

ПРОБЛЕМЫ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПЕРЕВЯЗОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ

А.А. Белов, профессор Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, д-р техн. наук, belov.a.a@muctr.ru

Рецензент: И.С. Фадеева, ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, канд. биол. наук, fadeeva.iteb@gmail.com

Создание ранозаживляющих препаратов на основе ферментов и других терапевтических агентов является актуальной задачей современной медицинской биотехнологии. Показано, что ферменты являются наиболее лабильными компонентами в разрабатываемых препаратах. В качестве носителя предложено использовать диальдегидцеллюлозу, стабилизирующее вещество хитозан и его производные.

С использованием различных физических и физико-химических методов анализа показано изменение основных физических и биохимических параметров, влияющих на процесс получения, хранения и использования производимых биологически активных медицинских перевязочных материалов. Полученные результаты могут использоваться при разработке и промышленном выпуске медицинских биологически активных перевязочных материалов.

Ключевые слова: биомедицина, иммобилизованные ферменты, протеазы, антиоксиданты, биоциды, хитозан, олигохиты, препараты для ранозаживления.

PROBLEMS OF CREATING BIOLOGICALLY ACTIVE MEDICAL DRESSINGS MATERIALS

A.A. Belov, Professor, D.I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Ph. D., belov.a.a@muctr.ru

The creation of wound healing drugs based on enzymes and other therapeutic agents is an urgent task of modern medical biotechnology. It has been shown that enzymes are the most labile components in the studied preparations. It is proposed to use dialdehyde cellulose, a stabilizing substance chitosan and its derivatives as a carrier.

Using various physical and physico-chemical methods of analysis, changes in the basic physical and biochemical parameters affecting the process of obtaining and using biologically active medical dressings materials are shown. The results obtained can be used in the development and industrial production of medical biologically active dressings materials.

Keywords: biomedicine, immobilized enzymes, proteases, antioxidants, biocides, chitosan, oligochites, preparations for wound healing.

Введение

Перевязочные материалы для лечения гнойно-некротических и ожоговых ран занимают значительное место среди медицинских изделий с терапевтическим эффектом. Подобные материалы применяются локально, что подразумевает направленное (целевое) действие активного вещества, способны ускорять процесс заживления и регенерации поврежденных тканей за счет препаратов, которые могут быть включены в эти композиции [1, 2].

Применение перевязочных материалов определяется избирательным воздействием введенных в них лекарственных средств, специфичностью их действия, характером патологического процесса. Для лечения гнойных ран показано применение иммобилизованных полиферментных препаратов протеаз в сочетании с различными терапевтическими средствами [2, 3].

Известен положительный эффект влияния антиоксидантов на заживление гнойных ран, ожогов, трофических язв и их предотвращение [2, 4, 5]. В настоящее время установлено, что возникновение и развитие широкого круга воспалительных заболеваний сопровождается активацией свободно-радикальных реакций (СРР) перекисного окисления липидов (ПОЛ), денатурации белков и нуклеиновых кислот. Образующиеся в клетке первичные радикалы могут инициировать вторичные свободно-радикальные реакции, вступая во взаимодействие с различными клеточными компонентами: белками, нуклеиновыми кислотами и липидами. В результате этих СРР происходит деградация молекул-мишеней с образованием более или менее стабильных продуктов реакций, идентификация и определение количества которых может быть параметром или маркером, определяющим скорость СРР. В настоящее время хорошо известно, что возникновение и развитие широкого круга различных заболеваний сопровождается активацией СРР. Не составляют исключения и процессы, протекающие при заживлении ран [6–9]. Широкое распространение синдрома активации СРР привело к тому, что в литературе появился термин «воспалительные заболевания, вызванные свободными радикалами» [10].

Процесс заживления ран, особенно стадия воспаления, идет в условиях активации СРР [11]. Гиперпродукция в ране свободных радикалов, снижение активности эндогенных антиоксидантов сдвигают существующее в норме равновесие в сторону ускорения СРР, что является патогенетическим обоснованием применения экзогенных ингибиторов СРР в качестве препаратов, способствующих быстрейшему заживлению раны. Имеется ряд сообщений об антиоксидантной терапии ран [11, 12].

С момента образования раневого дефекта отмечается существенное уменьшение активности сбалансированной эндогенной системы АО (антиоксидант). Нарушение регуляции свободно-радикальных процессов усугубляется в хронической ране, формирование которой может быть следствием нарушения венозного и артериального кровотока, метаболических нарушений (диабет), и/или иммунологических нарушений [4, 12–14]. Все хронические раны характеризуются незавершенным воспалением [12].

Современные раневые биологически активные покрытия должны обладать целым комплексом свойств [2, 6], обеспечивающих лечебный эффект на каждой стадии раневого процесса [15, 16]. Для создания таких материалов целесообразно использовать многокомпонентные композиции, составляющие которых или их сочетания обеспечивают достижение заданных свойств перевязочных материалов. Применение ферментсодержащих хитозановых композиций в качестве покрытий на рану позволит достичь комплексного результата – осуществить пролонгированную энзимотерапию, антимикробное воздействие и эффективное удаление некротических масс. Однако эти сообщения о современной тенденции создания биологически активных материалов для хирургии носят в основном предварительный характер. Многие исследования и разработки после их создания еще не вышли из стен лабораторий, а сами материалы не прошли токсикологические и медико-биологические исследования [2, 6, 17].

На российском рынке промышленных ферментов, особенно медицинского назначения, в настоящее время ощущается дефицит ферментов и ферментных препаратов [18]. Растительные цистеиновые протеазы являются легкодоступными, относительно дешевыми, промышленно выпускаемыми и широко применяемыми в медицине и косметологии ферментами. Главным их недостатком являются неустойчивость к воздействию денатурирующих факторов окружающей среды, они легко инактивируются при хранении и использовании, поэтому целесообразно их иммобилизовать в присутствии стабилизатора на матрице различных носителей [19, 20]. Иммобилизация должна приводить к увеличению термической

стабильности фермента, дать возможность осуществлять его адресную доставку, фиксацию в определенном участке организма. Основная проблема — потеря биологической активности при иммобилизации, хранении и в процессе использования [2, 21].

Несмотря на многие сложности в работе с иммобилизованными биологически активными соединениями, создание терапевтических повязок с включением различных терапевтических агентов (в том числе и ферментов) является очень перспективным и развивающимся направлением медицины. Возможность фиксации терапевтического агента на подходящем носителе позволяет уменьшить расход лекарственного препарата в 10–30 раз, предупреждая побочные реакции и снижая стоимость готовой продукции, что делает ее доступной для простого населения. Разрабатываемые материалы для лечения ран, содержащие антиоксиданты, биоциды и ферменты, длительное время (не менее 3 лет) должны сохранять свою биологическую активность, как антиоксидантную, так и протеолитическую, способствовать формированию грануляционной ткани и началу краевой эпителизации после первых суток применения, отличаться существенным уменьшением болевых ощущений за счет отсутствия адгезии материала на ране, пролонгированным действием и сокращением сроков заживления ран [2, 11, 19].

Одной из основных проблем в технологии производства медицинских материалов, содержащих биологически активные соединения для лечения ран различной этиологии, является потеря их биологической активности при изготовлении (иммобилизации), стерилизации, использовании и хранении препаратов. Обычно активность снижается при эксплуатации системы пациентами под воздействием температуры тела человека, pH раны, различных ингибиторов и т. д. [2, 21, 22].

Сложность производства подобных материалов состоит и в том, что разработчик должен обеспечить необходимое и контролируемое высвобождение активного соединения (терапевтического агента — ТА), одновременно сохраняя другие свойства ранозаживляющих композиций [2, 23]. Одним из таких свойств является биологическая активность, которая должна быть максимально реализована в ране, так как подобные биоматериалы являются одноразовыми инструментами с небольшим сроком действия [2, 21].

При разработке и изучении свойств ранозаживляющих препаратов биологическая активность терапевтической композиции обычно исследуется со стороны трех составляющих: протеолитической активности (способность препарата очищать рану от некротических и нежизнеспособных клеток, раневых экссудатов, гнойных детритов, сгустков крови), антиоксидантной активности (предупреждение развития свободно-радикальных реакций в процессе перекисного окисления липидов в очаге воспаления) и антибактериальных свойств (нейтрализация и сорбция микробных клеток, активация фагоцитов и макрофагов) [2, 5, 15, 16]. Очень остро стоит вопрос о минимальном и максимальном количестве единиц ферментативной, антиоксидантной и биоцидной активности на единицу изделия.

