

УДК 616.314.17-008.1-083:615.38

О. А. Бас, А. О. Седлецька, Н. А. Івченко

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ НОВОГО МЕТОДУ ЛІКУВАННЯ ПАРОДОНТИТУ

У тканинах пародонта «літніх» щурів після комплексного використання лецитину та локального дозованого вакууму середнього ступеня при експериментальному пародонтиті виявлено значне зниження вмісту малонового діальдегіду, збільшення активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, вмісту Са і Р в кістці щелеп, зниження показника ступеня резорбції альвеолярної кістки, атрофії альвеолярного відростка. При цьому найбільш виражена пародонтопротекторна дія встановлена у «літніх» щурів порівняно з тваринами «молодого» віку.

**Ключові слова:** пародонтит, лецитин, локальний дозований вакуум.

UDC 616.314.17-008.1-083:615.38

O. A. Bas, A. O. Sedletska, N. A. Ivchenko

#### EXPERIMENTAL BASIS OF A NEW METHOD OF PARODONTITIS THERAPY

After complex use of Lecithine and local dosed vacuum of medium degree for treatment of experimental parodontitis we revealed that in parodontal tissues in group of elder rats the content of Malonic dialdehyde has been decreased. However, the activity of superoxidismutase, glutathionperoxidase, glutathionreductase was increased, the contents of Ca and P became considerably increased. Due to the described above treatment the resorption of alveolar process was also decreased and parodontoprotection was more significant in group of elder rats in comparison with experimental animals of "younger age".

**Key words:** parodontitis, Lecithine, local dosed vacuum.

УДК 577.152.1:628.314.3

О. В. Осійчук,

О. В. Севастьянов, канд. хім. наук

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

*Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса*

До недоліків існуючих методів видалення фенолів належать висока енергоємність багатьох із них (наприклад, екстракційних або випарних), невирішеність питань регенерації сорбентів для сорбційних методів, використання агресивних сполук (хлор, озон, перексид водню) у високих концентраціях, значна витрата реагентів (екстракційні методи) [1–3].

У зв'язку з цим, нині розробляються нові способи видалення фенолів із розчинів, зокрема ферментативні. Застосування ферментів відкриває перспективи ефективнішої утилізації широкого спектра фенольних сполук. Ферменти можна використовувати в широкому інтервалі рН, температур і концентрацій субстратів [4].

Використання ферментів набуло великого розвитку у зв'язку з можливістю їх закріплення на носіях, пошук яких триває. При цьому враховується можливість одержати

біокаталізатори з новими функціональними властивостями, підвищеною стабільністю при використанні та зберіганні.

Дана робота присвячена вивченню іммобілізації пероксидази в полі-N-вінілкапролактамі (ПВК), стабілізований фенольними сполуками (фенолом, резорціном, гідрохіноном, пірокатехіном) із подальшим їх ферментативним окисненням у присутності перексиду водню.

Пероксидаза — фермент класу оксидоредуктаз, що каталізує в присутності перексиду водню окиснення фенолів, ароматичних амінів тощо [5].

Полі-N-вінілкапролактамі — термоосаджуваний полімер, який має високу гідрофільність, виражену здатність до комплексоутворення, він є нетоксичним, що дозволяє використовувати його як матрицю для іммобілізації широкого спектра біологічно активних

речовин, у тому числі білків, алергенів, ферментів [6].

### Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували пероксидазу хрому (ПОХ), виділену за модифікованим нами методом Баха [7]. У виділеному ферментному препараті визначали спектральний показник чистоти ( $RZ = A_{403}/A_{278} = 1,0$ ) і активність за фенолом (360 Од/мг препарату).

Концентрацію пероксидази і перексиду водню визначали спектрофотометрично (СФ-46), використовуючи молярні коефіцієнти поглинання  $\epsilon = 102\,000$  моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при 403 нм і  $\epsilon = 72,4$  моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> при 230 нм відповідно [8].

