УДК 615.355:577.152.34

І. І. Романовська, *канд. хім. наук,*
С. С. Декіна

РОЗРОБКА РАНОВОГО ГІДРОГЕЛЕВОГО ПОКРИТТЯ З ІММОБІЛІЗОВАНОЮ ЛУЖНОЮ ПРОТЕАЗОЮ *BACILLUS SUBTILIS* НА ОСНОВІ МОДИФІКОВАНОГО ПОЛІ-N-ВІНІЛПІРОЛІДОНУ

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

В останні роки одним із пріоритетних напрямків розвитку біотехнології є дослідження з розробки медичних препаратів на основі іммобілізованих ферментів і ферментних систем, що прискорюють загоєння ран [1–3].

Процес загоєння рани — природний феномен. При цьому організм діє за достатньо стандартною схемою, що починається зі згортання крові, утворення струпа, очищення рани від загиблих тканин, чужорідних тіл і мікроорганізмів, а наприкінці формує для заповнення дефекту нову грануляційну тканину, що з часом перетворюється і може виконувати всі функції, властиві шкірним покривам. У зв'язку з цим особлива увага приділяється розробкам сучасних ранових пов'язок, застосування яких відповідно з фазами загоєння суттєво розширює спектр терапевтичних можливостей [4; 5]. Викликають інтерес полімерні гідрогелеві ранові покриття плівкового типу з біологічно активними речовинами (БАР), що мають низку переваг: пластичність, що забезпечує моделювання на рані, можливість візуального контролю за її станом, охолоджуючу дію, запобігаючи розвитку гноєтворної інфекції, створення на рані вологого середовища, оптимального для нормалізації процесів регенерації. Вони розм'якшують і лізують некротичні утворення, сприяють елімінації ексудату, пригніченню мікрофлори.

Одним із найбільш перспективних носіїв для створення таких матеріалів є полі-N-вінілпіролідон (ПВП), що має виражену терапевтичну дію та дозволений до медичного застосування.

Підставою для вивчення іммобілізації лужної протеази в модифікований ПВП стали роботи [6; 7] щодо створення ранових і опікових покриттів на основі ферментів і ферментних систем.

Метою роботи була розробка гелевого ранового покриття з лужною протеазою *B. subtilis* на основі модифікованого золем полікремнієвої кислоти полі-N-вінілпіролідону.

Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували внутрішньоклітинну лужну серинову протеїназу *Bacillus subtilis* (К.Ф. 3.4.21.14), штам 72, виробництво ВО «Ензим», Україна, з протеолітичною активністю 65 ОД/г ферменту; полі-N-вінілпіролідон (М. м. $2 \cdot 10^6$).

Протеолітичну активність протеази визначали модифікованим методом Ансона [8]. За одиницю протеолітичної активності брали таку кількість ферменту, що за 1 хв при 37 °С каталізує розщеплення казеїну до продуктів, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою, вміст яких виражено в мікромолях тирозину. Вміст білка контролювали методом Лоурі — Хартрі [9].

Іммобілізацію здійснювали, попередньо модифікуючи ПВП [10]. У ході модифікації при постійному перемішуванні вносили 135 мг лужної протеази (65 ОД/г). Суміш перемішували до однорідної консистенції та виливали у форми, сушили при кімнатній температурі до вмісту води 45 %, герметично пакували та піддавали γ-стерилізації дозою 15 кГр.

ІЧ-спектри модифікованого ПВП знімали у твердих плівках і таблетках KBr на спектрофотометрі Specord IR 75.

Для вивчення залежності протеолітичної активності лужної протеази від pH рівні за активністю проби іммобілізованого і вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (pH 4,0–10,0) з подальшим визначенням активності. Вплив температури на залишкову активність гідролізу казеїну вільним та іммобілізованим ферментом вивчали в діапазоні від 10 до 70 °С при pH 7,4. Для вивчення термостабільності рівні за активністю проби термостатували при 50 °С і визначали залишкову активність з інтервалом 10–20 хв. Константи швидкості інактивації обчислені з використанням кінетичної схеми дисоціативної термоінактивації для іммобілізованого препарату і за тангенсом кута нахилу прямої графіка залежності натурального логарифма величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії — для вільного.

Кінетику гідролізу вільною та іммобілізованою лужною протеазою визначали за початковими швидкостями гідролізу казеїну. На основі отриманих даних будували графік у координатах Хейнса. Методом найменших квадратів визначали tg кута нахилу, який чисельно дорівнює $1/V_{max}$, а точка перетину екстрапольованої прямої з віссю ординат дорівнює $K_м/V_{max}$, точка перетину з віссю абсцис — $K_м$.

Результати дослідження та їх обговорення

Матриця для іммобілізації представлена співробітниками Московської державної академії тонкої хімічної технології ім. М. В. Ломоносова. Модифікований ПВП являє собою органонеорганічний гібрид — продукт сполучення кремнійвмісного продукту і високомолекулярного ПВП у цілісній структурі. Слід зазначити, що при модифікації ПВП втрачає здатність розчинятись у воді, що дозволяє одержати нерозчинні покриття.