Сложность изучения лекарственных материалов, направленных на терапию гнойно-некротических ран, заключается и в том, что необходимо проанализировать не только изменение биологической активности каждого отдельного компонента ранозаживляющей композиции при иммобилизации, высушивании, хранении и применении терапевтического средства, но и влияние компонентов препарата друг на друга. Кроме того, при разработке многофункциональных терапевтических покрытий важно учитывать механизм работы активных веществ ранозаживляющей композиции, их возможность воздействовать на несколько мишеней воспаления одновременно, при этом обладая высокой специфичностью и обеспечивая должный фармакологический эффект [24].

Создание многоцелевых перевязочных лечебных материалов для ран и ожогов позволяет заменить прием нескольких средств, способствующих ранозаживлению, уменьшить нагрузку на организм человека за счет комплексной терапии и снизить риски возникновения осложнений при несовместимости с другими лекарственными веществами при раздельном

применении, поэтому исследование свойств и синтез материалов на основе различных полимеров с иммобилизованными ферментами, антиоксидантами и биоцидами является очень актуальной проблемой в современной медицине [1–3, 11, 19, 22, 23].

В настоящее время существует большое количество различных форм препаратов для лечения ран. Средства для ранозаживления преимущественно представляют собой перевязочные материалы (марлю, сетку, трикотаж, нетканый материал) с иммобилизованными терапевтическими агентами, а также порошки, пленки, губки, гидроколлоиды, гели, пасты и компанды из различных материалов [25–27], применяемые в зависимости от степени тяжести раневого поражения.

Определяющая роль в ранозаживлении принадлежит носителю, на котором иммобилизовано лекарственное средство. От него зависят скорость и полнота высвобождения действующего вещества в организме, степень терапевтической эффективности препарата [2, 12, 13].

Один из самых распространенных видов материалов для обработки раны основан на целлюлозе и ее производных [1, 4]. Она гидрофильна, имеет большое количество гидроксильных групп, поэтому легко подвергается активации. Модификация целлюлозы обеспечивает различные ее свойства. Материалы на основе перйодат-окисленной целлюлозы (диальдегидцеллюлоза-ДАЦ), содержащие различные терапевтические агенты, могут быть использованы в виде аппликаций, ваты, корпии или порошка, как перевязочные или косметологические средства для лечения и профилактики пролежней, гнойно-некротических, ожоговых и других ран. Для стерилизации иммобилизованных БАВ нами используется гамма-облучение в дозе 25 кГрей при 293 К. Разрабатываемые препараты являются раневыми покрытиями нового типа, они позволяют снизить лекарственную нагрузку (до 10–30 раз), сокращают сроки заживления ран в 1,5–2,0 раза, не вызывая аллергических реакций [2].

Цель данного исследования – выявление причин инактивации использованных ТА (в первую очередь ферментов) в процессе создания, хранения и использования биологически активных перевязочных медицинских материалов.

Материалы и методы

В работе использовали: хитозан (Хт) производства НПО «Биопрогресс» (г. Щелково, Московская область (МО), РФ) (влажность препарата 10 %, степень деацилирования 80,0 %; кинематическая вязкость не менее 383,7 сСт; молекулярная масса около 500 кДа); папаин (Пап) (Китай) 600 TU/mg (протеолитическая активность по казеину 0,4 ПЕ/мг; активность по ВАрНа 0,1 нМоль/мг·мин; активность по азоколу 20 ЕД/мг; L-цистеин – «Диаэм» (Швейцария), ХЧ; формальдегид – 37 % масс. водный раствор (Sigma – Aldrich, USA); ВАрНа – N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид (Acros organics, Lot A0307386); казеин по Гаммерстену (Sigma – Aldrich, USA); ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида DPPH (0.2 mMol/l) (производство – Aldrich) был приготовлен в 96 %-м этаноле.

Все остальные реактивы, если не оговорено особо, отечественного производства, квалификации не ниже ХЧ.

Спектры ИК получали на ИК Фурье-спектрометре Nicolet 380 (Thermo Scientific, США) методом НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) в диапазоне 550–4000 см⁻¹ на приставке, где в качестве оптического материала используется кристалл селенида цинка (ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева).

УФ-вид измерения выполнялись с помощью регистрирующего спектрофотометра фирмы Shimadzu UV-2600 (Япония) в термостатируемой ячейке (ТСС-240А).

Дзета-потенциал и средний размер частиц были измерены на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

Ферментативные активности определяли аналогично [2, 22], используя в качестве субстрата либо казеин, либо азоколл, либо ВАрНа в 1/15М фосфатном буфере (ФБ) pH 8.0.

Для определения антиоксидантной активности (АОА) использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [19, 22].

Имобилизацию на нерастворимые носители проводили аналогично [2].

Имобилизацию в хитозан проводили, сливая растворы заданной концентрации Хт и ТА. Для получения препаратов в виде пленок раствор необходимого состава наносили пипетманом на чистую полиэтиленовую подложку и высушивали на воздухе, хранили в закрытом виде при комнатной температуре, в темноте. В специально проведенных опытах было установлено отсутствие влияния полиэтиленовой подложки на ферментативные активности использованных энзимов.

Поверхность препаратов исследовали с использованием микроскопа JSM JEOL 6510LV (JEOL, Япония). Подготовку образцов осуществляли путем нанесения на них слоя платины толщиной 10 нм на установке магнетронного напыления JFC-1600 (JEOL, Япония). Напыление проводили в вакууме (5 Па) при токе 30 мА и продолжительности 20 с. В качестве продувочного газа использовали аргон. Съемку образцов проводили в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Исследования по методу сканирующей электронной микроскопии выполнялись на оборудовании Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Образцы для АСМ были получены следующим образом: волокно расщеплялось на отдельные нити и закреплялось на сапфировой подложке с помощью двустороннего скотча.

Сканирование проводилось в нескольких местах и в разных масштабах, для того чтобы убедиться в показательности полученных АСМ-изображений. Для изучения характеристик поверхности целлюлозных волокон был использован атомно-силовой микроскоп Ntegra Prima (NT-MDT, Россия, г. Зеленоград), который был оснащен сканером и кремниевым кантилевером НА_NC Etalon (длина консоли 124 мкм, силовая константа 3,5 Н/м, резонансная частота 140 кГц). Радиус закругления иглы – менее 10 нм в соответствии с производственной спецификацией. Все изображения были получены на воздухе при комнатной температуре с относительной влажностью образцов менее чем 5%. Сканирование в режиме реального времени проводили со скоростью сканирования 1,0 Гц. Обработка полученных изображений проводилась с помощью программного комплекса NOVA и Image Analysis.

Экспериментальная часть

В предыдущих [2, 11, 19, 21, 22, 29] наших работах был обоснован выбор в качестве носителя ТА периодат-окисленной целлюлозы (ДАЦ) с иммобилизованным на ней хитозаном (Хт). Для выяснения возможных схем строения создаваемых препаратов на основе ДАЦ-Хт-ТА и их поведения в растворе (модель гнойной раны) в качестве моделей нами были взяты сами носители, ТА- и Хт-пленки, содержащие и не содержащие как индивидуальные ТА, так и их различные комбинации [30].

Химия полимерных лекарственных препаратов – интенсивно развивающаяся область науки, позволившая осуществить прорыв в лечении гнойных ран, наиболее опасных вирусных и онкологических заболеваний [2, 31]. В соответствии с классической теорией, предложенной Х. Рингсдорфом в середине 1980-х гг., физиологически активные полимеры (ФАП) прививочного типа можно синтезировать путем присоединения терапевтического агента (ТА) к полимеру-носителю гидролизуемой химической связью (рис. 1) – депо-препараты.

Причем в первоначально предложенной схеме носитель должен быть инертным. В современных депо-препаратах спейсер может отсутствовать, и ТА может быть напрямую иммобилизован на носителе. В качестве спейсера может быть использован какой-либо ТА или пролекарство (в нашем случае это ДАЦ и хитозан). И, по современным представлениям, создаваемый препарат может (должен) содержать не один, а несколько ТА [5, 7, 11]. В качестве носителя в данной работе использовалась ДАЦ, спейсера – хитозан, а ТА – ферменты (различные протеазы), биоциды (мирамистин) и антиоксиданты (мексидол, дигидрокверцетин). Ранее нами была показана необходимость использования спейсера при иммобилизации ферментов (наиболее лабильных ТА) на целлюлозу и особенно ее производные (ДАЦ) [2, 21, 30].

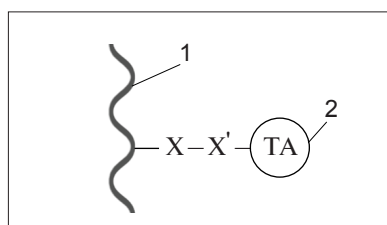


Рис. 1. Строение иммобилизованных препаратов (депо-препараты) по Х. Рингсдорфу

1 — полимер-носитель; 2 — терапевтический агент; X — ковалентная связь между полимером-носителем и спейсером; X' — химическая связь между спейсером и ТА

На рис. 2 приведены значения падения ферментативной активности (A/A_0) иммобилизованных на ДАЦ протеаз в процессе иммобилизации, высушивания и хранения.

