативный гидролиз – это мягкий и эффективный способ снижения молекулярной массы полимеров. Для гидролиза гепарина обычно используют гепариназы, но высокая стоимость и отсутствие гепариназ на отечественном рынке обуславливают необходимость поиска других более доступных ферментов, пригодных для получения низкомолекулярных гепарина и гепариноидов. Такими ферментами могут быть папаин и лизоцим, а также ферментные препараты целовиридин и *Streptomyces kurssanovii*, которые с успехом используются для снижения молекулярной массы хитина и хитозана. Принципиальная возможность ферментативного гидролиза сульфата хитозана и гепарина указанными ферментами обусловлена отсутствием у них узкой субстратной специфичности.

В разработке проблемы создания низкомолекулярных форм гепарина ведущее положение занимают американские (R. Linhardt, U. Desai), итальянские (B. Casu, G. Torri), французские (A. Frydman) и японские (S. Hirano) ученые. Российскими учеными В. Макаровым (ГНЦ РАМН), А. Гамзазаде (ИНЭОС РАН) внесен существенный вклад в исследования, направленные на создание эффективных заменителей гепарина. Данная диссертация является продолжением проведенных ранее на кафедре ТХВ МГТУ совместно с ГНЦ исследований и первой из работ, посвященной получению низкомолекулярных форм сульфата хитозана.

Работа выполнена в соответствии с основными направлениями научных исследований кафедры технологии химических волокон МГТУ и лаборатории Центра "Биоинженерия" РАН при финансовой поддержке РФФИ (код проекта 02-04-49850), ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения" и грантом молодых ученых МГТУ.

Целью работы являлось исследование возможности получения низкомолекулярных сульфатированных аминополisahаридов – сульфата хитозана и гепарина, а также изучение строения и биологических свойств полученных препаратов. Для достижения поставленной цели было необходимо:

- изучить возможность получения низкомолекулярных сульфатов хитозана и гепарина с использованием метода ферментативного гидролиза неспецифическими доступными ферментами и ферментными препаратами;

- осуществить выбор наиболее эффективного ферментного препарата и оптимальных условий его действия в нативном и иммобилизованном состоянии;

- провести сульфатирование низкомолекулярных хитозанов, полученных разными способами;
- охарактеризовать биологическую активность низкомолекулярных образцов сульфата хитозана и гепарина, полученных различными методами.

Научная новизна работы

Установлены закономерности ферментативного гидролиза сульфатированных аминополисахаридов – сульфата хитозана и гепарина неспецифическим ферментным комплексом (ФК) из *Streptomyces kurssanovii*, в том числе в иммобилизованном состоянии, главными из которых являются следующие:

- ферментативный гидролиз полисахаридов наиболее эффективным ферментным комплексом из *Streptomyces kurssanovii* протекает преимущественно по эндомеханизму;
- сульфат хитозана как более специфический субстрат, содержащий ионные группы основного и кислотного типа, гидролизуетсся с большей скоростью, чем гепарин, содержащий лишь кислотные группы;
- иммобилизованный ферментный комплекс по эффективности не уступает нативному, что может быть связано с фиксацией на носителе в предложенных условиях наиболее активных компонентов ферментного комплекса и минимальным изменением конформации активного центра.

При исследовании сульфатирования низкомолекулярных хитозанов показано, что низкомолекулярный хитозан, полученный ферментативным гидролизом, протекающим, главным образом, в аморфных областях, обладает наиболее упорядоченной надмолекулярной структурой и наименьшей реакционной способностью.

Впервые показана общая для гепарина и сульфата хитозана закономерность преимущественного проявления анти Ха активности с понижением молекулярной массы препаратов.

Практическая значимость работы

Предложены условия и разработан лабораторный регламент получения низкомолекулярных препаратов гепарина с молекулярной массой 3-6 кД с использованием доступного и дешевого ферментного комплекса из *Streptomyces kurssanovii*. Полученные препараты проявляют выраженную анти Ха активность, и имеют соотношение анти Ха и анти тромбиновой активности на уровне коммерческих образцов низкомолекулярного гепарина. Нарботаны образцы низкомолекулярного гепарина и сульфата хитозана, необходимые для проведения исследований в тестах in vivo, в том числе в композициях и в виде микрокапсулированных форм.

Апробация результатов работы

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на Шестой (Москва 2001) и Седьмой (Санкт-Петербург-Репино 2003) Международных конференциях Российского Хитинового общества "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана", на Седьмом съезде Польского Хитинового общества (Польша 2001), на Третьем Международном симпозиуме "Энзимология хитина" (Италия 2001), на внутривузовской конференции (Москва 2001) и научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов МГТУ (Москва 2002), на Международном конгрессе "Тромбоз" (Болонья 2002) и др. По теме диссертации имеются 13 публикаций и подана заявка на патент.

