

вод. — К.: Лібра, 2000. — 551 с.

2. Прейс С. В., Каменев С. Б., Калас Ю. И. Окислительная очистка фенолосодержащих сланцев // Химия и технология воды. — 1994. — № 1. — С. 83-91.

3. Ганиев И. М., Суворкина Е. С., Кабальнова Н. Н. Взаимодействие диоксида хлора с фенолом // Известия Академии наук. Сер. хим. — 2003. — № 5. — С. 1064-1068.

4. Давиденко Т. И., Каед Али Ахмед. Извлечение фенолов из водных растворов поли-N-винилкапролактамом // Химия и технология воды. — 2001. — № 2. — С. 142-149.

5. Wagner M., Nicell J. A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // Water Research. — 2002. — Vol. 36. — P. 4041-4052.

6. Поливинилкапролактан — обратимо осаждаемый термополимер. Соосаждение белков / С. Ф. Шерстюк, И. Ю. Галаев, А. П. Савицкий и др. // Биотехнология. — 1987. — № 2. — С. 179-182.

7. Михлин Д. М. Биологическое окисление. — М.: Изд-во Академии наук СССР, 1956. — 442 с.

8. Метелица Д. И., Савенкова М. И., Купченко В. П. Оптимизация использования пероксидазы хрена и ее антител в иммуоферментном анализе // Прикл. биохим. и микробиология. — 1987. — № 1. — С. 116-124.

9. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1975. — 360 с.

10. Кравченко И. А., Давиденко Т. И. Иммуобилизация β-галактозида-

зы в поли-N-винилкапролактане // Доклады НАН Украины. — 1997. — № 3. — С. 142-144.

11. Иммуобилизация уреазы в поли-N-винилкапролактане / С. А. Кошелев, Т. И. Давиденко, Ю. Э. Кирш и др. // Прикл. биохим. и микробиология. — 1994. — № 3. — С. 349-355.

12. Гребешова Р. Н. Способы стабилизации ферментных препаратов // Там же. — № 2. — С. 196-203.

13. Пероксидазное окисление фенолов / Т. И. Давиденко, О. В. Севастьянов, О. В. Осейчук, Ю. Э. Брусилковский // Доповіді НАН України. — 2004. — № 6. — С. 154-158.

14. Singh A., Billinsley K. A., Ward O. P. Transformation of polychlorinated biphenils with oxidative enzymes // Bioprocess Engineering. — 2000. — Vol. 23, N 3. — P. 421-425.

УДК 577.152.1:628.314.3

О. В. Осейчук, О. В. Севастьянов

#### РОЗРОБКА МЕТОДУ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ПЕРОКСИДАЗИ В ПОЛІ-N-ВІНІЛКАПРОЛАКТАМ

Включенням пероксидази в полі-N-вінілкапролактан (ПВК) отримано іммобілізований препарат із високою активністю, що дає можливість використовувати даний біокатализатор для окиснення фенолу, гідрохінону, резорцину і пірокатехіну в концентраціях 25–75 ммоль/дм<sup>3</sup> у присутності пероксиду водню. Визначено умови пероксидазного окиснення, що приводять до максимального ступеня трансформації фенолів: температура — 20–60 °С; рН=4,0–9,0; активність ферменту — 18,0–25,2 ОД/мг; мольне співвідношення фенольна сполука : пероксид водню — 1:1(2); час інкубації — 0,5–1 год. Вивчення властивостей іммобілізованої пероксидази: рН-, термозалежності, термостабільності, кінематичної в'язкості, збереження — свідчить про утворення модифікованої, стабільної форми ферменту.

**Ключові слова:** іммобілізація, пероксидаза, полі-N-вінілкапролактан, фенольні сполуки, окиснення.

UDC 577.152.1:628.314.3

O. V. Oseychuk, O. V. Sevastyanov

#### DEVELOPMENT OF A PEROXIDASE IMMOBILIZATION METHOD IN POLY-N-VINYLCAPROLACTAM

By the peroxidase inclusion in poly-N-vinylcaprolactam (PVC) the immobilized preparation with a high activity was obtained, which allows to use this biocatalyst for the phenol, hydroquinone, resorcinole, pyrocatechol oxidation in concentrations range 25–75 mmol/dm<sup>3</sup> in the presence of hydrogen peroxide. The conditions of peroxidase oxidation, bringing to maximal transformation of phenol, were determined: temperature 20–60°C, pH 4.0–9.0, enzyme activity 18.0–25.2 U/mg, molar ratio phenol : hydrogen peroxide 1:1(2), time of incubation 0.5–1 h. Investigation of immobilized peroxidase properties: pH-, thermodependence, thermostability, kinematic viscosity, storage, suggests about the modified, stable form of enzyme formation.