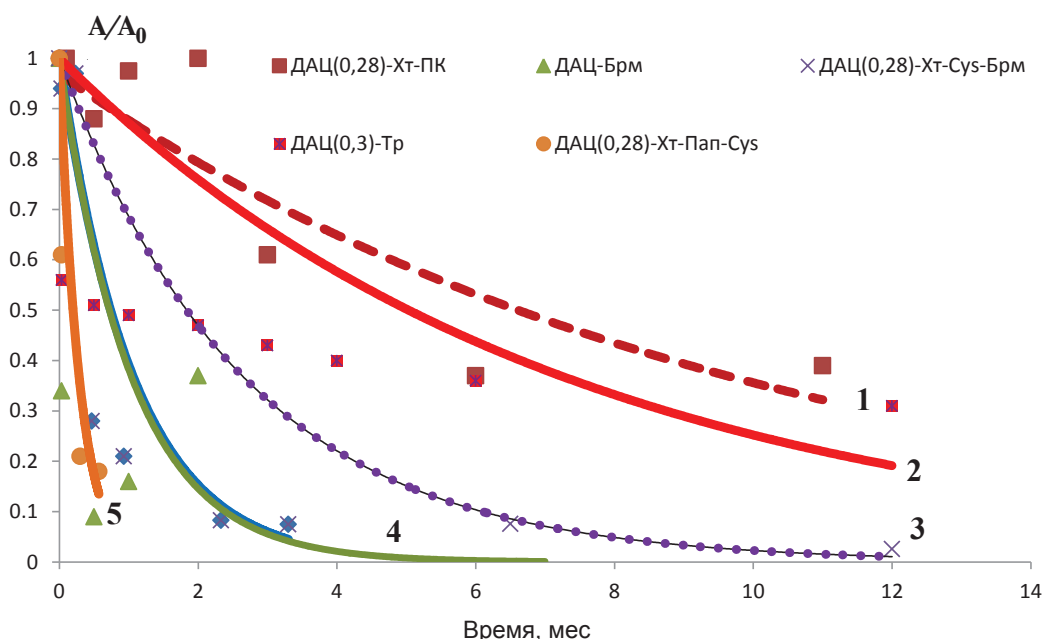


Рис. 2. Падение ферментативной активности (A/A_0) ряда протеаз в процессе хранения при комнатной температуре, в темноте (в скобках указано количество альдегидных групп мМ на грамм носителя)

1 — ДАЦ(0.28)-Хт-ПК — протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба, иммобилизованный на ДАЦ в присутствии хитозана; 2 — ДАЦ(0.3)-Тр — трипсин, иммобилизованный на ДАЦ; 3 — ДАЦ(0.28)-Хт-Сус-Брм — бромелаин, иммобилизованный на ДАЦ в присутствии хитозана и цистеина; 4 — ДАЦ(0.28)-Брм — бромелаин, иммобилизованный на ДАЦ; 5 — ДАЦ(0.28)-Хт-Пап-Сус — папаин, иммобилизованный на ДАЦ в присутствии хитозана и цистеина

Как было показано ранее [2, 23, 25, 26, 33] при иммобилизации протеаз на ДАЦ различной степени окисления в процессе высушивания и хранения происходит значительное падение ферментативной активности ферментов. Мы это связываем с отрицательным действием альдегидных групп матрицы (либо продуктами их трансформации в процессе получе-

ния, хранения, использования или стерилизации) на ферменты. Это может происходить из-за влияния самой матрицы или ее компонентов, а также продуктов гидролитической деструкции в процессе иммобилизации или использования. Чаще всего взаимодействие альдегидсодержащих фрагментов с белками мы подробно рассматривали с позиций взаимодействия альдегида и аминокрупп аминокислотных остатков белков [2]. Хотя, как было отмечено во многих работах, альдегиды вступают в реакцию не только с активным водородом аминокруппы белков, но и сульфгидрильных связей, гуаниновых и фенольных групп [32–34]. Альдегиды в водной среде легко вступают в реакцию с аминокруппами белков (аминокислотных остатков) по схеме, представленной на рис. 3.



Рис. 3. Образование оснований Шиффа

Как следует из полученных данных (см. рис. 2), для тиоловых протеаз (бромелаин и папаин) падение ферментативной активности более драматично по сравнению с другими. Мы это связываем в первую очередь с модификацией тиоловых групп активного центра и инактивацией активатора (цистеин). Как следует из данных литературы [19, 36], количество цистеиновых остатков в изученных нами ферментах отличается незначительно [7–12]. Тиоловая группа цистеина легко подвергается как окислению, так и другим модификациям альдегидами [34].

В литературе показано, что взаимодействие ДАЦ и Хт приводит к упорядочению структуры хитозана, и она выше, чем при использовании низкомолекулярных альдегидов. Можно предположить, что ввиду большого размера макромолекул диальдегидов окисленных полисахаридов их диффузия в объем образца хитозана затруднена, поэтому модификация структуры происходит преимущественно в поверхностном и приповерхностном слоях, т.е. в меньшей степени, чем это могло бы быть при проникновении ДАЦ в объем образца [37]. Известно, что в препаратах диальдегидцеллюлозы альдегидные группы образуют внутри- и межмолекулярные ацетальные и полуацетальные связи, а также находятся в гидратированной форме и в свободном виде. Так, например, в высушенном препарате диальдегидцеллюлозы около 75 % альдегидных групп находятся в виде ацеталей, а 25 % — в свободном виде или в виде полуацеталей [37–40]. Отмечена их высокая реакционная способность.

Как было установлено в работе [37], после взаимодействия Хт с низкомолекулярными альдегидами (формальдегид, ацетальдегид, глутаровый диальдегид) не остается доступных аминокрупп в молекуле Хт, а после взаимодействия Хт и ДАЦ остается 60–65 % свободных аминокрупп. Это было подтверждено и в наших работах [30].

На рис. 4 и 5 приведены данные, полученные методами атомно-силовой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии соответственно. Анализ данных показал, что иммобилизация ТА происходит на поверхности волокна целлюлозы. Как видно из полученных данных, при перйодатном окислении на поверхности целлюлозы возникают каверны (трещины, разрывы), которые в процессе длительной гидролитической деструкции исчезают (см. рис. 5). Это может подтвердить выдвинутое нами предположение о переходе в раствор конгломератов, содержащих окисленные группы целлюлозы [2, 21, 30]. Причем увеличение степени окисления ДАЦ, рН и температуры раствора увеличивает скорость гидролитической деструкции [38].