Объем и структура диссертации Диссертация состоит из введения, литературного обзора, раздела с обсуждением экспериментальных результатов, методической части, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена

на 130 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 22 рисунка, библиографию из 145 наименований.

Содержание работы

Во введении приведено обоснование актуальности выбранной темы, сформулированы цели и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость работы. В литературном обзоре проведен анализ литературы по современному состоянию проблемы получения низкомолекулярных биологически активных препаратов гепарина и гепариноидов методами химической и ферментативной деполимеризации. В методическом разделе описаны методы модификации и анализа полученных низкомолекулярных производных полисахаридов – вискозиметрия, гельпроникающая хроматография, ультрафильтрация, элементный анализ, ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопия. В экспериментальном разделе изложены результаты исследования закономерностей ферментативного гидролиза сульфатов хитозана и гепарина и сульфатирования низкомолекулярных хитозанов, а также данные о строении и биологической активности полученных производных низкомолекулярных сульфатированных аминополисахаридов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ферментативный гидролиз сульфата хитозана и гепарина

Характеристики использованных в работе в качестве исходных образцов гепарина и сульфатов хитозана приведены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики исходных сульфатированных аминополисахаридов

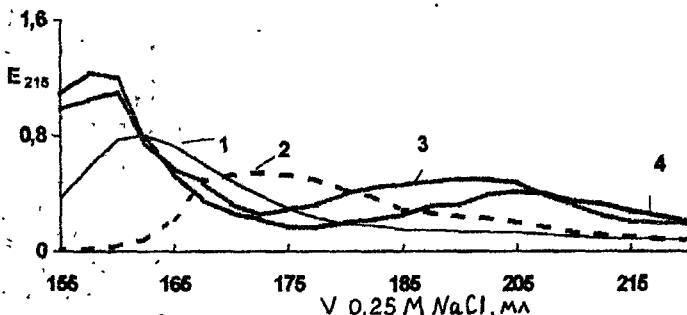
Обозначение	Производитель	$[\eta]$, дл/г	ММ, кД	S, %
CX-1	МГТУ, опытное	0,35	100,0	13,5
CX-2	производство	0,28	75,0	14,8
CX-3	ОАО "Акрихин"	0,43	130,0	15,5
Г-1 (из легких)	Москва МЭЗ	0,11	7,5	10,8
Г-2 (из мукозы)	Импорт из КНР	0,11	7,5	10,5

Скрининговые исследования ферментативного гидролиза CX с использованием ряда ферментных препаратов показали, что наиболее значительные изменения в молекулярно-массовом распределении сульфата хитозана могут быть получены при его гидролизе ферментным комплексом из *S. kurssanovii* (рис.1). При гидролизе этим ферментным комплексом средневязкостная молекулярная масса сульфата хитозана снизилась на 80-95 %, а выход гидролизованного сульфата хитозана составил 80-90 %.

Другие ферменты – папаин, лизоцим и целповиридин – практически не изменяют профиль элюции полученных гидролизатов. Поэтому для дальнейшего более детального изучения закономерностей протекания ферментативного гидролиза сульфатированных аминополисахаридов был выбран ферментный комплекс из *S. kurssanovii*.

Известно, что каталитическая активность ферментов очень чувствительна к воздействию различных факторов, и максимальную активность они проявляют в определенном температурном интервале и в среде с определенным pH. В работе установлено, что для ферментного комплекса из *S. kurssanovii*, проявляющего активность в широком диапазоне pH (4,0-8,0) и температуры ($25\pm 50^\circ\text{C}$), при гидролизе сульфата хитозана наиболее оптимальными являются pH 5-6 и температура 37°C (рис.2).

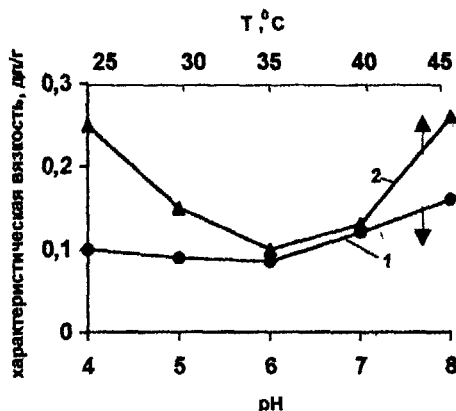
Рис. 1. Профили элюции исходного СХ (1) и его гидролизатов (2-4), полученных с использованием ФК из *S. kurssanovii*



Условия гидролиза: 37 °С, 24 ч, pH 6,0 массовое соотношение СХ:ФК = 1000:1 (2); 500:1 (3); 250:1 (4), концентрация СХ 1,0 %

Изучение влияния концентрации исходного раствора сульфата хитозана в диапазоне от 2,0 до 0,5 % на протекание процесса гидролиза позволило в качестве оптимальной выбрать концентрацию 1,0 %, поскольку использование более разбавленных растворов полимера не приводит к дополнительному снижению характеристической вязкости гидролизатов.