**Key words:** immobilization, peroxidase, poly-N-vinylcaprolactam, phenols, oxidation.

УДК 615.218.3

І. І. Романовська, канд. хім. наук, доц.,

С. М. Пухлік, д-р мед. наук, проф.

## ПОЛІМЕРНІ ПЛІВКИ ДЛЯ ІНТРАНАЗАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЕПЕРЕНОСИМОСТІ АСПІРИНУ

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

Анафілактоїдні реакції (уртикарний висип, ангіоневротичний набряк, бронхоспазм), спричинені гіперчутливістю до аспірину, уражують 0,3 % здо-

рових осіб, 1,4 % хворих з алергічним ринітом, 8–20 % хворих із бронхіальною астмою, 14–23 % хворих із назальним поліпозом, 23–28 % хво-

рих із хронічною кропив'ячкою; поєднання непереносимості ацетилсаліцилової кислоти, поліпозного синуситу і бронхіальної астми дістало в

літературі назву «астматичної тріади» [1; 2].

Оскільки пероральні провокаційні тести зростаючими дозами аспірину потенційно небезпечні (можуть викликати тяжкі системні реакції), останнім часом проводяться дослідження назального тестування непереносимості аспірину розчинами ацелізіну [1]. Однак його розчини нестабільні, не підлягають тривалому зберіганню, у зв'язку з чим необхідність розробки методу інтраназальної діагностики з використанням полімерних плівок, які відрізняються точним дозуванням препарату, можливістю регулювати час його вивільнення, стабільністю, зручністю застосування для лікаря і пацієнта, економічністю, — велими актуальне завдання.

Для інтраназальної провокаційної проби можна використовувати діагностичні плівки (ДП) на основі полімерів синтетичного і природного походження: полівінілового спирту (ПВС), желатини, ПВС і полівінілпіролідону (ПВП), похідних целюлози з побутовими, пилковими, харчовими алергенами, новокаїном, індикаторами [3–9].

**Мета** даного дослідження — розробка полімерних плівок з ацелізіном для інтраназальної діагностики непереносимості аспірину.

### Матеріали та методи дослідження

Як матриці для включення ацелізіну (АЦЛ) використовували водорозчинні полімери — ПВС (М. м. 30 000), желатину, желатину в комбінації з ПВП (М. м. 2 000 000), а також гліцерин як пластифікатор.

Полімерні плівки виготовляли за розробленою методикою, для чого 1 г АЦЛ розчиняли в 5 см<sup>3</sup> дистильованої води, відповідні розраховані дози змішували з розчинами полімерів: ПВС, желатини,

ПВС з ПВП і додавали гліцерин (0,1 см<sup>3</sup>) як пластифікатор.

Суміші наносили на основи, висушували в ексікаторі над СаСl<sub>2</sub>, висікали плівки з 1,0; 3,0; 6 мг АЦЛ в одній ДП, запаювали їх у поліетиленові пакети і зберігали при температурі 4 °С у сухому, захищеному від світла місці. Після сушки отримували однорідні, еластичні, непересихаючі ДП, діаметром 0,5 см.

Кількісне визначення аспірину (АСП) в ацелізіні та в ДП з ацелізіном проводили спектрофотометрично, користуючись рівнянням, вирахуванням з калібрувальної залежності, на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda_{\max}$  272 нм у кюветі з товщиною шару 1 см:

$$C = 962,999 \cdot D_i + 25,265,$$

де С — концентрація АСП у пробі, мкг;

$D_i$  — оптична густина розчину.

Біофармацевтичну оцінку ДП здійснювали в експерименті *in vitro* методом діалізу крізь целофанову напівпроникну мембрану (розмір пор 0,2–0,4 мкм) як моделі слизової оболонки носової порожнини відносно дистильованої води при температурі 37 °С з кількісним визначенням аспірину в діалізаті.

Дані експерименту піддавали математичній обробці за програмами статистичної залежності, які включають обчислення значень середнього арифметичного, середнього квадратичного відхилення, стандартної середньої похибки експерименту, *t*-критерію Стьюдента і показника вірогідності *P* [10].