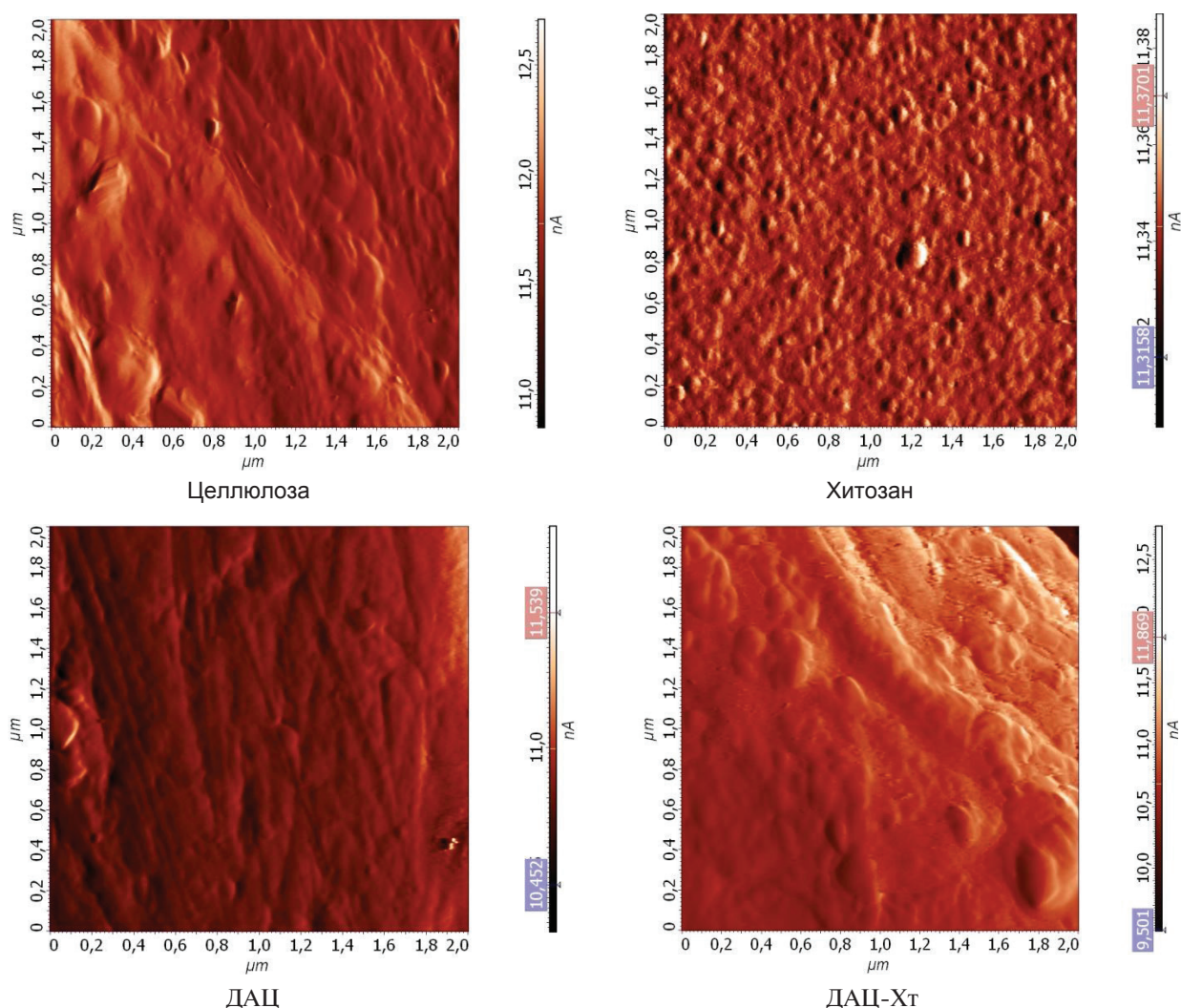


Рис. 4. Фотографии поверхности образцов, полученные методом атомно-силовой микроскопии

Альдегидные группы и ковалентно (химически) связанные с ДАЦ ТА распределены по макромолекуле неравномерно. При гидролитической деструкции производных ДАЦ в раствор переходят прежде всего участки с высокой концентрацией ТА – короткие олигомеры с 1–2 молекулами ТА. В дальнейшем в раствор переходят все более крупные олигомеры [2, 38].

Как видно из рис. 4, окисление целлюлозы приводит к уменьшению ребристости структуры, что, вероятно, вызвано отщеплением фрагментов в результате разрывов в структуре матрицы. Имобилизация хитозана на носитель делает поверхность ДАЦ более бугристой, размеры конгломератов хитозана на поверхности волокон целлюлозы достигают 400 нм.

Анализ строения целлюлозных волокон, полученных с помощью СЭМ, также показывает нарушение структуры нативной целлюлозы после периодатного окисления. Данный факт неоднократно обсуждался в литературе [38], и с ним, на наш взгляд, связано изменение санитарно-химических и механических свойств периодат-окисленной целлюлозы по сравнению с нативной целлюлозой [2]. Имобилизация Хт на поверхности целлюлозы идет с образованием различных конгломератов. Имобилизация на поверхности ДАЦ-Хт фермента ведет к появлению более упорядоченной структуры конгломератов.

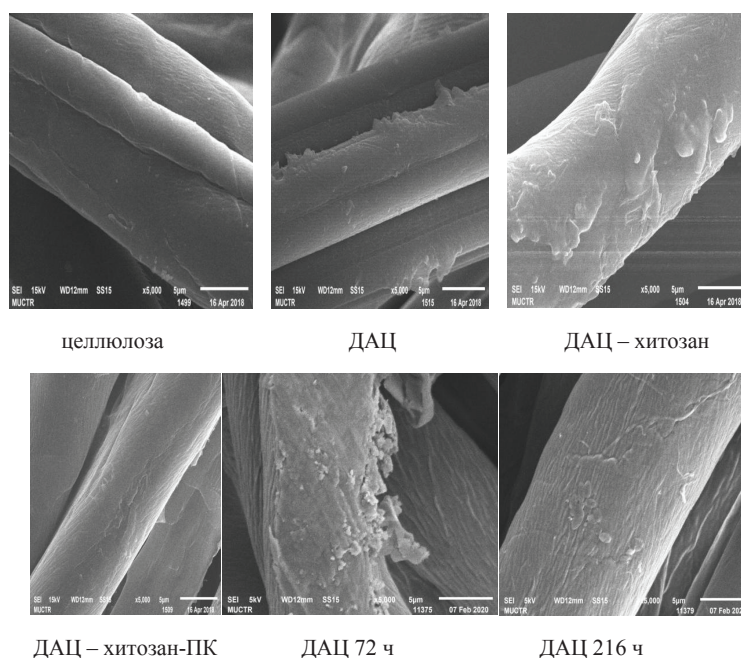


Рис. 5. СЭМ образцов ДАЦ (в скобках указано содержание альдегидных групп мМоль/г) при выдерживании в растворе 1/15М ФБ (рН 6,2 и 37°С)

В литературе и нами было показано, что в процессе гидролитической деструкции целлюлозы и ДАЦ в водной среде при физиологическом значении температуры и рН образуются различные соединения. Нами было показано [30], что продукты гидролитической деструкции ДАЦ обладают антиоксидантными и антимикробными свойствами. То есть ДАЦ сама является пролекарством. Для изучения гидролитической деструкции образцы целлюлозных носителей помещались в модельную среду 1/15М ФБ (рН 6.2 и 37°С) на определенные временные отрезки. Для детализации анализа был сделан широкий ряд спектров ДАЦ в течение 1, 2, 4, 6, 24, 48 ч. Полученные данные приведены на рис. 6.

Как видно из рис. 6, при помещении препаратов ДАЦ в модельную среду (1/15М ФБ рН 6.2 и 37°С) в растворе появляются различные соединения. Идет распад ДАЦ. Это, с одной стороны, является недостатком наших изделий (бустер-эффект – неконтролируемый выход иммобилизованных ТА), но, с другой стороны, эта «ударная доза» ТА и начинает терапевтическое действие (в том числе взаимодействие с различными тканевыми ингибиторами). Образование сильной химической (амидной) связи между ТА и Хт будет способствовать понижению растворимости Хт-конгломератов [30]. В литературе показано, что в композициях на основе Хт в процессе получения, высушивания и эксплуатации возможно образование различных внутренних амидных связей [30, 41].

Увеличение интенсивности плеча спектра в области 240 нм свидетельствует о выделении в систему значимого количества осколков матрицы носителя, содержащих карбонильные группы [42], а образование и последующая интенсификация пика на 240 нм соответствуют енольным формам дикарбоновых соединений [30].

Нами было проведено исследование влияния продуктов гидролитической деструкции исследованных полисахаридных носителей, мономерных звеньев и формальдегида на протеолитическую активность различных ферментов, входящих в состав ранозаживляющей композиции. На рис. 7 и 8 в качестве примера использован папаин. На рис. 7 по оси Х отложена молярная концентрация формальдегида (мМолей в литре). На рис. 8 по оси Х отложена

теоретическая концентрация мкМ альдегидных групп, выделившихся с ДАЦ (расчет максимальной концентрации альдегидных групп: навеска ДАЦ, содержащая 0,6 мМ альдегидных групп на 1 г ДАЦ, заливалась ФБ 6,2, выдерживалась в термостате 37°C 24 ч, к раствору фермента добавляли разные аликвоты).

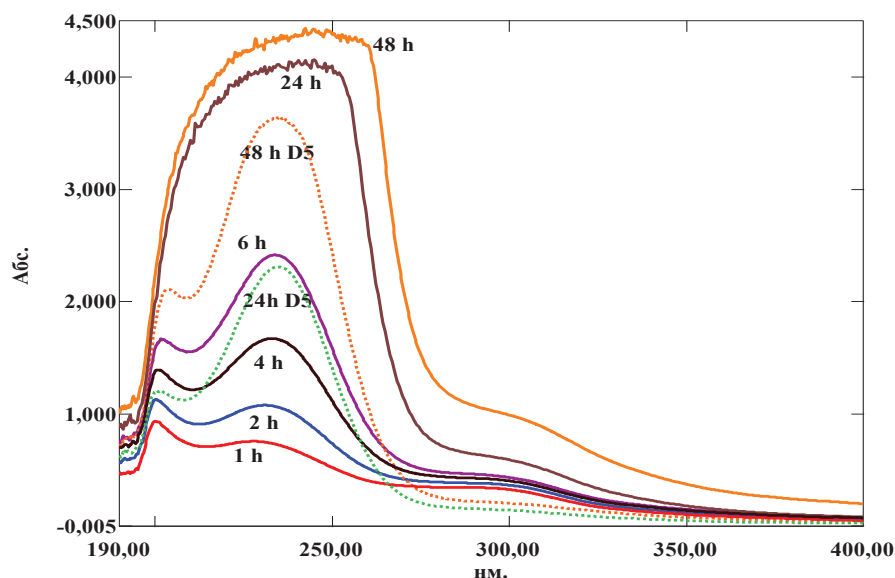


Рис. 6. УФ-вид спектры раствора 1/15М ФБ, в который была помещена ДАЦ (0,6) (вытяжек) при 37°C на определенное время. D5 – первоначальный раствор был разбавлен в 5 раз

