

6. *Токсикологические* последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий и др. // *Современные проблемы токсикологии*. — 2005. — № 3. — С. 20-26.

7. *Корякина Е. В., Белова С. В.* Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболичес-

ких нарушений (обзор литературы) // *Клин. лабор. диагностика*. — 2004. — № 3. — С. 3-7.

8. *Первушин Ю. В., Бондар Т. П.* Лабораторные методы диагностики синдрома эндогенной интоксикации: Метод. рекомендации. — Ставрополь, 1993. — 86 с.

9. *Стальная И. Д., Гаршвили Г. Г.* Метод определения малоново-

го диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии* / Под ред. В. И. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 57-59.

10. *Иванов Ю. И., Похорелюк О. Н.* Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М.: Медицина, 1990. — 219 с.

УДК 577.15(088.8)

І. І. Романовська, І. К. Тагунова, С. М. Пухлік, Р. І. Чаланова

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ *STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS*

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,
Одеський державний медичний університет

Арсенал застосовуваних літичних ферментів у біотехнології, генній інженерії, медичній практиці оснований на їх безпосередній дії на клітинну стінку мікроорганізмів як антимікробних препаратів [1–4], обмежений переважно лізоцимом. Тому пошук ефективних літичних ферментів, перш за все, мікробного походження, цілеспрямоване отримання їх стабільних, закріплених на носії форм, є актуальною проблемою.

Літичний ферментний комплекс (ЛФК) *Streptomyces recifensis var. lyticus* 2435 (стерилаза), який є препаратом широкого спектра дії, здатний руйнувати клітинні стінки багатьох грамположитивних коків і паличок, грамнегативних бактерій і дріжджів із максимальним її проявом щодо мікроорганізмів родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Candida*. У складі комплексу ідентифіковані літичні ендопептидази, α -амілази, нелітичні протеїнази, дезоксирибонуклеази [5]. Ці властивості ЛФК дозволяють використовувати його як потенційний антибактеріальний засіб для ранової, опікової терапії та в інших сферах медицини.

Мета даного дослідження — створення іммобілізованих форм літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis var. lyticus* на перев'язувальних засобах, у плівках полівінілового спирту, а також вивчення біохімічних особливостей їх функціонування і потенційних можливостей використання в медицині.

Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували літичний ферментний комплекс *Streptomyces recifensis var. lyticus* 2435 у ліофілізованій формі з вихідною літичною активністю 207 700 ОД/г препарату по відношенню до клітин *Lactobacillus bulgaricus* (виробництво НВО «Ензим», Ладизин), наданий НТУУ «КПІ» (канд. біол. наук Л. М. Шинкаренко), лужну протеазу (НВО «Ензим», Ладизин) з питомою активністю 5,54 ОД/мг білка відповідно.

Кількість білка у вільних й іммобілізованих препаратах визначали за методом Лоурі в модифікації Хартрі [6], бактеріолітичну активність — турбідиметрично за величиною оптичної густини інкубаційної

суміші [7]. Як субстрат використовували суспензію клітин *Lactobacillus bulgaricus* з D_{540} — 0,8–0,9. Протеолітичну активність визначали за модифікованим методом Ансона [8] (субстрат — казеїн за Гаммерстейном).

Іммобілізацію проводили з використанням полімерів: полівінілового спирту (ПВС), поліетиленоксиду (ПЕО), ПВС, зшитого бурою [9]: марлю просочували 1%-м розчином бури, висушували при 20 °С, потім повторювали просочування розчином стерилази (або стерилази і лужної протеази) у 10%-му розчині ПВС (виготовленому на 0,01 моль/дм³ Нафосфатному буферному розчині, рН 6,4) і висушували. Димексид вносили у вигляді 4%-го водного розчину в процесі іммобілізації.

Препарати запаювали в поліетиленову плівку, піддавали γ -опроміненню дозою 15 кГр (Білгород-Дністровське ВАТ «Гемопласт») і зберігали при 4 °С.