Перевірка збереження вмісту аспірину в АЦЛ і ДП з АЦЛ проводилася методом тонкошарової хроматографії у таких системах розчинників: бензол — діоксан — оцтова кислота (2,25:0,63:0,1); бензол — метанол — оцтова кислота (3,0:0,53:0,27); а також якісним

визначенням продукту його гідролізу — саліцилової кислоти з розчином хлориду заліза (III) (рН 1,8–2,5) [11].

### Результати дослідження та їх обговорення

У роботі використовували препарат Ацелізин-КМП (суміш DL-лізіну ацетилсаліцилату та гліцину). Як носії були обрані 20%-й розчин ПВС, 18%-й розчин ПВП, 15%-й розчин желатини, відомі своїми плівкоутворюючими властивостями і широко застосовувані у медицині та фармацевтичній технології.

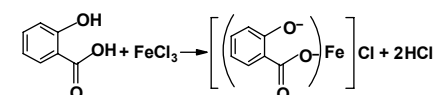
Як допоміжний засіб використали гліцерин (ГФ IX, ст. 227), отримавши прозорі легковідділювані плівки, що піддаються формуванню.

Вносили АЦЛ у кількості 1,0; 3,0; 6,0 мг на ДП, при цьому вміст АСП у плівках становив 0,5; 1,5; 3,0 мг відповідно.

Як впливає з даних табл. 1, незалежно від вихідної концентрації АСП, ступінь його включення суттєво не змінювався і був кількісним при використанні як основ розчинів ПВС і желатини, а також ПВС у комбінації з ПВП.

Через 3 міс зберігання вміст АСП у досліджуваних плівках практично не змінився, крім його невеликого зменшення при вихідному рівні 3 мг, про що свідчать дані, наведені у табл. 1.

Наявності саліцилової кислоти в діалізатах з ДП не виявили, однак при дослідженні розчину АЦЛ через 1 добу спостерігали випадіння кристалів саліцилової кислоти ( $t_{\text{пл}}$  158 °С); якісна реакція з хлоридом заліза (III) (утворення комплексу синьо-фіолетового кольору) [11] також підтвердила наявність саліцилової кислоти у розчині:



Визначення вмісту аспірину в полімерних діагностичних плівках з ацелізином

Носій	Вих. концентрація, мг/ДП	Вміст аспірину в ДП					
		Після включення		Через 1 міс зберігання		Через 3 міс зберігання	
		M±m, мг	% від вих.	M±m, мг	% від вих.	M±m, мг	% від вих.
ПВС	0,5	0,50±0,01	100,0	0,49±0,02	98,0	0,49±0,01	98,0
	1,5	1,49±0,01	99,3	1,46±0,10	97,3	1,47±0,06	98,0
	3,0	2,99±0,01*	99,7	2,96±0,01	98,7	2,91±0,01*	97,0
Желатина	0,5	0,50±0,01	100,0	0,49±0,01	98,0	0,47±0,01	94,0
	1,5	1,48±0,01	98,7	1,47±0,05	98,0	1,43±0,02	95,3
	3,0	2,95±0,02	98,3	2,96±0,01	98,7	2,94±0,06	98,0
ПВС + ПВП	0,5	0,48±0,01	96,0	0,48±0,01	96,0	0,47±0,01	94,0
	1,5	1,48±0,02	98,6	1,47±0,01	98,0	1,45±0,03	96,7
	3,0	2,95±0,05*	98,3	2,92±0,02	97,3	2,79±0,04*	93,0

Примітка. При кількості експериментів n=6 вірогідність результатів у межах кожної серії становить P<0,001; \* — відмінності вірогідні (P<0,02) по відношенню до вмісту аспірину безпосередньо після включення у ДП.

Таблиця 2

Дослідження характеристик діагностичних плівок з ацелізином

Носій	Концентрація АСП у ДП, мг	Колір	Середня маса, M±m, мг	Площа, см <sup>2</sup>	Час розчинення, хв	
					У воді	У фіз. р-ні
ПВС	0,5	Прозорі, безбарвні	9,4±0,1	0,28	4	3
	1,5		11,7±0,4	0,28	5	5
	3,0		13,5±0,6	0,28	6	6
Желатина	0,5	Прозорі, жовті	11,6±0,4	0,28	10	9
	1,5		13,6±0,3	0,28	11	11
	3,0		15,8±0,5	0,28	13	14
ПВС+ПВП	0,5	Непрозорі, білуваті	21,7±0,9	0,28	3	4
	1,5		22,4±0,9	0,28	5	5
	3,0		23,3±1,1	0,28	6	7

Примітка. При кількості експериментів n=6 вірогідність результатів у межах кожної серії становить P<0,001.

