

Таким чином, потужні сано-генетичні властивості препарату GA-40 сприяли покращанню головного енергозалежного процесу нирок — реабсорбції іонів натрію в проксимальних і дистальних канальцях за поліурічної стадії сулемової нефропатії.

Висновки

Препарат GA-40 в умовах розвитку гепаторенального синдрому за поліурічної стадії сулемової нефропатії виявляв захисну дію на збалансованість регуляторних процесів у кірковій речовині нирок і печінці, що проявляється у відновленні активності лужної фосфатази в кірковій речовині нирок і сукцинатдегідрогенази у третій функціональній ділянці печінкової часточки та супроводжується покращанням головного енергозалежного процесу нирок — реабсорбції іонів натрію в проксимальних і дистальних канальцях.

Перспективи. З'ясування протекторного впливу препарату GA-40 на запобігання дисфункції печінки і нирок за умов

розщеплення окиснення та фосфорилювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Методы изменения клеток и ядер / Г. Г. Автандилов. — М. : Медицина, 1973. — 159 с. — (Морфометрия в патологии)
2. Гоженко А. І. «Приховане» ушкодження проксимального відділу нефрону / А. І. Гоженко, Ю. Є. Роговий, О. С. Федорук // Одеський медичний журнал. — 2001. — № 5 (67). — С. 16–19.
3. Дікал М. В. Роль препарату GA-40 в корекції тубуло-інтерстиційного синдрому при хронічному нефриті Мазугі / М. В. Дікал, Ю. Є. Роговий // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. — 2006. — Т. 5, № 3. — С. 14–16.
4. Дікал М. В. Роль фактора некрозу пухлин альфа в патогенезі тубуло-інтерстиційного синдрому за хронічного нефриту Мазугі / М. В. Дікал, Ю. Є. Роговий // Вісник наукових досліджень. — 2007. — № 2. — С. 108–111.
5. Маммаев С. Н. Гепаторенальный синдром 1-го и 2-го типа: современное состояние проблемы / С. Н. Маммаев, А. М. Каримова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2008. — Т. 18, № 6. — С. 4–14.
6. Пішак В. П. Універсальність ушкодження проксимального каналь-

ця при захворюваннях нирок / В. П. Пішак, В. В. Білокий, Ю. Є. Роговий // Клінічна та експериментальна патологія. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 72–76.

7. Роговий Ю. Є. Вплив препарату GA-40 на перебіг гепаторенального синдрому за умов гострої гемічної гіпоксії / Ю. Є. Роговий, Г. Б. Попович, М. Д. Перепелюк // Одеський медичний журнал. — 2009. — № 1 (111). — С. 19–22.

8. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії : навч.-метод. посібник / В. М. Магалаєс, А. О. Міхеєв, Ю. Є. Роговий [та ін.]. — Чернівці : Буковинська державна медична академія, 2001. — 42 с.

9. *TNF- α -dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion* / K. K. Meldrum, Y. Xiao, R. R. Desrosiers, R. Beliveau // *American Journal Physiology*. — 2002. — Vol. 282, N 2. — P. 540–546.

10. *Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation* / Helmy Siragy, Chun. Xue, Peter Abadir [et al.] // *Hypertension*. — 2005. — Vol. 45, N 1. — P. 133–137.

11. *Zhu Ning. Removal of tumor necrosis factor-J and interleukin-1 by plasma exchange in patients with diffuse proliferative glomerulonephritis* / Ning Zhu, Zhi-yong Zheng, Xiang-mei Chen // *J. Mod. Med.* — 2004. — Vol. 14, N 9. — P. 24–30.

УДК 577.15(088.8)

С. С. Декіна¹, А. П. Левицький², І. І. Романовська¹, С. О. Дем'яненко²

ПРОТИЗАПАЛЬНА ДІЯ МУКОАДГЕЗИВНИХ ПЛІВОК З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ЛІЗОЦИМОМ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ ЩОКИ ЩУРІВ

¹Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

²ДУ «Інститут стоматології НАМН України», Одеса

Запальні захворювання слизової оболонки порожнини рота в даний час є однією з найважливіших проблем стоматології. Ефективну протизапальну, імунокоригувальну, бактеріолітичну й адаптаційно-трофічну дію має лізоцим, фермент класу гідролаз, що широко застосовується при лікуванні хронічних септичних і

гнійних процесів, афтозних стоматитів та інших інфекційних захворювань. Лізоцим не токсичний, не спричинює подразнювальної дії та може використовуватися при поганій переносимості інших антибактеріальних препаратів [1].