Полімерні плівки з використанням ПВС готували за такою методикою: до 28 см³ 10%-го розчину ПВС додавали стерилазу в концентрації 10 мг/см³, гліцерин як пласти-



фікатор, суміш розливали на скляні основи, висушували на повітрі, висікали однорідні еластичні непересихаючі плівки, запаювали їх у поліетиленові пакети і зберігали при температурі 4 °С в сухому, захищеному від світла місці.

Визначення рН- і термозалежності активності вільного та іммобілізованих препаратів проводили в буферних розчинах при рН 4,5–8,5, температурі 20–90 °С; кислотостійкості — протягом 30–180 хв у буферному розчині при рН 5,5. Термостабільність літичної активності визначали після попередньої інкубації препаратів при 60 °С і рН 6,4 протягом 5–90 хв. Константи термоінактивації розраховували за рівнянням реакції першого порядку з тангенсу кута нахилу лінійного графіка залежності натурального логарифма величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії.

Кінетику лізису вільним та іммобілізованим препаратом визначали за початковими швидкостями лізису субстрату. На основі отриманих даних про початкові швидкості лізису субстрату будували графік у координатах Хейнса (S/V від S), де S — концентрація субстрату, V — початкова швидкість реакції. Методом найменших квадратів були визначені тангенс кута нахилу, який чисельно дорівнює $1/V_{\max}$; точка перетину екстрапольованої прямої з віссю Y відповідає значенню K_m/V_{\max} ; точка перетину з віссю X — K_m . Вірогідність отриманих даних становила $>0,990$. Дані експерименту піддавали математичній обробці за програмами статистичної залежності, які включають обчислення значень середнього арифметичного, середнього квадратичного відхилення, стандартної середньої похибки експерименту та критерію Стьюдента [10].

Первинна апробація стерилізації, іммобілізованої на марлі за допомогою ПВС, зшитого

бурою, на 72 хворих-добровольцях (50 чоловіків, 22 жінок, вік — 18–60 років), які проходили курс лікування з приводу захворювань ЛОР-органів, була проведена в Одеській обласній клінічній лікарні асистентом кафедри оториноларингології Одеського державного медичного університету канд. мед. наук І. К. Тагуною.

Препарат іммобілізованої стерилізації у вигляді очної лікарської плівки (ОЛП) перевірений у лікуванні експериментального лужного опіку рогівки очей 16 кроликів породи шиншила, масою 2 кг, у НДІ очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова (канд. мед. наук Р. І. Чаланова). Модельований тяжкий лужний опік рогівки спричинювали 10%-м розчином NaOH при експозиції 10 с спеціальним аплікаційним штампом після триразової епібульбарної анестезії 0,5%-м розчином дикаїну.

Після операції кон'юнктивальна порожнина промивалася 10 см³ фізіологічного розчину. У подальшому у контрольній групі тварин (8 кролів) в обидва ока проводили інстиляції 30%-го сульфацилату натрію, а в дослідній — іммобілізований препарат стерилізації у вигляді ОЛП закладали за повіки, починаючи з 4-ї доби опікового процесу, протягом 10 днів.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати досліджень із включення літичних фермент-

них комплексів у розчини гідрофільних полімерів [9; 11], використання методу закріплення ферментів на марлі за допомогою гідрофільних полімерів, ПВС, зшитого бурою [11; 12], використали для розробки потенційного бактеріолітичного препарату — іммобілізованої стерилізації. При цьому брали до уваги доступність і низьку вартість ПВС, поряд із його здатністю поглинати кров, лімфу, ексудат із гнійних ран, низьку токсичність і поєднання переваг марлі (велика питома поверхня, пористість) і антисептичних властивостей бури.