Рис. 2. Зависимость характеристической вязкости растворов СХ-1 от pH среды (1) и температуры гидролиза (2)



Условия гидролиза: продолжительность 24 ч, массовое соотношение СХ:ФК = 100:1, концентрация СХ 1,0%, температура 37 °С (1), pH 6 (2)

Результаты хроматографического разделения гидролизатов, полученных при различных соотношениях СХ и ФК (рис. 1, табл. 2), наглядно свидетельствуют о зависимости молекулярной массы продуктов гидролиза сульфата хитозана от количества в реакционной смеси ферментного комплекса. С увеличением содержания ферментного комплекса в реакционной среде максимумы поглощения на

кривых элюции гидролизатов смещаются в сторону больших величин объема элюата, что говорит об образовании более низкомолекулярных продуктов.

Таблица 2

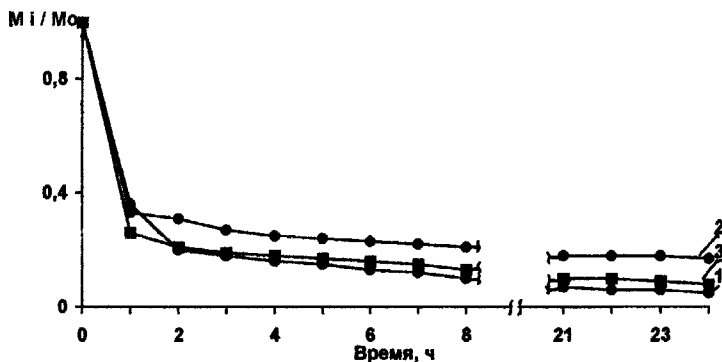
Влияние массового соотношения СХ:белок ФК
на характеристики получаемого сульфата хитозана

СХ:белок ФК, г/г	$[\eta]$, дл/г	ММ, кД	Содержание серы, %
Исходный СХ-2	0,28	75	14,8
1000:1	0,21	51	8,4
500:1	0,15	34	9,5
250:1	0,09	17	6,3

Как видно из данных табл. 2, ферментативный гидролиз сульфата хитозана приводит к получению продуктов с меньшим содержанием серы. Снижение серы в сульфатах хитозана, очевидно, связано с протеканием побочного процесса отщепления серосодержащих заместителей, а также потерей наиболее высокозамещенных фракций полимера.

Исследование влияния продолжительности гидролиза показало, что наиболее резкое уменьшение характеристической вязкости и молекулярной массы сульфата хитозана происходит в течение первых 2-4 ч, хотя молекулярная масса продолжает падать вплоть до 24 часов гидролиза (рис.3). Такой вид кривых характерен для ферментов, действующих по эндомеханизму, при котором размер макромолекулы уменьшается в кратное количество раз.

Рис.3. Изменение ММ СХ-1 (1), СХ-2(2) и СХ-3(3) в ходе ферментативного гидролиза *S. kurssanovii*



Условия гидролиза: температура 37°C, массовое соотношение СХ:ФК = 500:1, концентрация СХ 1,0%, pH 6

Разделение гидролизатов сульфата хитозана с целью наработки фракций с меньшей ММ и более узким молекулярно-массовым распределением, необходимых для определения антикоагулянтной активности, проводили на колонке с акрилекс Р-2. В табл. 3 приведены данные о выходе фракций, из которых видно, что таким способом могут быть получены образцы сульфатов хитозана со средневязкостной молекулярной массой <1,5 кД.

Таким образом, подобранные условия проведения ферментативного гидро-

лиза сульфата хитозана обеспечивают существенное снижение его молекулярной массы, при этом варьирование продолжительности гидролиза и фермент-субстратного соотношения позволяют получать сульфаты хитозана с заданной молекулярной массой вплоть до 5 кД, а последующее фракционирование – с еще меньшей – вплоть до 1,5 кД.

