

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

245378

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 F 13/00

(22) Přihlášeno 08 12 83
(21) PV 9181-83

(40) Zveřejněno 14 02 85

(45) vydáno 15 09 87

(75)

Autor vynálezu

TURKOVÁ JAROSLAVA ing. CSc., ČESKÝ BROD, ŠTAMBERG JIŘÍ ing. CSc.,
PRAHA

(54) Proteolytický kryt na rány

Řešení se týká proteolytického krytu na rány ve formě zásypu, sloužícího k zakrytí a ošetřování hnisavých a nekrotických ran. Sestává z animálního nebo fungálního derivatizovaného chitinu a chitosanu v práchové formě o velikosti částic od 0,01 do 0,3 mm a obsahuje imobilizované proteasy. Enzymy chemicky vázané ve struktuře biopolymerního nosiče působí čištění rány rozpouštěním nežádoucích bílkovinných látek, zvláště fibrinu, nekrotických tkání, hnisu aj. Kromě toho se uplatňuje také absorpční a regenerační účinek zásypu. Je odsáván exsudát a hnis infikovaný bakteriemi do kapilárních prostorů mezi částčkami a do vlastní hmoty porézních částic. Chitin a chitosan se v ráně velmi zvolna depolymerují za vzniku monomerních složek, které se účinně zapojují do metabolických pochodů vedoucích k obnově kožních tkání.

Vynález se týká proteolytického krytu na rány biopolymerního typu ve formě zásypu, který se používá k zakrytí a ošetřování hnisavých a nekrotických ran.

Vedle klasických zásypů dvojsložkového typu, obsahujících jako základ například talek nebo škrob a jako účinnou látku například sulfonamid, antibiotikum nebo antimykotikum, doporučují se v současné době různé biopolymerní zásypové kryty na rány. Tyto nové přípravky využívají hlavně adsorpční nebo proteolytický princip případně kombinaci obou. Adsorpční účinek spočívá v odsávání tekutých složek hnisu a proteolytický účinek v enzymatickém rozkladu nežádoucích bílkovin exsudátu. Biopolymerní kryty uvedeného typu byly popsány například B. S. Jacobssonem a spol. ve Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 10, 65 až 72 (1976), H. Dautzengergem a spol. v čs. AO 237 604.

Jiným významným typem biopolymerního zásypu jsou přípravky na bázi chitinu, které popisuje L. L. Balassa v řadě patentových spisů ((DAS. 1 906 155 (1969), DAS. 1 906 159 (1970), Brit. 1 252 373 (1971), US 3 632 754 (1972), US 3 914 413 (1975)). Chitinový zásyp působí na zcela jiném základě než výše uvedené biopolymerní typy; jeho účinek je možno označit jako regenerační. Chytin se v ráně zvolna depolymeruje a jeho monomerní složky vstupují účinně do metabolismu probíhajících v poraněném místě. Takovým způsobem chitinový zásyp přispívá k obnově porušených kožních tkání.

Omezení chitinových zásypů spočívá v jejich specifickém účinku, tj. v uplatnění jediného principu, regeneračního. Chytin se vyznačuje vysokou krystalinitou a jí odpovídající nízkou porozitou hmoty, takže zásypy na jeho bázi mají jen malý adsorpční účinek. Proteolytický princip čištění ran se u dosavadních chitinových zásypů neuplatňuje vůbec.

Dosavadní nedostatky chitinových zásypů odstraňuje proteolytický kryt podle vynálezu.

Předmětem vynálezu je proteolytický kryt na rány na bázi chitinu nebo chitosanu vyznačený tím, že sestává z částic o velikosti 0,01 až 0,3 mm derivatizovaného chitinu nebo chitosanu s imobilizovanými enzymy typu proteas. Výhodná velikost částic je 0,05 až 0,15 mm.

Hlavní výhodou nového biopolymerního krytu na rány je v trojkombinaci léčivých účinků podle principů proteolytického, adsorpčního a regeneračního.

Proteolytický účinek se zajišťuje imobilizací proteas. Jako výchozí surovina se použije chytin animálního nebo fungálního původu ve formě prachu připraveného mletím a tříděním. Před zpracováním se provede s výhodou alkalická úprava chitinového prachu vedoucí k částečné deacetylaci N-acetylglukosaminových strukturních jednotek a uvolnění ionogenních aminových skupin. Do chitinové struktury tak vstupují chitosanové strukturní jednotky. Přítomnost primárních aminových skupin v polymerní struktuře významně zvyšuje chemickou reaktivitu biopolymeru pro aktivaci k vazbě proteas. K vlastní imobilizaci je možno použít známých postupů popisovaných například W. L. Stanleyem a spol. viz Biotechnol. Bioeng. 17, 315 (1975), US 3 909 358 (1975) nebo R. A. A. Muzzarellim a spol. (Chytin, Pergamon Press, Oxford 1977, str. 199).