При іммобілізації стерилізації на марлі з використанням 10%-х розчинів ПВС і ПЕО-400, ПВС, зшитого бурою, при додатковому включенні димексиду (табл. 1), максимальний вихід літичної активності — 85,7 % — показав препарат № 3; додаткове включення димексиду призвело до зниження активності до 69,5 %. При іммобілізації на марлі стерилізації в розчинах ПВС і ПЕО виходи були невисокими — 41,2 і 44,6 % відповідно.

Після піврічного і річного зберігання іммобілізований препарат стерилізації на марлі за допомогою ПВС, зшитого бурою, який не піддавався γ -опроміненню, мав 95,2 і 95,3 % початкової літичної активності, відповідно γ -опромінений (15 кГр) — 95,0 і 92,5 % (табл. 2).

Вивчення рН- і термозалежностей літичної активності вільного й іммобілізованого

Таблиця 1

Іммобілізація стерилізації на перев'язувальних засобах

Іммобілізовані на марлі препарати стерилізації	Літична активність	
	($M \pm m$) · 10 ² ОД/г	Від вихідної, %
За допомогою ПВС	1027,9 ± 95,6	41,2
За допомогою ПЕО-400	1112,7 ± 78,3	44,6
За допомогою ПВС, зшитого бурою	2138,0 ± 69,9	85,7
За допомогою ПВС, зшитого бурою, з додаванням димексиду	1734,0 ± 148,1	69,5

Примітка. Вихідна літична активність становила (2994,0 ± 171,6) · 10² ОД/г. У табл. 1, 3–5: $P < 0,001$; $n = 7$.



Таблиця 2

Збереження активності стерилази, іммобілізованої на марлі за допомогою полівінілового спирту, зшитого бурою, після γ -опромінення

Час зберігання, міс	Літична активність, % від вихідної			
	До γ -опромінення		Після γ -опромінення	
0	85,7	100,0	72,5	100,0
1	85,0	100,0	72,9	100,0
3	85,0	100,0	73,0	100,0
6	83,5	95,2	69,5	95,0
9	81,6	95,0	69,1	94,4
12	80,0	93,3	67,7	92,5
18	80,0	93,3	64,5	89,0

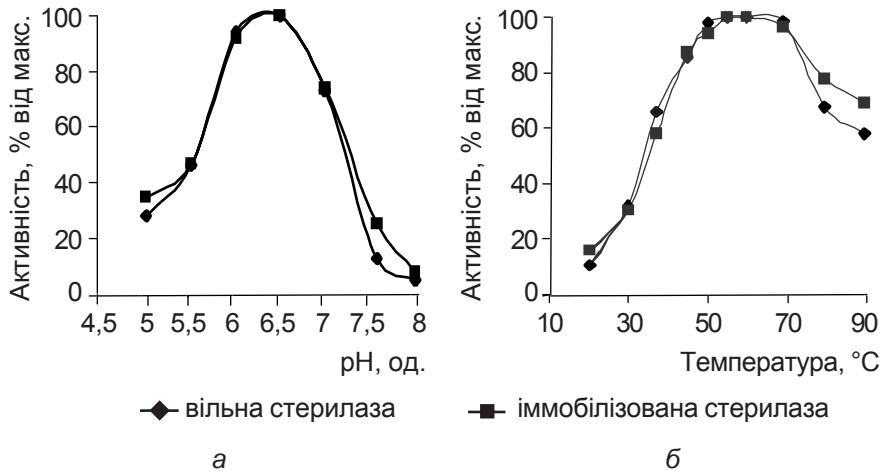


Рис. 1. Залежність літичної активності вільної й іммобілізованої на марлі за допомогою полівінілового спирту, зшитого бурою, стерилази від рН (а) і температури (б) інкубаційного середовища

препаратів довело, що їх рН- і термооптими не зазнають значних змін, відмічено невелике розширення термопрофілю літичної активності в область високих температур (рис. 1а, б). Це свідчить про «м'якість» методу іммобілізації, що не зачіпає активного центра ферменту. Кінетичні параметри реакції K_m і V_{max} вільного й іммобілізованого препаратів не зазнають істотних змін (табл. 3).