Таблица 3

Фракционный состав гидролизованных СХ

Фракция	ММ, кД	Выход фракций при гидролизе (%)		
		СХ-1	СХ-2	СХ-3
1	5,3	36	38	46
2	3,7	30	37	14
3	2,5	13	4	5
4	1,6	6	3	3

Исходя из аналогии структур гепарина и сульфата хитозана, ферментативный гидролиз гепарина ферментным комплексом из *S. kurssanovii* проводили в условиях, ранее подобранных для сульфата хитозана, при pH 6,0 и температуре 37°C. Динамическая вязкость гидролизата гепарина наиболее заметно уменьшалась в течение первых 2-3 ч гидролиза. Данные об изменении характеристической вязкости и молекулярной массы полисахаридов, приведенные в табл. 4, также показывают, что преимущественно молекулярная масса гепарина снижается в первые 3 часа, а в следующие несколько часов ММ полисахарида практически не изменяется и лишь за 24 ч молекулярную массу удается снизить в два раза.

Таблица 4

Влияние продолжительности ферментативного гидролиза на ММ полисахаридов*

Время гидролиза, ч	[η], дл/г		ММ, кД		Снижение ММ ^{***} , %	
	Г-1	СХ-2	Г-1	СХ-2	Г-1	СХ-2
0	0,110	0,280	7,5	75,0	0	0
3	0,085	0,115	5,7	23,4	24	69
5	0,085	0,100	5,7	19,5	24	74
7	0,085	0,090	5,7	17,0	24	77
24	0,050	0,075	3,4	13,4	55	82

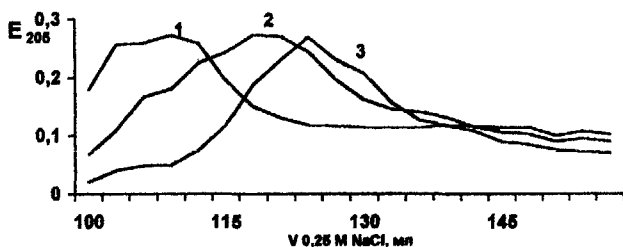
*Условия гидролиза: pH 6,0; температура 37°C; субстрат-ферментное соотношение 500:1; концентрация полимера 1,0%.

** Снижение ММ = (ММ₀-ММ): ММ₀·100

Поскольку в случае гидролиза сульфата хитозана характеристическая вязкость и ММ снижаются значительно более резко, можно сделать вывод о том, что гепарин более устойчив к воздействию ферментного комплекса, чем сульфат хитозана.

Факт протекания ферментативного гидролиза гепарина подтвержден также данными хроматографического разделения гидролизатов гепарина на колонке с акрилекс Р-2, в частности, смещением максимума поглощения в сторону более низкомолекулярных продуктов (рис. 4).

Рис.4. Профили элюции исходного гепарина (1) и его гидролизатов (2,3)



Условия гидролиза: температура 37 °С, продолжительность 24 ч, pH 6,0, массовое соотношение Г:ФП= 500:1 (2) и 250:1 (3), концентрация гепарина 1,0 %

Как и следовало ожидать, гидролизованный гепарин при почти вдвое меньшей молекулярной массе характеризуется более узким молекулярно-массовым распределением, при этом содержание фракций с $MM < 2,5$ кД, составляет 50 %, а с $MM < 5$ кД порядка 90 %. Из данных табл. 5, видно, что в результате побочного процесса десульфатирования происходит снижение содержания серы и в гидролизованном гепарине.

Таблица 5

Характеристика фракций гидролизата гепарина

Образец	$[\eta]$, дл/г	ММ, кД	S, %	Выход, %
Г исх	0,150	10,3	10,8	-
НМГ Σ	0,065	4,4	-	-
Га	0,075	5,1	7,1	10
Гв	0,055	3,7	5,7	40
Гс	0,037	2,5	8,6	20
Гд	0,025	1,6	4,6	30

Сравнение эффективности ферментативного гидролиза гепарина и сульфата хитозана показало, что при ферментативном гидролизе гепарина за 5 ч потеря вязкости составляет 6-10 %, а для CX – 45-50 %. Вероятно, это объясняется большей доступностью сульфата хитозана как субстрата для данного ферментного комплекса. Тем не менее, предложенные условия проведения ферментативного гидролиза позволяют получать образцы низкомолекулярного гепарина с молекулярной массой до 3,4 кД, а в сочетании с дополнительным фракционированием и более низкомолекулярные фракции ($MM \leq 2,5$ кД) с хорошим (на уровне 50 %) выходом.

