



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

250018
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 L 15/01

(22) Prihlášené 24 09 85
(21) (PV 6800-85)

(40) Zverejnené 18 09 86

(45) Vydané 15 05 88

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE (ČSSR),
JURKŠTOVIČ TATIANA L. ing. CSc., MINSK (SSSR),
KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA (ČSSR)

(54) Spôsob prípravy biologickeho krytu na rany

1

2

Účelom riešenia je spôsob prípravy biologicky aktívneho krytu na rany.

Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že práškový polysacharid ako škrob, celulóza, agar, lichenan s veľkosťou častíc 0,06 až 0,3 mm zosietený s 2-chlórmetyloxiránom na hydrofilný gél o stupni napúčania 4 až 15 ml. g⁻¹ sa aktivuje 2-chlórmetyloxiránom a po aktivácii sa na vzniklé oxiránové skupiny chemicky naviažu proteolytické enzýmy, ako chymotrypsín, trypsín, subtilizín a lysozým, potom sa z gélu odstráni neviazané enzýmy premývaním a premytý gél sa odvodní organickým rozpúšťadlom a po jeho odparení sa práškový produkt sterilizuje rádiaoaktívnym γ -žiarením.

Prípravok môže nájsť využitie na chirurgických oddeleniach, na klinikách špecializovaných na civilné a profesionálne úrazy a vo veterinárnom lekárstve.

Vynález sa týka spôsobu prípravy biologickeho aktívneho krytu na rany vo forme zá-sypu.

Pre účely ošetrovania povrchových rán sa v medicínskej praxi bežne používajú zá-sypy pripravené zo škrobu, mastenca alebo iných galenických základov a účinnej zložky s baktericídnym účinkom, ako napríklad antibiotiká, sulfoamidy a pod. Pri ošetrovaní hnisavých a nekrotických rán sa v poslednej dobe zdôrazňuje sorpčný účinok niektorých polymérov, ktoré sú schopné vďaka svojmu hydrofilnému charakteru odoberať tekutiny z povrchu rany nasávaním exudátu, baktérií a ich metabolitov do kapilár vnútornej štruktúry gélu.

Tieto vlastnosti majú prípravky zhotovené na báze sieťovaného α -1,6-glukánu, dextránu [B. S. Jacobson: Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 10, 65 až 72 (1976)], alebo celulózy derivatizovanej v substituenej reakcii na éter [DTA 1 932 753].

V poslednej dobe sa účinnosť takto pripravených zá-sypov ďalej zvyšuje naviazaním enzýmov zo skupiny hydroláz s proteolytickou účinnosťou na povrch modifikovaného biopolyméru kovalentnou väzbou. [Imobilizované proteolytické fermenty v liečení gnojných-nekrotických procesov, zborník prác, AN ZSSR, Sibírskeho oddelenia, Institutu cytologie i genetiky, Novosibirsk (1981).]

Prítomnosť imobilizovaných proteáz v takto upravených preparátoch spôsobuje rozklad nekrotického tkaniva v blízkosti rany a hnisu na jej povrchu, pričom takto vytvorené rozkladné produkty hydrofilný gél nasáva do svojej vnútornej štruktúry, čím sa súčasne odstraňuje prostredie pre rozmnožovanie baktérií a znemožní sa prienik toxínov do organizmu.

Príprava a vlastnosti proteolytického krytu na rany, je popísaná na báze perlovej celulózy modifikovanej v oxidačnom stupni na polyaldehyd a následnom naviazaní proteolytického enzýmu primárnou aminoskupinou na aldehydickú funkciu celulózy a konečne stabilizáciou Schiffovej väzby medzi enzýmom a hydrofilným nosičom redukciou AO č. 249 311.

Uvedený postup prípravy proteolytického krytu na rany je technicky náročný, predovšetkým s ohľadom na použité chemikálie, nízke výťažky pri imobilizácii enzýmových preparátov a potrebu stabilizácie vznikajúcich schiffových väzieb.

Nevýhodou je nutnosť použitia náročných metód sušenia pripraveného preparátu lyofilizáciou, ako aj skutočnosť, že pri použití uvedeného preparátu dochádza k odstráneniu v rane prítomných baktérií len fyzikálnou cestou — ich sorpciou do vnútornej štruktúry gélu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že práškový polysacharid, ako škrob, celulóza, agar, lichenan s veľkosťou častíc 0,006 až 0,3 mm zosietený s 2-chlórmetyloxiránom na