При дослідженні стійкості іммобілізованої на марлі сте-

Таблиця 3

Кінетичні параметри вільної стерилази й іммобілізованої на марлі за допомогою полівінілового спирту, зшитого бурою

Стери-лаза	K_m , мг/дм ³	V_{max} , ОД/мг
Вільна	642,1±22,1	1255,5±100,3
Іммобі-лізована	684,0±18,9	886,5±56,7

рилази в кислому середовищі (рН 5,5), що відповідає рН равного вмісту, глибина лізису клітин *Lactobacillus bulgaricus* іммобілізованим препаратом через 1 год перевищувала таку для вільного ферменту (рис. 2).

Іммобілізована стерилаза виявила більшу стабільність при вивченні температурної інактивації; при цьому кон-

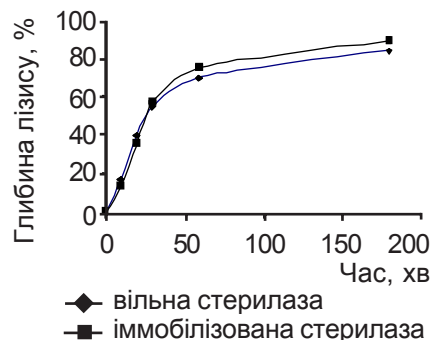


Рис. 2. Залежність глибини лізису клітин *Lactobacillus bulgaricus* від часу вільною та іммобілізованою стерилазою при рН 5,5

станти термоінактивації для вільного й іммобілізованого ЛФК становили $1,01 \cdot 10^{-3}$ і $0,79 \cdot 10^{-3}$ хв⁻¹ відповідно.

Результати проведених досліджень є непрямим доказом отримання модифікованої стабілізованої форми ЛФК стерилази, головним чином за рахунок утворення водневих зв'язків між макромолекулами ПВС і ферменту, а також додаткового його включення у сітку зшитого бурою полімера.

Раніше нами було показано істотне збільшення літичної активності стерилази при сумісному включенні з протеолітичними ферментами (лужна протеаза і протеаза С) у розчини гідрофільних полімерів [9; 10]. Для іммобілізації на марлі з ЛФК обрали лужну протеазу в співвідношенні 1 : 3.

При сумісній іммобілізації лужної протеази і стерилази на марлі за допомогою ПВС, зшитого бурою, іммобілізовані препарати зберігали до 86,1 % вихідної літичної активності та до 78,0 % протеолітичної активності. Отже, літична активність після сумісної іммобілізації стерилази з лужною протеазою перевищувала таку для вільного ферменту на 73,3 % (табл. 4). Таке активування літичного ферментного комплексу, можливо, зумовлене специфічністю протеази стосовно пептидоглікану стінок бактеріальних клітин.

Останнім часом в офтальмологічній практиці все ширше застосовується ензимотерапія; використання ферментів відоме при 33 патологіях очей: для розсмоктування помутніть рогівки при лікуванні тяжких хімічних опіків, при гемофтальмі, запальних процесах, катаракті й лікуванні більм [13]. Поряд із широким спектром використовуваних протеолітичних ферментів: трипсину, хімотрипсину, папаїну, лекозиму, терилітину [13] та ін. — слід зауважити перспективність використання бактеріолітичних ферментів, що здійснюють лізис клітин



мікроорганізмів при запальних процесах [1; 4]. Враховуючи позитивні результати опікової терапії розчинами стерилази у ПВС [10], нами були виготовлені плівки на основі 10%-х розчинів ПВС, із кількісним включенням стерилази, стабільні при зберіганні, властивості яких подано в табл. 5.

Слід зауважити, що включення стерилази в структуру очної лікарської плівки на основі ПВС суттєво не змінило рН- і термооптимум дії стерилази.