Ферментативный гидролиз полисахаридов с использованием иммобилизованного ферментного комплекса из *S. kurssanovii*

Многочисленное или длительное использование нативных ферментов очень часто невозможно по причине их инактивации. Кроме того, растворение в реакционной среде нативных ферментов предопределяет необходимость очень тщательной очистки от них получаемых продуктов. Неустойчивость при хранении и при различных, например, тепловых, воздействиях также ограничивает возмож-

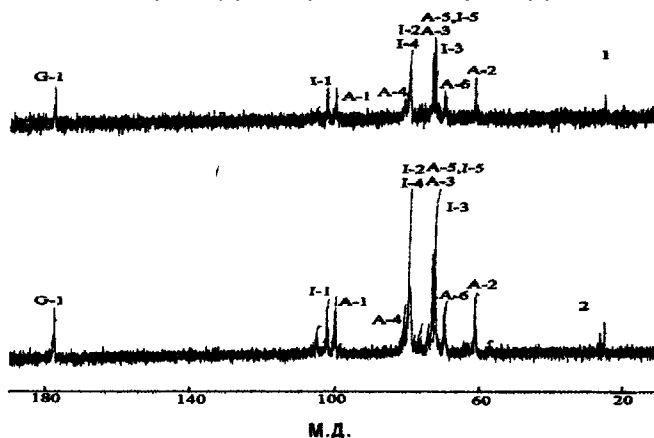
ность применения ферментов в нативном состоянии. Все эти затруднения можно преодолеть, используя ферментные препараты в иммобилизованном состоянии. Поэтому в данной работе представлялось целесообразным исследовать возможность получения и применения иммобилизованного ферментного комплекса для гидролиза сульфатированных аминополисахаридов.

В качестве матрицы при иммобилизации ФК из *S. kurssanovii* использовали аминокислотное производное силихрома активированное азотистой кислотой. Иммобилизацию проводили по реакции диазотирования. Количество иммобилизованного белка, по которому при гидролизе рассчитывали субстрат-ферментное соотношение, составило 0,2 мг белка на 1 г сорбента.

Изучение pH-зависимости активности иммобилизованного ферментного комплекса показало, что при гидролизе гепарина и сульфата хитозана pH-оптимум практически совпадает с таковым для нативного ферментного комплекса (pH оптимум 6,0), но в случае гидролиза СХ иммобилизованным ФК интервал pH оптимума расширяется от 6,0 до 7,0, а в случае гепарина – до 7,5. Кроме того, температурный оптимум при гидролизе иммобилизованным ферментным комплексом смещается в область более высоких температур и составляет 40–45°C против 37–40°C для нативного ферментного комплекса. Сравнение эффективности гидролиза иммобилизованным и нативным ФК свидетельствуют о том, что иммобилизованный ФК не уступает нативному. Так, при гидролизе сульфата хитозана за 1 ч в оптимальных условиях действия ферментов молекулярная масса СХ снижается в 1,5 раза в обоих случаях, а в случае гепарина – в 0,5 раза.

По данным методов ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопии исходный гепарин и его гидролизат, полученный с использованием иммобилизованного ферментного комплекса из *S. kurssanovii*, имеют идентичное строение.

Рис.5. ^{13}C ЯМР спектры растворов исходного гепарина (1) и гидролизата гепарина (2)



Сравнение ЯМР-спектров показало, что химические сдвиги 1,2 и 6 углеродных атомов глюкозаминных остатков (А-1, А-2 и А-6) и 1,2 и 4 углеродных атомов остатков идуроновых кислот (I-1, I-2 и I-4) практически сохранили свое положение, а расщепление сигналов атомов А-3, А-4, А-5, I-3, I-2, I-4 и I-5 в области 72–81 м.д. является следствием микрогетерогенности получаемых низкомолекулярных продуктов.

Сульфатирование низкомолекулярных образцов хитозана

Наряду с ферментативным гидролизом низкомолекулярный сульфат хитозана может быть получен также методом сульфатирования низкомолекулярных образцов хитозана. В технологическом процессе получения сульфатов хитозана стадия сульфатирования определяет основные характеристики (степень замещения, молекулярную массу) и, следовательно, свойства (растворимость, биологическую активность) конечного продукта. Ранее на кафедре ТХВ сульфатированием высокомолекулярного хитозана системой диметилформамид- SO_3 при температуре 45-60°C в течение разного времени были получены препараты сульфата хитозана с ММ 25-150 кД, степенью замещения (СЗ) 1,2-1,6 и антикоагулянтной активностью 20-70 Ед/мг. Поскольку, перспективные антикоагулянты должны иметь более низкую ММ, в данной работе изучены возможность и закономерности сульфатирования низкомолекулярных (ММ 10-50 кД) образцов хитозана, полученных разными способами: экструзионным дезацетилированием хитина (ХЭ), ферментативным (ХФ) и кислотным (ХК) гидролизом высокомолекулярного хитозана. В табл. 6 представлены характеристики исходных хитозанов, при этом обозначение образца отражает способ получения и ММ, выраженную в кД.