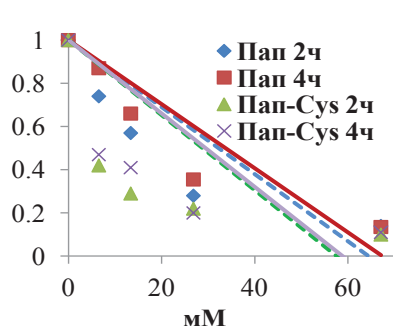


Рис. 7. Действие растворов формальдегида (A/Ao) на протеолитическую активность растворов папаина в присутствии и без цистеина в 1/15М ФБ 6,2

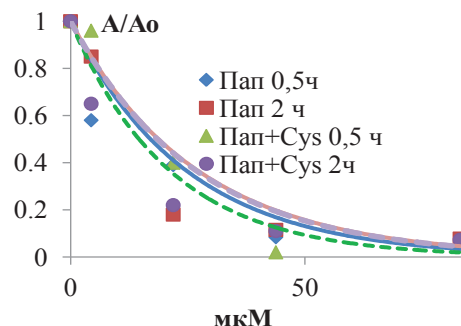


Рис. 8. Действие вытяжек ДАЦ (0,6) (37°C, 24 ч) на протеолитическую активность растворов папаина в присутствии и без цистеина в 1/15М ФБ 6,2; 0,5 и 2 ч время взаимодействия Пап с альдегидом

Добавление Хт в систему стабилизирует ферменты от инактивации, что может быть обусловлено образованием межмолекулярных связей без затрагивания активного центра.

Анализируя полученные экспериментальные данные (часть их представлена на рис. 6, 7, 8): на рис. 9 показано предположительное строение получаемых нами препаратов на основе целлюлозы, хитозана и различных терапевтических агентов.

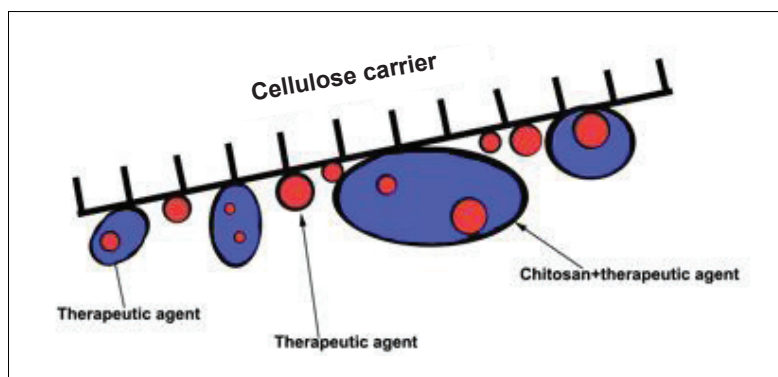


Рис. 9. Структура композиционных материалов ДАЦ-Хт-ТА

Как нами было установлено, даже при иммобилизации хитозанового геля, содержащего тот или иной терапевтический агент, последний может связываться непосредственно с носителем. Это отражается и на константах скорости инактивации при хранении, и также была показана убыль ТА из геля (при иммобилизации геля падение биологической активности в геле после иммобилизации, при сохранении биологической активности контрольного раствора геля).

Подобная схема (см. рис. 9) обладает рядом достоинств, среди которых: возможность совместной иммобилизации соединений, казалось бы, «несовместимых» из-за аннигиляции свойств друг друга (протеиназы и белки, например, инсулин), постепенный выход лекарственного средства в рану за счет неравномерной и продолжительной деструкции комплексного носителя (хитозанового геля и окисленной целлюлозной матрицы), что обеспечивает пролонгированное действие препарата, сокращение медикаментозной дозы лекарственного средства вследствие постоянного поступления активного вещества в место повреждения [2, 21]. Таким образом, можно говорить о возможности создания препарата для ранозаживления с заранее заданными свойствами, о способности прогнозировать выход лекарственного средства в рану и разработке материала разной сложности с разнообразным количеством лечебных компонентов для более полного и комплексного подхода к лечению ран разной природы и на разных стадиях раневого процесса.

В первой фазе раневого процесса патогенетически обоснованно применение тех или иных протеолитических ферментов, которые ускоряют очищение раны от гнойно-некротического содержимого и способствуют более раннему появлению грануляций и эпителизации, во второй фазе этого процесса угнетение активности протеолитических ферментов в ране с помощью ингибиторов является патогенетически обоснованным, стимулирующим процессы регенерации в ране, в несколько раз сокращающим сроки заживления [2].

Как было установлено во Всероссийском научно-исследовательском и испытательном институте медицинской техники (ВНИИИМТ), наши перевязочные материалы на основе целлюлозы и содержащие разнообразные ТА [2, 11, 29, 43], в том числе поливалентный ингибитор протеаз, ферменты и разнообразные ферментные комплексы, показали отсутствие цитотоксического эффекта (на половых клетках крупного рогатого скота) и гемолитическую активность экстрактов из материалов и изделий. Санитарно-химические испытания экстрактов из наших текстильных материалов показали их химическую стабильность (исследовали рН водной вытяжки, содержание восстановительных примесей, органических соединений).

В качестве примера ниже приведена часть полученных нами данных, в основном для самих носителей и иммобилизованных на них моноферментных препаратов. Основная часть данных представлена в работах [2, 11, 43].

Результаты санитарно-химических испытаний

Содержание в водных вытяжках из образцов материалов-носителей (стандартная марля, марля, окисленная перйодатом натрия, марля трикотажная, хлопчатобумажное волокно) восстановительных примесей, выраженное в объеме 0.02 н. раствора тиосульфата натрия, затраченного на их определение, составляло от 0.20 до 0.80 мл (допустимое – 1.00 мл). Изменение рН вытяжек в сравнении с контролем составляло от 0.12 до 0.85 (допустимое ± 1.00); рН вытяжек составляло от 5.06 до 6.24 (допустимое 3.0–9.0). Максимальная оптическая плотность в интервале длин волн 220–360 нм составляла от 0.088 до 0.140 (допустимое – 0.300).

Таким образом, результаты санитарно-химических испытаний позволяют отнести указанные материалы к химически достаточно стабильным.

Таблица 1

Масса тела и весовые коэффициенты внутренних органов мышей в остром эксперименте при внутрибрюшинном введении вытяжек из материалов-носителей и вытяжек из дальцекс-трипсина ($M \pm m$)

Показатели	ДАЦ				ДАЦ-Тр			
	самцы		самки		самцы		самки	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Масса тела	26.390 \pm 0.929	28.064 \pm 0.688	27.007 \pm 0.859	27.997 \pm 0.612	28.417 \pm 0.711	27.960 \pm 0.810	29.208 \pm 1.027	27.630 \pm 0.766
Внутренние органы:								
Печень	59.282 \pm 2.262	62.999 \pm 2.145	132.056 \pm 54.837	72.079 \pm 2.64	67.013 \pm 1.495	67.771 \pm 1.712	56.861 \pm 1.686	59.483 \pm 1.875
Селезенка	6.521 \pm 0.860	7.353 \pm 0.99	14.677 \pm 2.60	13.012 \pm 1.23	11.860 \pm 0.824	12.950 \pm 1.254	7.169 \pm 1.216	7.441 \pm 0.719
Почки	15.404 \pm 0.382	15.297 \pm 0.339	13.737 \pm 0.930	12.535 \pm 0.390	12.612 \pm 0.550	12.612 \pm 0.389	14.927 \pm 0.478	15.034 \pm 0.272

Цитотоксическое действие активированных носителей и препаратов на их основе изучали по тесту выживаемости клеток в культуре клеток линии Hela.

Метод

Приготовление вытяжек из образцов с дальцекс-трипсином проводили в среде «Игла» в течение 7 суток при температуре 37°C. Соотношение образца и объема жидкости (питательной среды) составляло 1 см²:1 мл. Длительность обработки клеток экстрактом – 24 часа.