За одиницю пероксидазної активності брали таку кількість препарату, яка каталізувала окиснення фенолу (1 мкмоль) за 20 с при рН-7,0 і 20 °С.

Процес іммобілізації пероксидази полягав у розчиненні

ферменту в 8–10%-му розчині ПВК (М. м. 1,5 млн) з подальшим додаванням отриманого розчину в термостатований при 40 °С 0,1 моль/дм<sup>3</sup> Na-фосфатний буферний розчин (рН-7,0), що містить розчин фенольної сполуки як стабілізатора гранулоутворення. Отримані легковідокремлювані гранули ПВК з пероксидазою і включеними фенолами вміщували в Na-фосфатний буферний розчин (рН-7,0) і окиснювали пероксидом водню.

Кількість включеної ( $\eta$ ) фенольної сполуки знаходили за

різницею її вмісту в вихідному розчині та в розчинах, одержаних після відокремлення гранул згідно з [9]. Ступінь трансформації включеної в ПВК фенольної сполуки визначали шляхом розчинення гранул у розчині гідроксиду амонію (0,2 моль/дм<sup>3</sup>).

### Результати дослідження та їх обговорення

Підставою для вивчення іммобілізації пероксидази в полі-N-вінілкапролактамах послужили дані робіт [10; 11] про

зв'язування ПВК у ході термоосадження різних сполук, включаючи ферменти, за допомогою фенолів.

Нами запропоновано метод іммобілізації пероксидази хрому в ПВК у присутності стабілізаторів — фенолу, резорцину, пірокатехіну і гідрохінону з подальшим їх окисненням пероксидом водню.

Взаємодія пероксидази і ПВК підтверджена зміною кінематичної в'язкості розчинів і може бути зумовлена як механічним включенням ферменту в сітку полімеру, так і можливим утворенням водневого зв'язку між карбонільною групою капролактаму і гідроксильними групами білка [11].

У спектрах поглинання розчинів ферменту з носієм (200–350 нм) спостерігалось підвищення оптичної густини (гіперхромний ефект), яке доводило взаємодію пероксидази з ПВК, що співвідноситься з даними віскозиметрії (табл. 1). Методом мольних відношень визначали критичне мольне співвідношення ПОХ:ПВК 1:0,4, нижче якого відбувається механічне включення ферменту в матрицю.

Для оптимізації умов іммобілізації пероксидази в полі-N-вінілкапролактамах вивчали масові співвідношення фермент:ПВК, фенол:ПВК, наявність поліетиленгліколю (ПЕГ-6000), вплив рН середовища, температури і часу інкубації.

Як впливає з даних табл. 2, максимальна активність іммобілізованої пероксидази спостерігалася при ваговому співвідношенні ПОХ:ПВК 1:20, додавання ПЕГ (10%-й розчин) сприяло її зростанню в 1,5 рази. Можливо, що збільшення в'язкості середовища при додаванні ПЕГ перешкоджає виходу ферменту в розчин з гранул ПВК. Відомо також, що водорозчинні полімери (поліетиленгліколь, поліетиленімін, полі-L-лізин) є стабілізаторами ферментативної активності ПОХ [12].

Таблиця 1  
Визначення в'язкості розчинів пероксидази хрому

Зразки	В'язкість			
	Відносна	Питома	Приведена, мкмоль	Кінематична, м <sup>2</sup> /с
ПВК	1,45	0,45	0,34	1,27
ПОХ+ПВК	1,34	0,34	0,25	1,18
ПОХ+ПВК+Фенол	1,23	0,23	0,17	1,08
ПОХ+ПВК+ +Фенол+ПЕГ	1,4	0,40	0,30	1,23

Таблиця 2

Залежність активності пероксидази від масового співвідношення фермент:ПВК\*

Вагове співвідношення ПОХ:ПВК	Активність ПОХ			
	Без додавання ПЕГ		З додаванням ПЕГ	
	М±m, ОД/мг	% від вих.	М±m, ОД/мг	% від вих.
1:10	138,9±4,2	38,6	260,2±9,3	72,3
1:20	162,3±5,8	45,1	274,6±8,2	76,3
1:40	124,2±3,5	34,5	254,8±10,1	70,8
1:60	60,1±6,2	16,7	187,2±8,7	52,0

Примітка. \* — вагове співвідношення фенол:ПВК 1:3,5; при n = 6 P < 0,001.