Таблица 6

Основные характеристики исходных хитозанов

Обозначение	ММ, кД	СП	СД	Зольность, %
Х-300	300	1800	0,88	0,2
ХФ-50	50	300	0,90	0,2
ХФ-35	35	210	0,87	
ХФ-33	33	198	0,88	
ХФ-30	30	185	0,90	
ХФ-10	10	60	0,90	
ХЭ-45	45	235	0,91	0,05
ХЭ-30	30	185	0,92	0,10
ХК-20	20	122	0,91	
ХК-10	10	60	0,80	

Образец Х-300 представляет собой коммерческий высокомолекулярный хитозан, полученный из панцирей крабов. Образцы хитозанов ХЭ получены на кафедре ТХВ МГТУ совместно с ИСПМ РАН, ХФ – в Центре "Биоинженерия", а ХК предоставлены ЗАО "Эхо".

Активацию низкомолекулярных образцов проводили по аналогии с высокомолекулярным хитозаном инклюдированием в диметилформамиде, а в ряде случаев перед инклюдированием их переосаждали из раствора. Активация способствует набуханию полимера, разрушению межмолекулярных водородных связей и аморфизации его структуры, облегчая доступ реагентов к функциональным группам. Экструзионно полученные образцы хитозана характеризуются большей однородностью частиц по размерам и форме, кроме того они обладают более разрушенной структурой и имеют более высокую реакционную способность в реакции сульфатирования по сравнению с хитозанами ХФ. Как и ожидали, при сульфатировании происходит снижение ММ полимеров. При этом более корректным является сопоставление не ММ исходных хитозанов и полученных сульфатов хитозана, а величин их степеней полимеризации (СП), так как при сульфатировании происходит существенное (примерно в 2 раза) повышение молекулярной массы

мономерного звена полимера. Закономерно, что при сульфатировании снижение СП происходит тем в большей степени, чем выше СП исходного хитозана. Так, степень полимеризации высокомолекулярного хитозана Х-300 при сульфатировании снижается более чем в 20 раз, тогда как у сульфатов хитозана, полученных из низкомолекулярных хитозанов, она снижалась лишь в 2-10 раз.

Степень замещения СХ, полученных из ХЭ находится на уровне 1,3-1,8, а из ХФ – 1,0-1,6 (табл. 7). Тем не менее, самые низкомолекулярные (ММ 8-10 кД) сульфаты хитозана получены нами из наиболее низкомолекулярных исходных хитозанов ХФ-10 и ХК-10. Сульфат хитозана, полученный из ХК-10, при довольно высокой степени сульфатирования обладает самой низкой СП.

Таблица 7

Характеристики сульфатов хитозана

Исходный хитозан	$[\eta]$, дл/г	ММ, кД	S, %	СЗ	СП	СП _х /СП _{сх}
Х-300	0,14	30	16,7	1,85	85	21,2
ХЭ-45	0,12	25	16,8	1,85	70	3,4
ХФ-30	0,12	25	15,7	1,63	75	2,5
ХЭ-30	0,12	25	15,9	1,65	75	2,5
ХФ-10	0,06	10	13,9	1,30	35	1,7
ХК-10	0,05	8	15,7	1,63	24	2,5

Результаты фракционирования образцов СХ, полученных из хитозанов ХЭ, на колонке с сефадекс G-10, представленные в табл. 8, показали, что таким образом можно получать фракции СХ со степенью полимеризации 35-45, но выход их находится на уровне 16-20%.

Таблица 8

Фракционный состав образцов сульфата хитозана

Образец СХ и фракции	$[\eta]$, дл/г	ММ, кД	СП	S, %	СЗ	Выход, %
СХ из ХЭ-45	0,12	25	75	15,9	1,65	-
1	0,16	35	100	16,0	1,70	43
2	0,12	25	75	15,8	1,65	21
3	0,07	15	45	15,7	1,63	16
СХ из ХЭ-30	0,12	25	75	15,9	1,75	-
1	0,16	35	105	16,2	1,75	39
2	0,14	30	80	16,1	1,70	27
3	0,07	15	35	15,5	1,60	20

Сравнение ЯМР спектров полисахаридов показало практически полную аналогию спектров сульфатированных производных, полученных из различных хитозанов. Строение сульфатов хитозанов было исследовано также методом ИК-спектроскопии, который подтвердил наличие в них сульфатных групп.

Исследование антикоагулянтной активности препаратов сульфата хитозана и гепарина

Полученные продукты сульфатирования хитозана различаются по молекулярной массе и содержат набор функциональных групп различной химической

природы – аминокруппы, гидроксильные, сульфатные. Интересным представляется изучение взаимосвязи между строением и биологической, в частности, антикоагулянтной активностью образцов.