Отримані ДП з АЦЛ досліджували на забарвленість, визначали їх масу, площу, а також розчинність у воді й фізіологічному розчині. Результати досліджень наведено у табл. 2. Як впливає із наведених даних, при використанні як основи 20%-го розчину ПВС отримали прозорі безкольорові ДП з масою (9,4±0,1), (11,7±0,4), (13,5±0,6) мг (при вихідній концентрації АЦЛ 1,0, 3,0, 6,0 мг у ДП), які розчинялися у воді за 4, 5, 6 хв, а у фізіологічному розчині — за 3, 5, 6 хв відповідно.

На основі желатини отримали прозорі жовтуваті плівки з середньою масою (11,6±0,4), (13,6±0,3), (15,8±0,5) мг (при вихідній концентрації

АЦЛ 1,0, 3,0, 6,0 мг у ДП), їх розчинність у воді — 10, 11, 13 хв, у фізіологічному розчині — 9, 11, 14 хв. На основі комбінації розчинів ПВС і ПВП отримали непрозорі плівки з розчинністю у воді 3, 5, 6 хв, а у фізіологічному розчині — 4, 5, 7 хв.

Товщина отриманих плівок становила 0,34 мм, площа — 0,28 см<sup>2</sup>.

Виходячи з даних табл. 3, обрані матриці забезпечують високу доступність препарату, яка досягає максимуму через 2 год, причому найбільшою доступністю відрізнялися плівки на основі ПВС: через 2 год у діалізатах з ДП вміст АСП становив 90,0, 92,0, 90,2 % при відповідних концентраціях АСП.

Таким чином, обраний полімер-носій для ДП з АЦЛ — ПВС забезпечує високу доступність лікарської речовини.

Медичні дослідження застосування полімерних плівок на основі ПВС із включеним АЦЛ у концентраціях 1,0, 3,0, 6,0 мг (0,5, 1,5, 3,0 мг АСП) для діагностики непереносимості до АСП виконували на кафедрі оториноларингології Одеського державного медичного університету під керівництвом д-ра мед. наук, проф. С. М. Пухліка.

Запропонована методика заміни пероральних проб аспірину на інтраназальний спосіб введення ДП з АЦЛ, які можна вилучити із носової порожнини і припинити дослідження

Вміст аспірину в діалізатах із діагностичними плівками з ацелізином

Носій	Вих. конц. АСП у ДП, мг	Час проведення діалізу, год					
		0,5		1,0		2,0	
		М±m, мг	% від вих.	М±m, мг	% від вих.	М±m, мг	% від вих.
ПВС	0,5	0,320±0,001*	64,0	0,420±0,013*	84,0	0,45±0,02*	90,0
	1,5	0,92±0,05*	61,3	1,11±0,01*	74,0	1,38±0,06*	92,0
	3,0	1,83±0,11*	61,1	2,40±0,12	80,0	2,71±0,10*	90,2
Желатина	0,5	0,260±0,001*	52,4	0,320±0,002*	64,0	0,370±0,003*	74,0
	1,5	0,83±0,05*	55,3	0,97±0,07	64,7	1,11±0,04*	74,0
	3,0	1,63±0,10*	54,3	1,13±0,09*	67,8	2,21±0,12*	73,7
ПВС+ПВП	0,5	0,28±0,01*	56,0	0,37±0,01*	74,0	0,420±0,020*	84,0
	1,5	1,01±0,05*	67,3	1,17±0,07	78,0	1,30±0,05*	86,7
	3,0	1,78±0,11*	59,3	2,34±0,10*	78,0	2,55±0,12*	85,0

Примітка. При кількості експериментів n=6 вірогідність результатів у межах кожної серії становить P<0,001; \* — відмінності вірогідні (P<0,02) по відношенню до часу проведення діалізу 0,5 год.

при розвитку загальних симптомів алергії, а при необхідності промити носову порожнину.