Одержанню вищеописаної матриці сприяють численні водневі зв'язки між киснем карбонільної групи лактамного кільця ПВП і воднем силанольної групи золю полікремнієвої кислоти, що підтверджується методами ІЧ-спектроскопії.

В ІЧ-спектрах модифікованого ПВП спостерігається зменшення інтенсивності смуги поглинання 3750 $см^{-1}$, що характеризує вільні силанольні групи, і поява широкої смуги з максимумом близько 3350 $см^{-1}$, що відповідає силанольним групам, які беруть участь в утворенні водневого зв'язку.

У результаті іммобілізації були отримані однорідні плівки, характеристики яких наведені в табл. 1.

При іммобілізації відзначене кількісне включення ферменту і 100%-не збереження протеолітичної активності (65 ОД/г) у діапазоні масових співвідношень ПВП: фермент 1:0,1–1:0,2 (табл. 2). Максимум активності ферменту спостерігається через 4 год, і протягом доби вона залишається постійною, виконуючи тим самим пролонговану протеолітичну дію. Отриманий іммобілізований препарат стабільний при зберіганні в умовах низьких температур (0–4 °С) протягом 12 міс.

Таблиця 1

Характеристика ферментного препарату лужної протеази, іммобілізованої в модифікований полі-N-вінілпіролідон

Показники	Результати визначення
Протеолітична активність, ПО/г препарату	65,3±1,3
Вміст ферменту, мг/г препарату	24,3±0,7
Вміст води, %	45,2
Органолептичні характеристики	Однорідні, еластичні плівки, без запаху
Площа, $см^2$	64,1±1,9
Товщина, мм	3,5±0,4
Маса, г	5,5±0,2
Розчинність у воді, фіз. розчині	Нерозчинні

Примітка. У табл. 1–3: P>0,001; n=6.

Таблиця 2

Вплив масового співвідношення полі-N-вінілпіролідон : протеаза на протеолітичну активність іммобілізованого ферменту

Масове співвідношення ПВП : протеаза	Протеолітична активність лужної протеази	
	ПО/г, M±m	Від макс., %
1 : 0,5	19,6±0,6	30,7
1 : 0,2	65,3±1,9	100,0
1 : 0,1	64,1±1,8	98,1
1 : 0,02	53,8±1,6	82,4

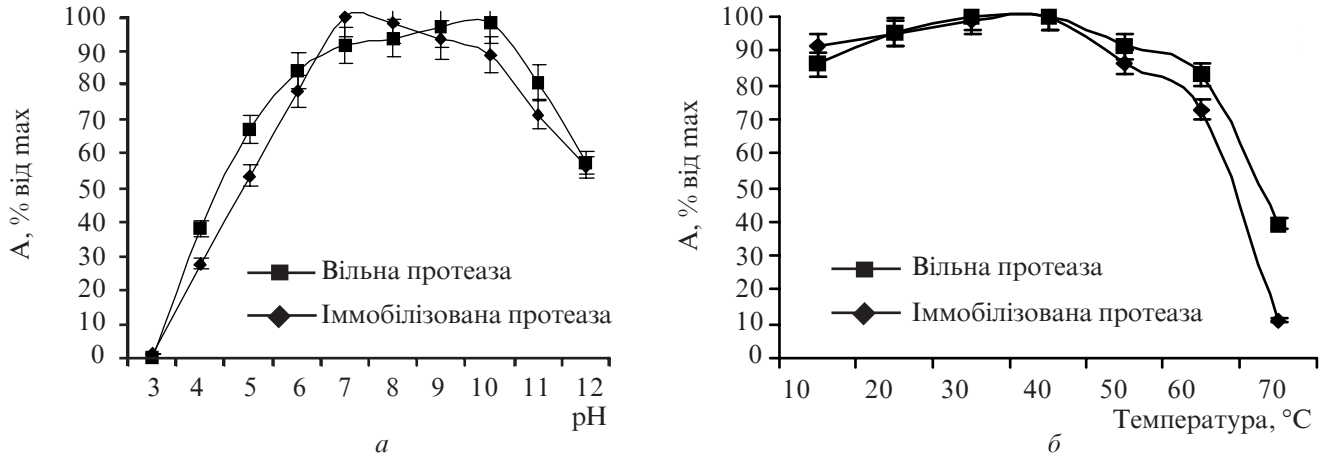
Вивчення залежності протеолітичної активності отриманого препарату від pH інкубаційного середовища показало розширення pH-профілю активності в зону нейтральних значень pH і підвищення pH-стабільності (при pH 5,5), що пояснюється впливом високого значення pH у ході іммобілізації.

Температурні залежності швидкості гідролізу казеїну вільною та іммобілізованою лужною протеазою подані на рис. 1. Дослідження термічної інактивації отриманого препарату показало значне підвищення його термостабільності, константи термоінактивації становлять відповідно $2{,}76 \cdot 10^{-2}$ $хв^{-1}$, $8{,}417 \cdot 10^{-4}$ $М^{-1}хв^{-1}$ для вільного й іммобілізованого ферменту.