Гепарин и сульфат хитозана являются антикоагулянтами прямого действия и предотвращают активацию свертывания крови как *in vivo*, так и *in vitro*. Антикоагулянтная активность, проявляемая этими препаратами на разных стадиях процесса гемостаза, может быть охарактеризована в различных тестах с использованием модельных систем и компонентов крови.

Антитромбиновая активность (aIIa) гепарина обусловлена его способностью ингибировать тромбин путем образования комплекса с ним и с антитромбином, и увеличение ММ гепарина благоприятствует образованию таких комплексов. Кроме того, фракции гепарина с пониженной молекулярной массой на более ранней стадии гемостаза взаимодействуют с фактором Ха, поэтому препараты гепарина проявляют как антитромбиновую активность, так и анти Ха (аХа) активность, которая увеличивается с понижением молекулярной массы. Именно такие изменения механизма действия низкомолекулярных гепаринов обеспечивают улучшенные фармакокинетические характеристики и снижение геморрагического побочного действия.

Изучение антитромбиновой и аХа активностей исходного и гидролизованного гепарина и их фракций показало, что как и ожидалось, с уменьшением молекулярной массы образцов наблюдается закономерное увеличение аХа активности и снижение антитромбиновой активности, и у лучших образцов аХа активность превышает антитромбиновую в 2-4 раза, что сопоставимо с коммерческими препаратами низкомолекулярного гепарина (табл. 9).

Таблица 9

Антикоагулянтная активность гепарина Г-2 и его гидролизатов

ММ, кД	S, %	аХа, ед/мг	aIIa, ед/мг	аХа:aIIa
7,5 (исходный)	10,8	184	223	0,8
3,1	8,8	340	168	2,0
1,7	8,7	646	153	4,2

Исследование антитромбиновой и аХа активности гидролизованных образцов сульфата хитозана с молекулярной массой 25-3,7 кД показало, что они обладают преимущественно антитромбиновой активностью. Дальнейшее снижение ММ до 2,5 кД приводит к повышению аХа активности и увеличению соотношения активностей аХа:aIIa до 1,7. Вместе с тем низкий уровень этой активности (3-5 ед/мг) может быть связан с протеканием при гидролизе побочного процесса десульфатирования и недостаточно высокой (менее 1,0) степенью сульфатирования полученных продуктов.

Для высокосульфатированных образцов сульфата хитозана (С3 1,60-1,63), полученных сульфатированием, с понижением ММ до 10 кД наблюдается увеличение аХа активности до 57-64 ед/мг по сравнению с 2-4 ед/мг для образцов с ММ выше 10 кД, а антитромбиновая активность наоборот понижается с 37-85 до 13-14 ед/мг, что приводит к увеличению соотношения аХа:aIIa до 4,0-4,9.

Наработанные укрупненные образцы низкомолекулярного гепарина и сульфата хитозана переданы на испытание в тестах *in vivo* и для получения микрокапсулированных форм препарата.

ВЫВОДЫ

С целью разработки способа получения низкомолекулярных препаратов гепарина и сульфата хитозана, потенциально обладающих улучшенными фармакокинетическими характеристиками, проведено исследование закономерностей ферментативного гидролиза полисахаридов доступными неспецифическими ферментными препаратами, а также закономерностей сульфатирования низкомолекулярных хитозанов, полученных разными способами.

1. Впервые показана возможность получения низкомолекулярных препаратов сульфата хитозана двумя способами: ферментативным гидролизом высокомолекулярного полисахарида и сульфатированием низкомолекулярного хитозана. Определены параметры гидролиза (рН и температурный оптимумы) наиболее эффективным ферментным комплексом из *S. kurssanovii*, в том числе в иммобилизованном состоянии, позволяющие в 4-5 раза снизить молекулярную массу и получить препараты с ММ 5-17 кД. Для получения сульфата хитозана с такой же ММ сульфатированием низкомолекулярного хитозана необходимым является использование аморфизованного исходного хитозана с ММ не более 10 кД.

2. Установлено, что гепарин в меньшей степени подвергается ферментативному гидролизу, однако даже 2-х кратное снижение его молекулярной массы обеспечивает получение с хорошим выходом образцов с ММ 3-6 кД, что находится на уровне коммерческих препаратов низкомолекулярного гепарина.

3. Показано, что иммобилизация ферментного комплекса из *S. kurssanovii* приводит к повышению его устойчивости к температурным воздействиям и смещению температурного оптимума действия с 37 до 40-45⁰С. Иммобилизованный ферментный комплекс практически не уступает нативному в эффективности действия при гидролизе полисахаридов в оптимальных условиях.

4. Исследование строения полученных ферментативным гидролизом низкомолекулярных препаратов гепарина и СХ методами ИК и ¹³С ЯМР-спектроскопии показало идентичность химического строения гидролизованных и исходных полисахаридов, однако по данным элементного анализа при гидролизе протекает побочный процесс десульфатирования, более выраженный в случае СХ.