Таблиця 3

Залежність ступеня включення ( $\eta$ ) фенолів у ПВК від вагового співвідношення фенольна сполука:ПВК\*

Фенольна сполука	Фенол:ПВК	$\eta$ , % від вих.
Фенол	1:2,0	73,2
	1:2,5	92,7
	1:(3,0–4,5)	97,5–100,0
Гідрохінон	1:2,0	61,9
	1:2,5	74,3
	1:3,0	88,4
	1:(3,5–4,5)	98,0–100
Резорцин	1:2,0	79,1
	1:2,5	95,4
	1:(3,0–4,5)	100,0
Пірокатехін	1:2,0	77,8
	1:2,5	93,7
	1:3,0 (4,5)	98,0–100,0

Примітка. \* — вагове співвідношення фермент:ПВК 1:20; 10%-й розчин ПЕГ.

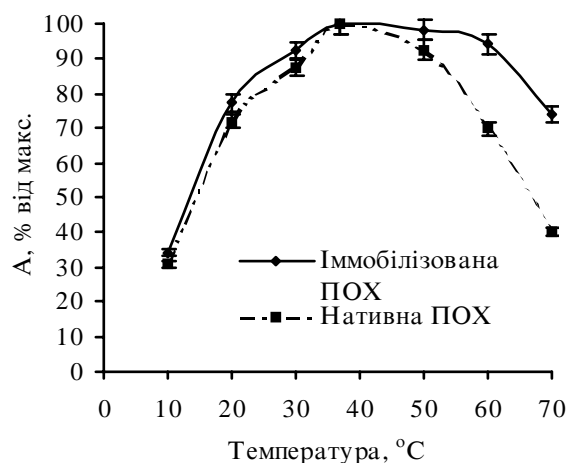
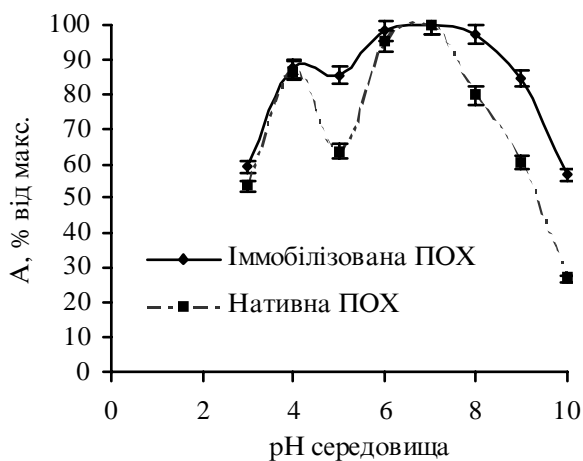


Рис. 1. Залежність активності (А) нативної та іммобілізованої пероксидази від рН (а) і температури (б) інкубаційного середовища: ([фенол]= 100 ммоль/дм<sup>3</sup>; [Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>]= 100 ммоль/дм<sup>3</sup>; А<sub>ПОХ</sub> 18 ОД/мг)

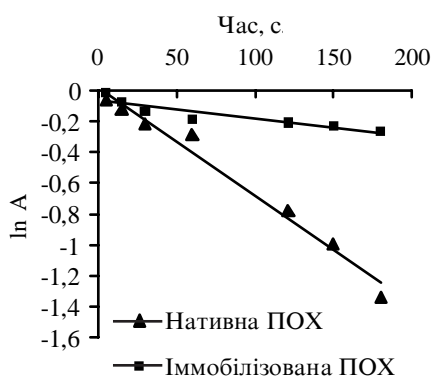


Рис. 2. Термоінактивація нативної та іммобілізованої ПОХ

Встановлено, що ступінь включення фенолів (фенол, гідрохінон, резорцин, пірокатехін) у ПВК залежить від масового співвідношення фенольна сполука:носії, досягаючи максимуму в інтервалі 1:(3,0–4,5) (табл. 3).