Эксперименты проводили на культуре клеток линии Hela, растущих в монослое, в стадии логарифмического роста. Для этого суспензию одиночных клеток высевали в чашки Карреля в концентрации 200.000 клеток/чашка и инкубировали в течение 3 суток. На третьи сутки культивирования питательную среду заменяли экстрактом и оставляли на 24 часа при температуре 37°C. После окончания экспозиции монослой клеток Hela трипсинизировали, разводили в свежей питательной среде и высевали в концентрации 200.000 клеток в новые чашки Карреля. Через 4 суток инкубации культуру снимали со стекла, определяли коэффициент прироста популяции: отношение количества выросших клеток к числу посеянных. Величина коэффициента прироста является хорошим показателем цитотоксического действия любого повреждающего агента, так как гибель клеток всегда сопровождается снижением коэффициента прироста.

Результаты экспериментов (табл. 2) показывают, что цитотоксический эффект не наблюдается при воздействии экстрактов из образцов с ДАЦ-Тр.

Таблица 2

**Показатели крови у крыс в хроническом эксперименте при подкожном введении
вытяжек после восстановительного периода, (M±m)**

Показатели крови	самцы			самки		
	фон	контроль	опыт	фон	контроль	опыт
Лейкоциты, 10^9 /л	11.1±1.1	18.9±0.9	19±1.4	12.9±1.2	17±1.3	17±1.0
Эритроциты, 10^{12} /л	8.5±0.5	9±0.3	9±0.3	7.6±0.2	9±0.2	9±0.1
Гемоглобин г/л	130±0.9	144±5.0	150±5.3	130±13	137±2.6	140±2.9
Белок сыворотки %	8.2±0.6	8.6±0.1	8.4±0.09	8.1±0.2	8.7±0.1	9.0±0.2
Белковые фракции сыворотки %:						
Альбумины	44±1.2	36±1.1	39±2.4	44±1.9	37±1.9	37±1.1
α-1-глобулины	14±0.7	18±0.9	18±0.9	16±1.2	16±0.7	15±0.5
α-2-глобулины	9±0.8	9±0.5	9±0.5	10±0.4	9±0.9	9±0.5
β-глобулины	24±0.7	24±0.9	22±1.6	23±0.5	25±0.6	26±0.8
γ-глобулины	9±1.3	13±0.7	12±1.5	7±0.08	13±1.2	13±0.5
Глюкоза, ммоль/л	27.0±0.1	26±2.5	25±5.1	27±0.3	26±3.3	27±1.3
Холестерин, ммоль/л	4.25±0.2	4.0±0.7	4.7±0.3	4.2±0.2	4.0±0.4	4.1±0.4
ТГ, ммоль/л	2.6±0.06	2.8±0.4	2.4±0.4	1.7±0.07	1.9±0.2	2.0±0.2
Билирубин, мкмоль/л	2.3±0.2	2.4±1.1	2.3±1.9	2.0±0.8	2.8±0.9	3.2±0.3
СМ, Е	0.200±0.006	0.222±0.004	0.240±0.06	0.200±0.06	0.244±0.004	0.235±0.003
Мочевина, ммоль/л	12±0.85	14±2.6	15±1.1	15±1.7	12±1.6	13±3.4
Креатин, мкмоль/л	192±5.1	226±3.0	220±4.4	—	257±8.2	256±5.7
АЛТ, Е/л	53±3.3	63±3.1	61±6.5	63±1.0	70±8.2	68±3.7
АСТ, Е/л	200±1.0	168±15	160±6.6	218±10.8	217±8.9	200±6.1
ГГТ, Е/л	2.9±0.5	2.4±0.4	2.2±0.7	2.4±0.2	2.2±1.2	2.5±1.1
ЩФ, Е/л	380±0.5	390±28	378±32	371±11	392±70	382±48
ЛДГ, Е/л	1513±347	1940±217	1799±211	1929±213	2383±87	2189±97

Таблица 3

**Цитотоксическое действие активированных носителей и препаратов
на их основе по тесту выживаемости клеток в культуре ткани**

Название материала	Закисленность среды	Морфологические особенности роста культуры	Коэффициент прироста
Контроль	Среда физиологическая рН 7,2	Активная пролиферация, хороший монослой, клетки компактные, нормального вида	7,1±0,64
ДАЦ-Тр	Среда слегка подкисленная рН 6,0-6,5	Активная пролиферация, хороший монослой, клетки компактные, нормального вида	7,2±0,42

Таблица 4

Сравнение иммобилизованных препаратов для лечения ран

№ п/п	Группа животных, лечение	Количество животных, n	Очищение ран, сутки	Заживление ран, сутки
1	Контроль 1, без лечения	20	14,2±0,35	27,3±0,15
2	Контроль 2, диальдегидцеллюлоза	20	13,3±0,6	24,2±0,5
3	Группа 1, аппликация «ДАЦ-Тр»	20	4,8±0,4	16,2±0,3
4	Группа 2, аппликация «ДАЦ-Хт-ПК»	20	3,0±0,2	12,1±0,1

Аналогичные результаты получены для всех разработанных изделий. Получено положительное токсикологическое заключение на препарат ДАЦ-Хт-ПК.

Заключение

Показана возможность получения медицинских перевязочных материалов, содержащих различные биологически активные компоненты (в том числе ферменты) и сохраняющих свою биологическую активность в течение заданного срока в высушенном виде.

Результаты лечения экспериментальных животных с гнойными ранами новыми перевязочными материалами с протеолитической, антиоксидантной и антимикробной активностями продемонстрировали, что скорость заживления ран зависит не только от носителя, на котором иммобилизован терапевтический агент, но и от его происхождения. Это хорошо подтверждается клиническими наблюдениями. Применение ДАЦ замедляло очищение от гнойных и некротических масс и заживление ран в среднем на одни сутки по сравнению с группой, в которой раны покрывались ДАЦ-трипсином. Однако, полное заживление ран в этих группах наступало гораздо быстрее, чем в первой контрольной группе, заживление в которой происходило спонтанно ($P < 0,05$). Независимо от химических природных перевязочных материалов (раневых покрытий) во всех группах животных раны до лечения характеризовались выраженной воспалительной реакцией, наличием гнойно-некротического экссудата в области дна ран, края и окружающие их ткани были отечны. На третьи сутки лечения комплексными препаратами воспалительные явления были выражены слабее, чем в группах животных, где применялись только монопрепараты.

Список литературы

1. Луканина К.И. Разработка научных и технологических основ создания перевязочных средств из биодеструктируемых и биосовместимых волокнистых материалов на основе полилактида / автореф. дисс. ... канд. техн. наук. М., 2011. С. 24.
2. Белов А.А. Разработка промышленных технологий получения новых медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически активные белковые вещества / дисс. ... д-ра техн. наук. М.: ПХТУ, 2009. 385 с.
3. Antimicrobial Dressings. The Wound Care Applications // Edited by Raju Khan and Sorna Gowri. Academic Press. 2023. P. 270.
4. Grisham M.B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease // Lancet. 1994. Vol. 344. P. 859–862.
5. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? // Lancet. 1994. Vol. 344. P. 721–725.
6. Foschi D., Trabucchi E., Muzzati M., et al. The effects of oxygen free radicals on wound healing // Int. J Tissue React. 1988. V. 10. № 6. P. 373–379.
7. Arisawa S., Arisawa T., Ohashi N., et al. Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996. V. 23. № 3. P. 222–228.
8. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. С. 180–208.
9. Csilla K., Hallberg, Stefan D., Trocme, and Nassen H. Ansari / Acceleration of corneal wound healing in diabetic rats by antioxidant Trolox // Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1996. V. 93. № 1. P. 3–12.
10. Harman D. Free radical theory of aging: the free radical diseases // Age. 1984. V. 7. № 1. P. 111–137.
11. Медушева Е.О. Разработка, экспериментальное обоснование и внедрение в хирургическую практику раневых покрытий с комплексным некротическим, антимикробным и антиоксидантным действием (экспериментальное исследование) / дисс. ... д-ра мед. наук. М., 2004. 389 с.
12. Камаев М.Ф. Лечение ран антиоксидантами // Хирургия. 1975. № 4. С. 52–54.
13. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов // Успехи соврем. биол. 1999. Т. 119. № 5. С. 462–475.