hydrofilný gél o stupni napúčania 4 až 15 ml.g⁻¹ sa aktivuje pri teplote 10 až 25 stupňov C po dobu 2 až 4 h, v prítomnosti hydroxidu sodného 2-chlórmetyloxiránom, načo sa aktivovaný gél obsahujúci 0,05 až 0,3 mmól.g⁻¹ oxiranových funkčných skupín premyje do neutrálnej reakcie a nechá sa reagovať s roztokom proteolytických enzýmov ako chymotrypsín, trypsín, subtilizín a lysozým v pomere aktivít proteolytických enzýmov k lyozýmu 2 až 4 ku 1, pri teplote 20 až 40 °C po dobu 3 až 6 h, načo sa polysacharidový gél s naviazanými enzýmami zbaví voľných enzýmov premývaním, nato sa gél odvodní premývaním organickým rozpúšťadlom, s výhodou etanolom a/alebo acetónom a suchý gél sa nakoniec sterilizuje rádioaktívnym γ -žiarením.

Biologicky aktívny kryt na rany pripravený na báze sieťovaných polysacharidov možno sušiť odparením nadbytočného obsahu vody vo vákuovej odparke alebo odsatím nadbytočnej vody na frite a suspendovaním častí gélu polysacharidu v etanole, alebo v acetóne a po odstránení nadbytočného množstva organického rozpúšťadla ďalším vysušením gélu na vákuovej odparke pri teplote 40 až 60 °C na zvyškovú vlhkosť 30 až 50 mg vody na 1 g gélu.

Takto pripravený a vysušený biologicky aktívny kryt na rany zaručuje snáďnú manipulovateľnosť vo výrobe a pri použití, rovnomerný tok pudru pri aplikácii na ranu, zamedzenie vstupu gélu a enzýmových proteínov do krvného obehu a neprítomnosť malých častí, tzv. fines frakcie gélu biopolyméru.

Častice o veľkosti 0,06 až 0,3 mm sa nezachytávajú v povrchovej štruktúre rany. Lýzu mikrofóry Gram pozitívnych baktérií zodpovedných za hnisavý charakter rán zabezpečuje imobilizovaný lysozým. Sorpčná schopnosť nosného gélu je až 15 ml.g⁻¹, čo je podstatne viac ako sorpčná schopnosť nativných biopolymérov alebo perlovej celulózy.

Pri aplikácii biologicky aktívneho krytu na rany, pripraveného na báze imobilizovaného chymotrypsínu alebo trypsínu a lysozýmu na géli zo sieťovanej celulózy, hydroxyetylcelulózy, škrobu alebo agaru sa pozoroval výrazný proteolytický účinok na nekrotické tkanivo charakterizovaný 300 až 600 mg hydrolyzovaného proteínu (albumín hovädzieho alebo ľudského séra, denaturovaný kolagén) 1 g suchej hmotnosti gélu za 1 hodinu.

Použité gély preukázali vysokú sorpčnú schopnosť pri nasávaní exudátov z rany (až 15 g exudátu na 1 g suchej hmotnosti gélu) a imobilizovaný lysozým spôsobil pokles sledovaných stafylokokov a streptokokov o 95 % (charakterizované 150 mg lyzovaných buniek *Micrococcus luteus* a až 100 mg *Staphylococcus aureus* v suchej hmotnosti za 1 hodinu 1 g suchej hmotnosti gélu).

Príklad 1

100 g mikrokryštalickej celulózy zosiete-nej s 10 % hmot. 2-chlórmetyloxiránom s napúšťacím objemom 5 ml.g⁻¹ a veľkosťou častíc 0,05 až 0,3 mm sa alkalizuje 1 h pri teplote 20 °C so 100 ml vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 20 % hmotnostných. Potom sa pridá k reakčnej zmesi 25 ml 2-chlórmetyloxiránu a nechá sa reagovať 6 h pri teplote 15 °C za stáleho miešania.

Ďalej sa rekčná zmes neutralizuje vodným roztokom kyseliny octovej na indikátor fenolftaleín, vzniklé soli sa vymyjú destilovanou vodou. Po vymytí nezreagovaných chemikálií sa pridá k vymytmému gélu roztok chymotrypsínu a lysozýmu vo fosfátovom tlmivom roztoku (10 mmól.l⁻¹, pH 7,6, 300 ml) o aktivite chymotrypsínu 1300 mg hydrolyzovaného albumínu hovädzieho séra za 1 h a aktivite lysozýmu 650 mg lýzovaných buniek *Micrococcus luteus* za 1 h. Takto pripravená suspenzia sa nechá pretrepávať na reciprokej trepačke (frekvencia 1 Hz, amplitúda 20 cm) po dobu 6 h pri teplote 20 °C.