Було вивчено 2 групи пацієнтів: 1-ша — з чутливістю до АСП (12 хворих), що проявлялась у нападах бронхіальної астми, рецидивному поліпозі носа (підтверджено оральним провокаційним тестом), і 2-га — нечутлива до АСП (8 хворих) із хронічними проявами бронхіальної обструкції та поліпозу носа.

Перед початком дослідження (для контролю) до носа пацієнтам вводилася полімерна плівка без АЦЛ для виключення симптомів подразнення, спричиненого перебуванням самої плівки у носовій порожнині. Подальше дослідження розпочинали з введення полімерних плівок з концентрацією 1 мг АЦЛ (0,5 мг АСП), якщо реакції не було, то введення плівки з більшою концентрацією проводили через день.

Стан носового дихання оцінювали за допомогою риноманометрії до початку тесту, а також через 15 і 30 хв після введення ДП. Визначали місцеві симптоми в порожнині носа за станом слизової оболонки (колір, набряклість) і ознаками подразнення (свербіж, чхання, слизові виділення, слю-

зотеча). Сумарні клінічні прояви виражали в балах. Статистичну обробку отриманих даних виконували відповідно до критерію Уайта і методом Фішера [12], які підтвердили вірогідність отриманих даних (P<0,025).

Жоден пацієнт не виявив ніяких негативних симптомів після контрольного введення полімерних плівок.

Плівки з концентрацією 1,0 і 3,0 мг АЦЛ (0,5 і 1,5 мг АСП) не викликали ніяких симптомів в обох групах. Однак плівки з концентрацією 6,0 мг АЦЛ (3,0 мг АСП) у

всіх пацієнтів 1-ї групи викликали місцеві симптоми та погіршення носового дихання. Загальні симптоми на введення плівок були відсутні.

На рисунку відображено відмінності в маніфестуванні клінічних проявів непереносимості аспірину при проведенні назального провокаційного тесту ДП з АЦЛ між пацієнтами обох груп.

Запропонований спосіб інтраназальної діагностики непереносимості аспірину за допомогою полімерних плівок з ацелізином (3 мг АСП у ДП) дозволяє легко фіксувати про-

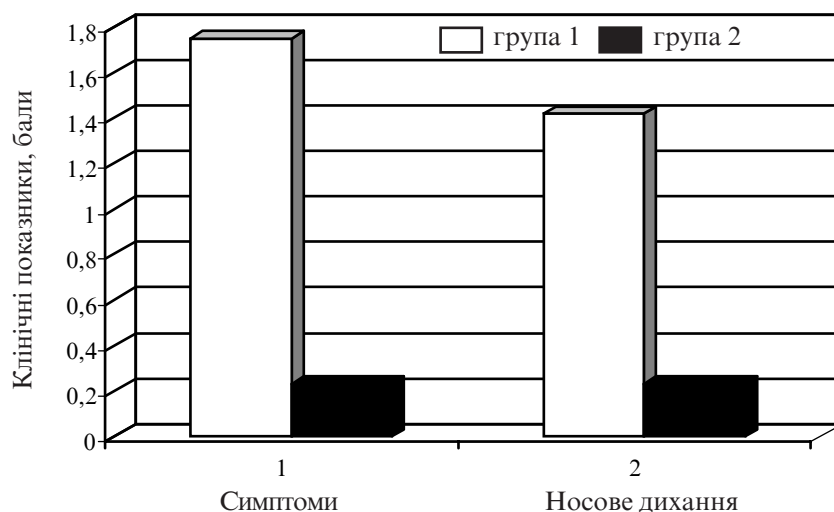


Рисунок. Порівняльна оцінка клінічних показників між обстежуваними групами при проведенні назального провокаційного тесту за допомогою полімерних плівок з ацелізином



яви симптомів непереносимості аспірину, дає змогу з більшим ступенем вірогідності розрізнити чутливих і нечутливих до аспірину пацієнтів, є менш небезпечним, ніж інші провокаційні тести, потребує меншого часу, отже, краще придатний для щоденного використання.

### Висновки

1. Розроблено діагностичні полімерні плівки (на основі ПВС, ПВС у комбінації з ПВП, желатини) з ацелізином при кількісному включенні аспірину дозами 0,5, 1,5, 3,0 мг, стабільні при 3-місячному зберіганні.

2. Вивчення властивостей отриманих плівок довело, що найвищою біодоступністю відрізняються ДП на основі ПВС.