14. Gorturk E., Turgut A., Baum C., Gunal I., Seber S., Gulbas Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats // *Acta orthop. Scand.* 1995. V. 66. № 5. P. 473–475.
15. Palamand S., Reed A.M., Weimann L.J. Testing intelligent wound dressings // *J. Biomater. Appl.* 1992. 6. P. 198–215.
16. Latba B., Ramakrishnan M., Jayaraman V., Babu M. The efficacy of trypsin:chymotrypsin preparation in the reduction of oxidative damage during burn injury // *Burns.* 1998. V. 24. № 6. P. 532–538.
17. Kas H.S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. Review // *J. Microencaps.* 1997. V. 14. № 6. P. 689–711.
18. Рынок ферментов в России – 2025. Показатели и прогнозы. URL: <https://bsmarket.ru/rynok-fermentov-vossii?yclid=10333875373291339775?print=1> (дата обращения: 14.04.2025).
19. Матиев О.В., Быкова А.А., Белов А.А. Синтез и исследование свойств композиционных материалов на основе целлюлозы и хитозана, содержащих различные терапевтические агенты. Часть 7. Влияние альдегидсодержащих веществ на сохранение ферментативных активностей цистеиновых полиферментных препаратов в процессе получения, хранения и эксплуатации // *Бутлеровские сообщения.* 2025. Т. 81. № 3. С. 89–101. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/25-81-3-89.
20. Antonello Mameli, Valentino Natoli, Cinzia Casu. Bromelain: an Overview of Applications in Medicine and Dentistry // *Biointerface research in applied chemistry.* 2021. Vol. 11. Issue 1. P. 8165–8170. URL: <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81658170> (дата обращения: 14.04.2025).
21. Dosadina E.E., Savelyeva E.E., Belov A.A. The effect of immobilization, drying and storage on the activity of proteinases immobilized on modified cellulose and chitosan // *Process Biochemistry.* 2018. 64. 213–220.
22. Ванюшенкова А.А., Шокодько М.И., Кушнерев К.С. и др. Использование наночастиц серебра и протеаз при создании новых биомедицинских материалов для ранозаживления // *Хим. пром. сегодня.* 2023. № 1. С. 14–23. DOI: 10.53884/27132854_2023_1_14
23. Vernikovskii B.V., Stepanova, E.F. Immobilized proteases for wound cleaning // *Russ. J. Gen. Chem.* 2012. 82. 572–578.
24. Serkov I.V. Synthesis and properties of biologically active compounds containing NO-donor fragment / abstract of dissertation for the degree of Doctor of Chemical Sciences. Chernogolovka, 2010. P. 50. Treatment strategies // *Mol Med.* 2011. 17. 113–125.
25. Gauglitz G.G., Korting H.C., Pavicic T., et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies // *Mol Med.* 2011. 17. 113–125.
26. Han S.-K. Interactive Wound Dressings // *Innovations and Advances in Wound Healing.* 2016. 5. 39–61.
27. Diomina N.B. Modern trends in development of the technology of matrix drug dosage forms with modified release (a review) // *Chem.-Pharm. J.* 2016. 50 (7). 44–50.
28. Mogosanu G.D., Grumezescu, A.M., Bejenaru L.E., Bejenaru C. Natural and synthetic polymers for drug delivery and targeting, in: / Grumezescu A.M. (Ed.), *Nanobiomaterials in Drug Delivery. Applications of Nanobiomaterials.* 2016. Vol. 9. Elsevier, New York. P. 229–284.
29. Белов А.А., Ванюшенкова А.А., Досадина Э.Э., Ханафина А.А. Новые текстильные перевязочные материалы на основе биodeградируемых полимеров, содержащих протеиназы, для лечения ран и ожогов // *Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка.* 2018. 5 (1). С. 16–26.
30. Ванюшенкова А.А., Досадина Э.Э., Белов А.А. и др. Синтез и исследование свойств композиционных материалов на основе целлюлозы и хитозана, содержащих различные терапевтические агенты. Часть 2. Влияние хитозана на деструкцию целлюлозных носителей и кинетику выхода терапевтического агента в модельной среде // *Бутлеровские сообщения.* 2019. Т. 57. № 3. С. 105–119. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/19-57-3-105.
31. Круппа И.С. Полисахаридные полимеры-носители для физиологически активных нафталидегидов / дисс. канд. хим. наук. М.: ПХТУ, 2017. С. 137.
32. Pravina Piste Cysteine – master antioxidant // *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences.* 2013. 3 (1). P. 143–149.

33. Clare L. Hawkins, X Michael J. Davies Detection, Identification, and quantification of oxidative protein modifications // J. Biol. Chem. 2019. 294 (51). P. 19683–19708. DOI: 10.1074/jbc.REV119.006217.
34. Jos J.A.G. Kamps, Richard J. Hopkinson, Christopher J. Schofield & Timothy D.W. Claridge How formaldehyde reacts with amino acids // Communications Chemistry. 2019-2. P. 126. URL: <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0224-2> (дата обращения: 14.04.2025).
35. Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies // Applied Microbiology and Biotechnology. June 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-5889.
36. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971. 404 с.
37. Чернышова Е.Б. Модификация пленочных материалов на основе хитозана низкомолекулярными и полимерными альдегидами / дисс. ... канд. хим. наук. Волгоград, 2018. 113 с.
38. Роговин З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия, 1972. С. 125–244.
39. Kim U.-J., Kim H.J., Choi J.W., Kimura S., Wada M. Cellulose-chitosan beads crosslinked by dialdehyde cellulose // Cellulose. 2017. Vol. 24. P. 5517–5528.
40. Song L., Cruz C., Farrah S.R., Baney R.H. Novel antiviral activity of dialdehyde starch // Electronic Journal of Biotechnology. 2009. V. 12. № 2. P. 1–5.
41. Нудьга Л.А., Петрова В.А., Гофман И.В. и др. Химические и структурные превращения в хитозановых пленках в процессе хранения // ЖПХ. 2008. Т. 81. Вып. 11. С. 1877–1881.
42. Singh M., Ray A.R., Vasudevan P., Verma K., Guha S.K. Potential biosoluble carriers // Biomaterials. 1979. Vol. 7. Is. 4. P. 495–512. URL: <https://doi.org/10.3109/10731197909118964> (дата обращения: 14.04.2025).
43. Белов А.А. Текстильные материалы, содержащие иммобилизованные гидролазы для медицинских и косметологических целей. Получение. Свойства. Применение // LAP LAMBERT Acad. Pub., GmbH & Co. KG, Germany, 2012. 242 с.

References

1. Lukanina K.I. (2011) *Razrabotka nauchnykh i tekhnologicheskikh osnov sozdaniya perevyazochnykh sredstv iz biodestruktiruemykh i biosovmestimyykh voloknistykh materialov na osnove polilaktida* [Development of scientific and technological bases for the creation of dressings from biodegradable and biocompatible fibrous materials based on polylactide] *Avto-ref. diss. ...kand. tekhn. nauk* [Author's abstract of diss. for a Doctor in Engineering]. Moscow. 2011. P. 24.
2. Belov A. (2009) *Razrabotka promyshlennykh tekhnologiy polucheniya novykh meditsinskikh materialov na osnove modifitsirovannykh voloknoobrazuyushchikh polimerov, sodержashchikh biologicheski aktivnye belkovye veshchestva* [Development of industrial technologies for obtaining new medical materials based on modified fiber-forming polymers containing biologically active protein substances] *Diss....d-ra tekhn. nauk. RKhTUA* [Diss. for a Ph.D. in Engineering. RUCTU]. Moscow. 385 p.
3. Antimicrobial Dressings. The Wound Care Applications. Edited by Raju Khan and Sorna Gowri, Academic Press. 2023. P. 270.
4. Grisham M.B. (1994) Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*. Vol. 344. P. 859–862.
5. Halliwell B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. Vol. 344. P. 721–725.
6. Foschi D., Trabucchi E., Muzzati M. et al (1988) The effects of oxygen free radicals on wound healing. *Int. J Tissue React*. V. 10. No. 6. P. 373–379.
7. Arisawa S., Arisawa T., Ohashi N et al (1996) Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodeling in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. V. 23. N 3. P. 222–228.
8. Osipov A.N., Azizova O.A., Vladimirov Yu.A. (1990) *Aktivnye formy kisloroda i ikh rol' v organizme* [Reactive oxygen species and their role in the body] *Uspekhi biol. khimii* [Uspekhi biol. chemistry]. V. 31. P. 180–208.
9. Csilla K. Hallberg, Stefan D. Trocme, and Nassen H. (1996) Ansari. Acceleration of corneal wound healing in diabetic rats by antioxidant Trolox. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. V. 93, No. 1, P. 3–12.