Первинна апробація іммобілізованої на марлі стерилази засвідчила, що при загостренні хронічного отиту (мезотимпаніті), з перфорацією барабанної перетинки і виділенням великої кількості гнійного ексудату, застосування препарату дозволило скоротити строки лікування 30 хворих удвічі порівняно з традиційним методом (промивання барабанної порожнини антисептичними засобами), застосованим до пацієнтів контрольної групи (табл. 6).

Після радикальної операції вуха при хронічному епітимпаніті у 10 спостережуваних хворих застосування іммобілізованого препарату прискорили епідермізацію трепанаційної порожнини, що дозволило скоротити терміни стаціонарного лікування на 10 днів порівняно з пацієнтами контрольної групи.

Доведено, що використання іммобілізованої стерилази протягом трьох діб привело до одужання хворих (32 особи) із зовнішніми отитами грибкової етіології, тимчасом як при традиційних методах лікування хворих контрольної групи (обробка ністатином, клотримазолом) позитивні результати досягалися після 8 діб лікування (див. табл. 6).

При застосуванні іммобілізованого препарату сумісно з активованим вуглецево-волокнистим матеріалом відмічено припинення гноєтечі при зовнішніх отитах уже через 3–4 доби, тоді як у контроль-

ній групі хворих (лікування фурациліном у поєднанні з антибіотикотерапією і НВЧ) — тільки через 8–10 діб.

Через 6–7 діб від моменту опіку в контрольній групі тварин спостерігали інтенсивний набряк повік із частковим виворотом, виражену гіперемію кон'юнктиви повік і очного яблука, сильні слизисто-гнійні виділення з

кон'юнктивальної порожнини. Використання ОЛП при цьому терміні спостереження привело до скорочення термінів проявів запалення у півтора рази; в кон'юнктивальній порожнині відмічено дворазове зменшення виділення, що містить гнійний компонент, при цьому його характер змінився з переважно гнійного на слизовий (табл. 7).

Таблиця 4

Сумісна іммобілізація стерилази з лужною протеазою на марлі за допомогою полівінілового спирту, зшитого бурою

Препарат	Літична активність		
	(M±m)·10 ² , ОД/г	Від вихідної іммобілізованого препарату, %	Від вільної стерилази, %
Вільна стерилаза	2574,3±61,7	—	100,0
Стерилаза : лужна протеаза (1:3), включені в 10%-й розчин ПВС	4942,1±117,2	100,0	192,0
Іммобілізована стерилаза + лужна протеаза (1:3)	3654,4±105,8	86,1	173,3

Таблиця 5

Характеристики очної лікарської плівки на основі полівінілового спирту з включеною стерилазою, M±m

Властивості	Показники
Літична активність препарату, ОД/г	2675,1±80,4
Літична активність після 1 року зберігання, %	97,2±3,5
Площа, см ²	0,64±0,02
Товщина, мм	0,35±0,01
Середня маса, мг	12,9±0,5
Колір	Кремовий
Розчинність у воді, хв	15,0±0,9
Розчинність у фізіологічному розчині, хв	16,0±1,1

Таблиця 6

Іммобілізована на марлі стерилаза при лікуванні оториноларингологічних захворювань

Захворювання	Час, діб		P
	Контрольна група	Основна група	
Хронічний отит (мезотимпаніт)	11,5±0,5	5,5±0,4	<0,05
Хронічний епітимпаніт	60,0±2,5	50,0±3,1	<0,05
Отит грибкової етіології	8,3±0,3	3,2±0,2	<0,05

Таблиця 7

Динаміка основних ознак опікової хвороби з використанням очних лікарських плівок із стерилазою

Ознака опікової хвороби	Час, діб		P
	Контрольна група	Основна група	
Запалення	6,5±0,3	4,0±0,2	<0,05
Гнійні виділення	6,5±0,3	3,2±0,1	<0,05



Висновки

1. Розроблені методи іммобілізації літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* на перев'язувальних засобах із використанням гідрофільних полімерів у плівки полівінілового спирту дозволяють отримувати препарати з високим виходом літичної активності, стабільні при зберіганні й γ -опромінненні.