Nezreagovaný chymotrypsín a lysozým sa vymývali 2 000 ml fosfátového tlmivého roztoku o pH 7,6 (10 mmól.l⁻¹), potom 2 000 mililitrov citrát fosfátového roztoku 50 mmól.l⁻¹; pH 5,5) a nakoniec destilovanou vodou (4 000 ml). Odvodnenie gélu sa zabezpečilo postupným vymývaním gélu zmesou etanol—voda (1 000 ml; najprv 30 objemových dielov etanolu a 70 objemových dielov vody; ďalej 70 objemových dielov etanolu a 30 objemových dielov vody a nakoniec 96 objemovými dielmi etanolu a 4 objemovými dielmi vody).

Odvodnený gél sa vysušil najprv na vzduchu a potom v rotačnej vákuovej odparke pri teplote 50 °C. Sterilizácia hotového proteolytického krytu na rany sa zabezpečila gama-žiarením, dávkou 25 kGy v polyetylénových zatavených vreckách. Takto pripravený proteolytický kryt neobsahoval voľné oxiránové skupiny ani neiónizované formy chlóru. Nezreagovaný 2-chlórmetyloxirán sa rozložil jednak na glycerol a ten sa vymyl pri spracovaní gélu. Nezreagovaný metyloxiránový substituent na povrchu gélu zhydrolyzoval na 1,2-dihydroxypropylový substituent.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom,

že ako polysacharid sa použije prášková hydroxyetylcelulóza zosietená s 2-chlórmetyloxiránom na napúšťací objem 15 ml.g⁻¹ a aktivácia s 2-chlórmetyloxiránom sa prevádza pri teplote 25 °C po dobu 3 h.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako enzýmový nosič sa použije sieťovaný agar s 2-chlórmetyloxiránom o stupni sieťovania 0,03 priečných väzieb na jednu anhydroglukozylovú jednotku a napúšťacom objeme 15 ml.g⁻¹. K imobilizácii sa použila zmes subtilizínu a lysozýmu v pomeroch tak, ako je uvedené v príklade 1. Vysušený preparát mal aktivitu 300 mg hydrolyzovaného albumínu hovädzieho séra za 1 h na 1 g suchej hmotnosti a 150 mg suchých buniek *Micrococcus luteus* lýzovaných za 1 h 1 g imobilizovaného preparátu pri 37 °C.

Príklad 4

Postupuje sa podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že k imobilizácii sa použije papín a ako enzýmový nosič sa použil zemiakový škrob sieťovaný 2-chlórmetyloxiránom na napúšťací objem 5 ml.g⁻¹. Naviazanie enzýmu prebehlo pri teplote 40 °C po dobu 3 h. Odvodnenie sa zabezpečilo, ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použili vodné roztoky acetónu. Výsledný enzýmový preparát mal aktivitu imobilizovaného papánu 50 mg hydrolyzovaného albumínu hovädzieho séra za 1 h na 1 g a 12,5 miligramov lýzovaných buniek *Micrococcus luteus* za 1 h na 1 g suchého preparátu pri teplote 37 °C.

Príklad 5

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že ako nosič sa použije sieťovaný α -1,4,6-glukan-pululán o stupni sieťovania 0,03 a napúšťacom objeme 15 ml.g⁻¹. Výsledná aktivita imobilizovaných enzýmových preparátov bola 290 mg hydrolyzovaného albumínu hovädzieho séra za 1 h na 1 g suchej hmotnosti a 143 mg lýzovaných buniek *Micrococcus luteus* za 1 h na 1 g suchého imobilizovaného preparátu.

Vynález má prípadné využitie na chirurgických oddeleniach, na klinikách špecializovaných na civilné a profesionálne úrazy, ale aj vo veterinárnom lekárstve.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy biologicky aktívneho krytu na rany vyznačený tým, že práškový polysacharid, ako škrob, celulóza, agar, lichenan s veľkosťou častíc 0,06 až 0,3 mm zosietený s 2-chlórmetyloxiránom na hydrofilný gél o stupni napúčania 4 až 15 ml.g⁻¹ sa aktivuje pri teplote 10 až 25 °C po dobu 2 až 4 h v prítomnosti hydroxidu sodného s 2-chlórmetyloxiránom, načo sa aktivovaný gél obsahujúci 0,05 až 0,3 mmól.g⁻¹ oxiránových funkčných skupín premyje do neutrálnej reakcie a nechá sa reagovať s roz-

tokom proteolytických enzýmov, ako chymotrypsín, trypsin, subtilizín a lysozým v pomere aktivít proteolytických enzýmov k lysozýmu 2 až 4 ku 1, pri teplote 20 až 40 °C po dobu 3 až 6 h, načosa polysacharidový gél s naviazanými enzýmami zbaví voľných enzýmov premývaním, na to sa gél odvodní premývaním organických rozpúšťadlom, s výhodou etanolom a/alebo acetónom a suchý gél sa nakoniec sterilizuje rádioaktívnym γ -žiarením.