10. Harman D. (1984) Free radical theory of aging: the free radical diseases. *Age*. V. 7, No. 1. P. 111–137.
11. Medusheva E.O. (2004) *Razrabotka, eksperimental'noe obosnovanie i vnedrenie v khirurgicheskuyu praktiku ranevykh pokrytiy s kompleksnym nekroliticheskim, antimikrobnym i antioksidantnym deystviem (eksperimental'noe issledovanie)* [Development, experimental substantiation and introduction into surgical practice of wound coverings with complex necrolytic, antimicrobial and antioxidant action (experimental study)] *Diss. d-ra med. nauk* [Diss. Ph.D.]. Moscow. 389 p.
12. Kamaev M.F. (1975) *Lechenie ran antioksidantami* [Treatment of wounds with antioxidants] *Khirurgiya* [Surgery]. No. 4. P. 52–54.
13. Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. (1999) *Kletochnye mekhanizmy praiminga i aktivatsii fagotsitov* [Cellular mechanisms of priming and activation of phagocytes] *Uspekhi sovrem. biol.* [The successes of modern biology]. V. 119. No. 5. P. 462–475.
14. Gorturk E., Turgut A., Baum C., Gunal I., Seber S., Gulbas Z. (1995) Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta orthop. Scand*. V. 66. N. 5. P. 473–475.
15. Palamand S., Reed A.M., Weimann L.J. (1992) Testing intelligent wound dressings. *J. Biomater. Appl*, 6, P. 198–215.
16. Latba B., Ramakrishnan M., Jayaraman V., Babu M. (1998) The efficacy of trypsin: chymotrypsin preparation in the reduction of oxidative damage during burn injury. *Burns*. V. 24. No. 6. P. 532–538.
17. Kas H.S. (1997) Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. Review. *J. Microencaps.* V. 14. No. 6. P. 689–711.
18. *Rynok fermentov v Rossii – 2025* [The enzyme market in Russia – 2025] *Pokazateli i prognozy* [Indicators and forecasts]. Available at: <https://bsmarket.ru/rynok-fermentov-vossii?yclid=10333875373291339775?print=1> (date of access 14-04-2025).
19. Matiev O.V., Bykova A.A., Belov A.A. (2025) *Sintez i issledovanie svoystv kompozitsionnykh materialov na osnove tsellyulozy i khitozana, soderzhashchie razlichnye terapevticheskie agenty. Chast' 7. Vliyanie al'degidsoderzhashchikh veshchestv na sokhranenie fermentativnykh aktivnostey tsisteinovykh polifermentnykh preparatov v protsesse polucheniya, khraneniya i ekspluatatsii* [Synthesis and study of the properties of composite materials based on cellulose and chitosan containing various therapeutic agents. Part 7. Influence of aldehyde-containing substances on the preservation of enzymatic activities of cysteine polyezyme preparations during production, storage and operation] *Butlerovskie soobshcheniya* [Butlerov communications]. Vol. 81. No. 3. P. 89–101. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/25-81-3-89.
20. Antonello Mameli, Valentino Natoli (2021) Cinzia Casu Bromelain: an Overview of Applications in Medicine and Dentistry. *Biointerface research in applied chemistry*. 2021. Vol. 11. Issue 1. R. 8165–8170. Available at: <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81658170>.
21. Dosadina E.E., Savelyeva E.E. & Belov A.A. (2018) The effect of immobilization, drying and storage on the activity of proteinases immobilized on modified cellulose and chitosan. *Process Biochemistry*. 64. P. 213–220.
22. Vanyushenkova A.A., Shokodko M.I., Kushnerev K.S., et al. (2023) *Ispol'zovanie nanochastits serebra i proteaz pri sozdanii novykh biomeditsinskikh materialov dlya ranozazhivleniya* [Use of silver nanoparticles and proteases in the creation of new biomedical materials for wound healing] *Khim. prom. segodnya* [Chemical industry today]. No. 1. P. 14–23. DOI 10.53884/27132854_2023_1_14.
23. Vernikovskii B.V., Stepanova E.F. (2012) Immobilized proteases for wound cleaning. *Russ. J. Gen. Chem.* 82, 572–578.
24. Serkov I.V. (2010) Synthesis and properties of biologically active compounds containing NO-donor fragment. Abstract of dissertation for the degree of Doctor of Chemical Sciences, Chernogolovka. P. 50.
25. Gauglitz G.G., Korting H.C., Pavicic T., et al. (2011) Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med*. 2011.17. P. 113–125.
26. Han S.-K. (2016) *Interactive Wound Dressings. Innovations and Advances in Wound Healing*. 2016. 5. P. 39–61.
27. Diomina N.B. (2016) Modern trends in development of the technology of matrix drug dosage forms with modified release (a review). *Chem.-Pharm. J.* 50(7), P. 44–50.

28. Mogosanu G.D., Grumezescu A.M., Bejenaru L.E. and Bejenaru C. (2016) Natural and synthetic polymers for drug delivery and targeting. Ed. Grumezescu A.M. Nanobiomaterials in Drug Delivery. Applications of Nanobiomaterials. Vol. 9, Elsevier. New York. P. 229–284.
29. Belov A.A., Vanyushenkova A.A., Dosadina E.E., Khanafina A.A. (2018) *Novye tekstil'nye perev'yazochnye materialy na osnove biodegradiruemyykh polimerov, sodержashchikh proteiny, dlya lecheniya ran i ozhogov* [New textile dressings based on biodegradable polymers containing proteinases for the treatment of wounds and burns] *Rany i ranevye infektsii. Zhurnal im. prof. B.M. Kostyuchenka* [Wounds and wound infections. Journal named after prof. B.M. Kostyuchenok] 5 (1). P. 16–26.
30. Vanyushenkova A.A., Dosadina E.E., Belov A.A., et al. (2019) *Sintez i issledovanie svoystv kompozitsionnykh materialov na osnove tsellyulozy i khitozana sodержashchie razlichnye terapevticheskie agenty. Chast' 2. Vliyaniye khitozana na destruktivnyy tsellyuloznykh nositeley i kinetiku vykhoda terapevticheskogo agenta v model'noy srede* [Synthesis and study of the properties of composite materials based on cellulose and chitosan containing various therapeutic agents. Part 2. Effect of chitosan on the destruction of cellulose carriers and the kinetics of the release of the therapeutic agent in a model environment] *Butlerovskie soobshcheniya* [Butlerov communications]. Vol. 57. No. 3. P. 105–119. DOI: jbc-01/19-57-3-105.
31. Kruppa I.S. (2017) *Polisakhariidnye polimery-nositeli dlya fiziologicheskii aktivnykh naftal'degidov* [Polysaccharide polymer carriers for physiologically active naphthaldehydes] *Diss. kand. khim. nauk. RKhTU* [Diss. for the degree of Doctor. Chem. RUCTU]. Moscow. P. 137.
32. Pravina Piste Cysteine – master antioxidant. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences. 2013. 3(1). P. 143–149.
33. Clare L. Hawkins X, Michael J. Davies (2019) Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. J. Biol. Chem. 294(51), P. 19683–19708. DOI 10.1074/jbc.REV119.006217.
34. Jos J.A. Kamps G., Richard J. Hopkinson, Christopher J. Schofield & Timothy D.W. Claridge (2019) How formaldehyde reacts with amino acids. Communications Chemistry. 2019-2. P. 126. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0224-2>.
35. Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. Applied Microbiology and Biotechnology. June 2014 DOI: 10.1007/s00253-014-5889.
36. Mosolov V.V. (1971) *Proteoliticheskie fermenty* [Proteolytic enzymes] *Nauka* [Nauka]. Moscow. 404 p.
37. Chernyshova E.B. *Modifikatsiya plenoknykh materialov na osnove khitozana nizkomolekulyarnymi i polimernymi al'degidami* [Modification of film materials based on chitosan with low molecular weight and polymeric aldehydes] *Diss.... kand. khim. nauk.* [Diss. for Doctor in Chemistry]. Volgograd. 2018. 113 p.
38. Rogovin Z.A. (1972) *Khimiya tsellyulozy* [Cellulose chemistry] *Khimiya* [Chemistry]. Moscow. P. 125–244.
39. Kim U.-J., Kim H.J. Choi J.W., Kimura S.M. (2017) Wada Cellulose-chitosan beads crosslinked by dialdehyde cellulose. Cellulose. Vol. 24. P. 5517–5528.
40. Song L., Cruz C., Farrah S.R., Baney R.H. (2009) Novel antiviral activity of dialdehyde starch. Electronic Journal of Biotechnology. V. 12, No. 2. P. 1–5.
41. Nudga L.A., Petrova V.A., Gofman I.V. et al. (2008) *Khimicheskie i strukturnye prevrashcheniya v khitozanovykh plenках v protsesse khraneniya* [Chemical and structural transformations in chitosan films during storage] *ZhPKh* [Zh. Phys]. Vol. 81. Issue 11. P. 1877–1881.
42. Singh M., Ray A.R., Vasudevan P., Guha S.K. (1979) Potential biosoluble carriers. Biomaterials. Vol. 7. Is. 4. P. 495–512. Available at: <https://doi.org/10.3109/10731197909118964>.
43. Belov A.A. (2012) *Tekstil'nye materialy, sodержashchie immobilizovannye gidrolazy dlya meditsinskikh i kosmetologicheskikh tseley. Poluchenie. Svoystva. Primenenie* [Textile materials containing immobilized hydrolases for medical and cosmetic purposes. Production. Properties. Application]. LAP LAMBERT Acad. Pub., GmbH & Co. KG, Germany. 242 p.