Високий рівень включення досліджуваних фенолів (83,5–100 %) спостерігається при їх концентраціях 50–150 ммоль/дм<sup>3</sup>, за 20 хв при рН=6,0–7,0 і температурі 40–42 °С; при цьому були одержані препарати у вигляді оформлених, стійких гранул сферичної форми.

Процес включення фенолів у ПВК має складний характер: разом із утворенням водневого зв'язку між карбонільною групою капролактамних ланок і гідроксильною групою фенолу (підтверджено методами ЯМР <sup>13</sup>С і ІЧ-спектроскопії) не можна заперечувати і роль дисперсійних взаємодій і

подальше механічне захоплення фенольної сполуки [4].

При визначенні залежності пероксидазної активності одержаного препарату від рН і температури інкубаційного середовища слід зазначити розширення рН- і термооптимальності активності іммобілізованого ферменту в область кислих і лужних значень (4,0–9,0) і високих температур (20–70 °С) порівняно з нативним (рН=4,0; 6,0–7,0; температура 20–40 °С), що свідчить про стабілізацію іммобілізованої ПОХ (рис. 1). При дослідженні термостабільності було визначено, що інкубація протягом 3 год при 50 °С на 6–8 % знижувала активність іммобілізованого ферменту, а нативного — на 33–35 %. Порівняння констант термоінактивації, розрахованих з кінетичних кривих термоінактивації (рис. 2) нативної та іммобілізованої ПОХ, показало, що іммобілізована ПОХ більш стабільна, ніж нативна форма ферменту ( $2,7 \cdot 10^{-5}$  і  $1,43 \cdot 10^{-4}$  с<sup>-5</sup> відповідно).

При додаванні перексиду водню в інкубаційну суміш, що містить гранули з іммобілізованою пероксидазою, стабілізованою фенольними сполуками, відзначили утворення високомолекулярних продуктів окиснення фенолів, що накопичувались у гранулах [13].

Нами визначено оптимальні умови проведення кількісної конверсії фенолів, включених у ПВК: концентрація фенольних сполук 25–75 ммоль/дм<sup>3</sup>, перексиду водню — 50–100 ммоль/дм<sup>3</sup>, активність пероксидази 18,0–25,2 ОД/мг. Збільшення концентрацій фенолів до 100 ммоль/дм<sup>3</sup> і більше спричинює зменшення ступеня їхньої конверсії внаслідок впливу надлишку фенокислих радикалів, які інгібують активний центр ПОХ [14]. Слід зазначити, що ступінь конверсії досліджуваних фенолів нативною ПОХ в 1,5–2 рази менше, ніж іммобілізованою.

Вивчення зберігання іммобілізованої в ПВК пероксидази (3–5 °С) довело кількісне збереження ферментативної активності впродовж 4 міс, тоді як нативний фермент у буферному розчині (рН 7,0) через 2 тиж втрачав до 50 % початкової активності.

Таким чином, розроблено метод іммобілізації пероксидази в полі-N-вінілкапролактамі із стабілізацією ферменту, що дозволяє ефективно використовувати його для видалення і трансформації фенольних сполук із розчинів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Запольський А. К. Фізико-хімічні основи технології очищення стічних

вод. — К.: Лібра, 2000. — 551 с.

2. Прейс С. В., Каменев С. Б., Каллас 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-винилкапролактаном // 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