Досліджено кінетичну криву початкових швидкостей гідролізу казеїну вільною та іммобілізованою лужною протеазою (рис. 2). Кінетичні параметри гідролізу наведені в табл. 3.

Іммобілізація ферменту приводить до зміни константи Міхаеліса, що можна пояснити збільшенням в умовах гетерогенного каталізу спорідненості ферменту до субстрату або ж локальним збільшенням концентрації субстрату в мікрооточенні ферменту. Зниження швидкості всього процесу може відбуватися внаслідок дифузійних обмежень, що виникають у присутності полімеру.

У діапазоні концентрацій, що перевищують 1,8 г/$дм^3$ для вільної протеази та 0,7 г/$дм^3$ для іммобілізованої, спостерігається інгібування ферменту субстратом. Проведення кінетичних досліджень дозволяє



а *б*

Рис. 1. Залежність активності (А) вільної та іммобілізованої лужної протеази від pH *(а)* і температури *(б)* інкубаційного середовища

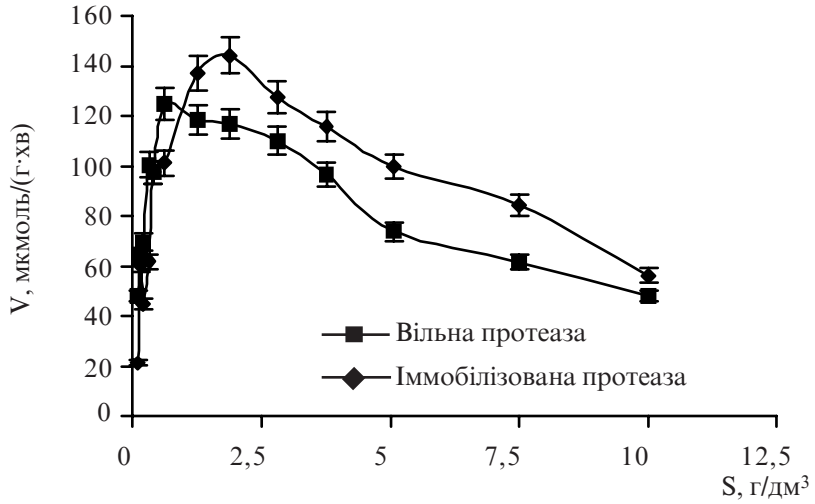


Рис. 2. Залежність спостережуваної швидкості гідролізу казеїну вільною та іммобілізованою протеазою від концентрації субстрату

Таблиця 3

Кінетичні параметри лужної протеази *Bacillus subtilis*

Лужна протеаза	$K_м$, г/дм^3	V_{max}, мкм/(г·хв)	K_i, г/дм^3	$S_{опт}$, г/дм^3	$V_{опт}$, мкм/(г·хв)
Вільна	0,57	193,5	5,98	1,85	147,5
Іммобілізована	0,12	127,8	4,47	0,74	109,7

прогнозувати ступінь швидкості лізису некротичних утворень, а, отже, час і необхідне дозування препарату.

Проведена γ-стерилізація (15 кГр) отриманих препаратів на підприємстві ВАТ «Гемопласт». Після опромінення протеолітична активність іммобілізованого ферменту становила 60,2 % від вихідної.

Таким чином, у результаті проведеної роботи було отримане гідрогелеве ранове покриття пролонгованої протеолітичної дії на основі модифікованого золем полікремнієвої кислоти полі-N-вінілпіролідону з іммобілізованою лужною протеазою *B. subtilis*.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Давиденко Т. И.* Иммобилизация ферментных препаратов // Вісник ОНУ. Серія хім. — 2003. — Т. 8, № 4. — С. 135-147.

2. *Севастьянова Е. В., Давиденко Т. И.* Иммобилизация протеолитических ферментов на угольных материалах // Прикл. биохим. и микробиология. — 1993. — Т. 29, № 3. — С. 375-380.

3. *Давиденко Т. И., Кравченко И. А.* Лечебные пластыри с протеолитическими ферментами // Фармаком. — 1993. — № 11. — С. 46-52.

4. *Юданова Т. Н., Решетов И. В.* Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Хим.-фарм. журнал. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 24-31.

5. *Шаповалов С. Г.* Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. — 2005. — Вып. 8. — С. 38-46.

6. *Давиденко Т. И., Кравченко И. А.* Включение щелочной протеазы и β-галактозидазы в радиационно-сшитый поли-N-винилкапролактам // Доп. НАН України. — 1996. — № 3. — С. 120-124.

7. *Експериментальна* оцінка ранозагоюючої ефективності, іммобілізованої на активованому вуглеволокнистому матеріалі лужної протеази / В. М. Коваленко, М. І. Козлов, Т. І. Давиденко та ін. // Ліки. — 1998. — № 2. — С. 59-61.

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

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

10. *Патент* РФ 2198685 С1 Медицинский полимерный гелевый материал и лечебные средства на его основе / И. И. Пашкин, В. Ю. Богачев, В. П. Зубов. — № 2001134048/14; Заявл. 18.12.2001; Опубл. 20.02.2003.