5. Исследование антикоагулянтной активности образцов гепарина показало, что с понижением молекулярной массы происходит закономерное увеличение их аХа активности и снижение антитромбиновой активности, и для образцов с ММ меньше 5 кД соотношение аХа: аlla, равное 2-4, находится на уровне лучших коммерческих препаратов низкомолекулярного гепарина. Для сульфата хитозана подобная закономерность наблюдается при молекулярной массе ниже 10 кД.

Основное содержание работы отражено в публикациях:

1. Вихорева Г.А., Суханова П.П., Банникова Г.Е. Исследование возможности получения низкомолекулярного сульфата хитозана // Тез. докл. внутривузовской научной конф. М.: МГТУ, 2001. С.64

2. Bannikova G.E., Sukhanova P.P., Vikhoreva G.A., Varlamov V.P. Depolymerization of sulfated chitosan with chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii* // Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives / H. Struszczyk. Polish Chitin Society Lodz: Poland, 2001. Monograph. VII. P.65-72.

3. Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Варламов В.П., Банникова Г.Е., Гальбрайт Л.С., Вихорева Г.А., Суханова П.П. Антикоагулянтная активность образцов низкомолекулярного сульфата хитозана // Материалы Шестой Международ. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 2001. С.161-

163.

4. Банникова Г.Е., Вихорева Г.А., Суханова П.П., Варламов В.П. Исследование возможности ферментативной деполимеризации сульфата хитозана // Материалы Шестой Международ. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 2001. С.343-346.

5. Varlamov V.P., Ilyina A.V., Bannikova G.E., Lopatin S.A., Nemtzev S.V., Yussupova D.V., Melent'ev A.I., Sukhanova P.P., Vikhoreva G.A. Enzymatic depolymerization of chitosan and sulfated chitosan // Chitin Enzymology, Atec, Italy / R.A.A. Myzzarelli. 2001. P.423-429.

6. Drozd N.N., Makarov V.A., Varlamov V.P., Bannikova G.E., Sukhanova P.P., Galbraikh L.S. Anticoagulant activity of the low molecular weight chitosan sulphate derivatives // 17 Int. Congress on Trombosis. Bologna, 2002.

7. Банникова Г.Е., Суханова П.П., Вихорева Г.А., Варламов В.П., Гальбрайх Л.С. Гидролиз сульфата хитозана ферментным комплексом из *Streptomyces karsanovii* // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т.38. №5. С.486-489.

8. Суханова П.П. Оптимизация условий получения низкомолекулярного сульфата хитозана // Сборник научных трудов аспирантов М: МГТУ. 2002. Вып. 5. С.62-66.

9. Столбушкина П.П., Вихорева Г.А., Банникова Г.Е., Дрозд Н.Н., Макаров В.А. Сульфатирование низкомолекулярного хитозана // Материалы Седьмой Международ. конф. "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 2003. С. 50-52.

10. Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Варламов В.П., Банникова Г.Е., Гальбрайх Л.С., Вихорева Г.А., Столбушкина П.П. Исследование антикоагулянтной активности низкомолекулярных образцов сульфата хитозана // Материалы Седьмой Международ. конф. "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана" М.: ВНИРО, 2003. С. 169-171.

11. Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Варламов В.П., Банникова Г.Е., Гальбрайх Л.С., Вихорева Г.А., Столбушкина П.П. Антикоагулянтная активность низкомолекулярного гепарина, полученного с помощью ферментативного гидролиза // Материалы Первой Всероссийской конф. "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии" М.: Здоровье человека, 2003. С.99.

12. Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Варламов В.П., Банникова Г.Е., Гальбрайх Л.С., Вихорева Г.А., Столбушкина П.П. Исследование антитромбиновой активности и активности против фактора Ха низкомолекулярных образцов гепарина и сульфата хитозана // Сборник тезисов 2-го съезда Российского научного общества фармакологов "Фундаментальные проблемы фармакологии" М.: Здоровье человека, 2003. С.167.

13. Столбушкина П.П., Киселева Г.В. Разработка способа получения лекарственных средств на основе производных хитозана // Сборник научных трудов, выполненных по итогам конкурса грантов молодых исследователей М.: МГТУ, 2003. С.25-29.

№ 10 000

2003-A
16006

ИД №01809 от 17.05.2000

Подписано в печать 21.10.03

Сдано в производство 21.10.03

Формат бумаги 60x84/16 Бумага множ.

Усл.печ.л. 1,0 Уч.-изд.л. 0,75

Заказ 458 Тираж 80

Электронный набор МГТУ, 119991, ул. Малая Калужская, 1