Adsorpční účinek chitinových krytů nového typu se zvyšuje během pochodů vedoucích k imobilizaci proteas. Deacetylace, resp. aktivizační derivatizace působí zvýšení porézní struktury biopolymerů. Dochází k ní uvolněním ionogenních aminových skupin osmotickým působením ve vodném prostředí a ztížením orientace polymerních řetězců obsahujících jiné funkční skupiny než acetylaminové dochází ke snížení krystalinity původního polymeru.

Regenerační účinek vlastní chitinovým zásypům zůstává zachován i u nového typu biopolymerního krytu. Poměrně nízký stupeň substituce strukturních jednotek potřebný k imobilizaci proteas a dosažení žádoucí enzymatické aktivity znamená, že ve struktuře biopolymeru zůstává velký podíl nezměněných strukturních jednotek, které se mohou pomalou enzymatickou

depolymerací uvolňovat a přispívat k regeneraci kožních tkání. V čerstvých a starých hojících se ranách je přítomno dostatek lysozymu, který enzymaticky odbourává chitinové struktury. Uvolněné monomerní jednotky se zapojují do metabolismu hexosaminů, orientují a síťují kolagen. Je také známo, že uridinifosfo-N-acetylglukosamin je klíčovou látkou při biosynthese chondroitinsulfátů, kyseliny hyaluronové a glykoproteinů. Tyto pochody doprovázejí obnovu kožních tkání.

V dalším je objasněn způsob výroby krytů podle vynálezu, ne však omezen, příklady provedení.

P ř í k l a d 1

Příprava krytu z animálního chitinu

100 g chitinu, izolovaného z krunýřů krabů a upraveného mletím a tříděním na velikost částic 0,05 až 0,15 mm 100 g, se promíchává s 2 litry 40% hydroxidu sodného NaOH při 115 °C 6 hodin v dusíkové atmosféře. Reakční směs se ochladí, produkt zfiltruje a promyje vodou do neutrální reakce. Za těchto podmínek dojde k cca 70% deacetylaci chitinu.

Hydrolyzovaný produkt v množství odpovídajícím 15 g sušiny se naplní do kolony a promývá fosfátovým pufrům o pH 8,5 až pH eluátu se shoduje s pH přitékajícího pufru. Na kolonu se přivede směsný roztok sestávající z 15 ml používaného pufru, 15 ml roztoku obsahujícího 0,1 g chymotripsinu a 15 ml 4% glukalaldehydu, ponechá se zvolna protéci vrstvou a potom stát v klidu 1 hodinu. Po skončení imobilizace se vrstva promyje 500 ml používaného pufru a v promývání se pokračuje střídáním alkalického 0,1 M borátového pufru s obsahem 1 M chloridu sodného NaCl o pH 9 kyselého 0,1 M acetátového pufru s obsahem 1 M chloridu sodného NaCl o pH 4,5, aby se nevázaný enzym dokonale vymyl. V promývání se pokračuje až do nulové proteolytické aktivity eluátu a nakonec se produkt promyje 0,25 M borátovým pufrům o pH 8 a v suspenzi s tímto pufrům se lyofilizuje.

P ř í k l a d 2

Příprava krytu z fungálního chitinu

K přípravě krytu se použije mycelium houby *Penicilium chrysogenum* odpadající při výrobě penicilinu. Mycelární hmota se sterilizuje a extrakcí chloroformem za teploty místnosti se zbaví lipidických složek, zvláště tuků. Získaný produkt se promíchává s 1 N hydroxidu sodného 18 hodin při teplotě místnosti a po okyselení kyselinou chlorovodíkovou se čistí dialýzou. Mletím za mokra se chitinový materiál upraví na velikost částic 0,05 až 0,2 mm. Hydrolýza, imobilizace a závěrečná úprava se provede stejným způsobem jako v příkladu 1.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Proteolytický kryt na rány na bázi chitinu nebo chitosanu vyznačený tím, že sestává z částic o velikosti 0,01 až 0,3 mm derivatizovaného chitinu nebo chitosanu s imobilizovanými enzymy typu proteas.