3. Вперше на основі полімерних плівок з ацелізином (3 мг аспірину у плівці) розроблено інтраназальний провокаційний тест для діагностики непереносимості аспірину.

4. Результати клінічних досліджень підтвердили високу діагностичну цінність запропонованого методу діагностики непереносимості аспірину.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Tomaz E. M. Nasal provocation tests in the diagnosis of urticaria induced by acetylsalicylic acid / E. M. Thomaz, M. F. Ferreira, M. A. Spinola

et al. // Allergy and asthma proc. — 1997. — Vol. 18. — P. 319-322.

2. Клиническая иммунология и алергология / Под ред. Г. Лолора мл., Г. Фишера, Д. Адельмана. — М.: Практика, 2000. — 806 с.

3. Романовская И. И., Давиденко Т. И. Имобилизация аллергенов белка куриного яйца и домашней пыли // Доп. НАН України. — 2000. — № 1. — С. 160-164.

4. Патент 4268А Україна, МПК 7 А61В 10/00 Спосіб специфічної імунотерапії алергічних ринітів / Б. М. Пухлик, С. М. Пухлік, Т. І. Давиденко та ін. (Україна). — № 2000074259; заявл. 17.07.2000; опубл. 15.10.2001.

5. Пухлик С. М. Использование эндоназальных полимерных пленок для диагностики и лечения аллергических заболеваний / С. М. Пухлик, Т. И. Давиденко, И. И. Романовская, Г. В. Колесниченко // Матеріали наук. праць 1-го з'їзду алергологів України, Київ, 3-5 квітня, 2002 р. — К., 2002. — С. 144-145.

6. Пухлик С. М. Клинико-экспериментальное исследование изготовления и применения иммобилизованных аллергенов в ринологии / С. М. Пухлик, И. И. Романовская, Т. И. Давиденко // Ринология. — 2002. — № 1. — С. 42-45.

7. Романовская И. И. Диагностические полимерные пленки с новокаином для интраназального введения / И. И. Романовская, Т. И. Давиденко, С. М. Пухлик // Астма та алергія. — 2003. — № 2-3. — С. 27-29.

8. Романовская И. И. Диагностические полимерные пленки с новокаи-

ном и метиленовым синим / И. И. Романовская, Т. И. Давиденко, С. М. Пухлик // Вісн. ОНУ. — 2004. — Т. 9, № 3. — С. 108-113.

9. Ерофеева Л. Н. Создание лекарственных препаратов для лечения ринитов // Фармація. — 1999. — № 6. — С. 52-54.

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

11. Швайкова М. Д. Токсикологическая химия. — М.: Медицина, 1975. — 376 с.

12. Архипова Г. П., Лаврова И. Г., Трошина И. М. Некоторые современные методы статистического анализа в медицине. — М., 1971. — 76 с.

УДК 615.218.3

І. І. Романовська, С. М. Пухлік

### ПОЛІМЕРНІ ПЛІВКИ ДЛЯ ІНТРАНАЗАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЕПЕРЕНΟΣИМОСТІ АСПІРИНУ

З використанням полімерних носіїв полівінілового спирту, желатини, полівінілпіролідону розроблено діагностичні плівки з ацелізином для інтраназального введення з кількісним включенням аспірину (0,5–3,0 мг у плівці), стабільні при зберіганні, які дозволяють регулювати час вивільнення препарату з плівки. Показано перспективність застосування плівок на основі полівінілового спирту з дозою аспірину 3,0 мг у плівці для діагностики непереносимості аспірину.

**Ключові слова:** ацелізин, аспірин, діагностичні плівки, полівініловий спирт.

UDC 615.218.3

I. I. Romanovska, S. M. Pukhlik

### POLYMERIC FILMS FOR INTRANASAL DIAGNOSIS OF ASPIRIN HIPERSENSITIVITY

With a usage of polymeric supports: polyvinyl alcohol, gelatin, polyvinylpyrrolidone the diagnostic films with acetylsalicylic acid for the intranasal introduction which quantitative inclusion of aspirin (0.5–3.0 mg in a film) were worked out. They are stable at storage and allow to control the time of preparation elution from the film. The prospect of the films, based on polyvinyl alcohol, with an aspirin dosage of 3.0 mg in a film used for aspirin hypersensitivity diagnosis, was shown.

**Key words:** acetylsalicylic acid, aspirin, diagnostic films, polyvinyl alcohol.