2. Підвищення термостабільності, стійкості літичної активності іммобілізованої на марлі стерилази при кислих значеннях рН свідчить не тільки про факт стабілізувального впливу процесу іммобілізації, але й про активацію іммобілізованого ЛФК при ранових процесах.

3. Сумісна іммобілізація ЛФК із лужною протеазою на марлі за допомогою ПВС, зшитого бурою, дозволяє в 1,7 разу збільшити бактеріолітичну активність при високому збереженні протеолітичної.

4. Первинна апробація іммобілізованих препаратів стерилази на марлі за допомогою ПВС, зшитого бурою, в структурі полімерних плівок дове-

ла перспективність їх використання при лікуванні захворювань ЛОР-органів: хронічних отитах (мезотимпанітах, епітимпанітах), отитах грибової етіології, а також в офтальмології в опіковій терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. — Томск: Изд-во Томского ун-та, 1974. — 210 с.

2. Повышение эффективности ампициллина при его сочетании с лизоцимом / Э. Г. Щербакова, И. С. Круглова, Т. П. Журавлева, Б. А. Ларин // Антибиотики и химиотерапия. — 1990. — Т. 35, № 6. — С. 34-36.

3. Морозова С. В. Воспалительные заболевания наружного уха // РМЖ. — 2001. — Т. 9, № 16-17. — С. 1-7.

4. Кулаев И. С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский образовательный журн. — 1997. — № 3. — С. 23-31.

5. Гниломедова Л. Е. Биологические свойства препарата литических ферментов из *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 // МГУ им. М. В. Ломоносова. — М., 1986. — 22 с.

6. Hartree E. F. Determination of protein modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — Vol. 48, N 1. — P. 422-427.

7. Килочек Т. П., Бабенко Ю. С. Зависимость биосинтеза литических ферментов культурой *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 от качества посевного материала // Микробиол. журнал. — 1990. — Т. 52, № 5. — С. 12-17.

8. Полизалина Г. В., Чередниченко В. С., Римарева Л. В. Определение активности ферментов. — М: ДеЛи принт, 2003. — С. 230-231.

9. Романовская И. И., Давиденко Т. И. Иммобилизация литического ферментного комплекса лизорицефина // Прикл. биохим. и микробиол. — 1999. — Т. 35, № 1. — С. 68-71.

10. Иванов Ю. И., Погорелюк А. Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.

11. Давиденко Т. И. Литическая активность иммобилизованной стерилазы (литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*) / Т. И. Давиденко, И. И. Романовская, М. А. Чуманова и др. // Хим.-фарм. журнал. — 2001. — Т. 35, № 10. — С. 14-17.

12. Давиденко Т. И. Иммобилизация ферментных препаратов // Вестник ОНУ. — 2003. — Т. 8, № 4. — С. 135-147.

13. Даниличев В. Ф. Исследование терапевтического эффекта ряда протеолитических ферментов при повреждениях и заболеваниях глаз. — Л.: ВМА им. С. М. Кирова, 1980. — 50 с.

УДК 616.12-008.64:615.22

Л. В. Савченкова, Т. В. Афоніна

БІОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІПОФЛАВОНУ З АЦЕЛІЗИНОМ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ СЕРЦЕВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ

Луганський державний медичний університет

Велике медико-соціальне значення серцевої недостатності зумовлене перш за все поширеністю даного патологічного стану (2 % населення землі страждає на серцеву недостатність) і високою летальністю хворих із даним не-

відкладним станом. За даними Української асоціації кардіологів, кожен другий із таких пацієнтів помирає протягом чотирьох років, а хворі з тяжкою формою хронічної серцевої недостатності (ХСН) — протягом року [1].

Відомо, що високоефективна фармакотерапія будь-якого патологічного стану можлива за умов досконалого вивчення патогенетичних ланок його формування. Під ХСН сьогодні розуміють патофізіологічний стан, при якому серце,