Пероральний шлях застосування білків, пептидів або нуклеотидів не завжди ефектив-

ний, що пояснюється їх нестабільністю і низькою проникністю слизових оболонок для високомолекулярних речовин [2]. Використання мукоадгезивних лікувальних плівок (МАЛП) дозволяє підвищити біодоступність включеного препарату внаслідок створення локальної концентрації та збільшення тривалості контакту з патологічно



зміненою слизовою оболонкою порожнини рота [3–5].

Метою роботи стало дослідження протизапальної дії розроблених мукоадгезивних плівок із лізоцимом на слизову оболонку щоби щурів. Матрицею для іммобілізації лізоциму був обраний мукоадгезивний модифікований природний полімер — желатин — через гідрофільність, велику кількість груп, здатних утворювати водневі зв'язки, рухливість ланцюгів, достатню для дифузії як через слиз, так і епітеліальну тканину. Для посилення мукоадгезії полімерних плівок під час іммобілізації використовували натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ), що характеризується великим вмістом полярних груп (таких як COOH і OH) [5].

Матеріали та методи дослідження

У дослідженнях використовували комерційний препарат лізоциму (КФ 3.2.1.17) яєчного білка ("Applichem", Бельгія), харчового желатину (ДСТУ 11253-89), Na-КМЦ (Akucell AF 3265 харч., Росія), гліцерин (фарм.), хлоргексидину біглюконат (КП «Луганська обласна "Фармація"», Україна).

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом, використовуючи як субстрат ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) [1]. Вміст білка в препараті контролювали методом Bradford [6].

Іммобілізацію лізоциму проводили таким чином: до 9 см³ 15%-го водного розчину желатину додавали 1 см³ водного розчину лізоциму в концентрації 0,1 / 0,5 / 1 % від желатину, перемішували протягом 20 хв при температурі 30 °С, потім додавали 1 см³ гліцерину та 1 см³ водного розчину Na-КМЦ у концентрації 0,5 % від желатину, з подальшим ретельним перемішуванням. Отриману суміш виливали на підкладку, сушили при кімнат-

ній температурі. Після висушування висікали плівки діаметром 6 мм, обробляли 0,05%-м розчином хлоргексидину біглюконату, герметично запакували та зберігали при температурі +4 °С.

У досліджах *in vitro* були вивчені фізико-хімічні особливості функціонування іммобілізованого препарату порівняно з вільним (збереження активності лізоциму після іммобілізації, рН, термооптими активності, час зберігання), вплив 0,05%-го розчину хлоргексидину біглюконату на активність лізоциму.

У досліджах *in vivo* використовували 42 щури лінії Вістар (самки віком 15 міс.). У I серії біологічних експериментів на 18 інтактних тваринах перевіряли здатність лізоциму дифундувати з МАЛП у слизову оболонку щоби щурів, яким накладали плівку з лізоцимом. Через 10 і 30 хв після накладання МАЛП відсікали відповідну ділянку слизової оболонки порожнини рота (СОПР) під плівкою (після її видалення) та в гомогенаті тканини визначали активність лізоциму. У II серії біологічних дослідів на 24 щурах вивчали вплив МАЛП з лізоцимом на розвиток запальних процесів у СОПР після моделювання стоматиту за допомогою бджолиної отрути [7]. Тварини були розподілені на 3 групи по 8 особин: 1-ша — контроль, 2-га і 3-тя — експериментальний стоматит. У 3-й групі на місце введення бджолиної отрути накладали на 20 хв МАЛП. Через 2 доби тварин забивали під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) і в гомогенаті СОПР визначали рівень маркерів запалення [8]: активність еластази, концентрацію малонового діальдегіду (МДА), показник мікробного обсіменіння тканин — активність уреазі [9], рівень неспецифічного імунітету — активність лізоциму [9].

Отримані дані оброблялися після формування бази даних у Microsoft Excel. Статистичну

обробку проводили за допомогою Microsoft Excel (для параметричних даних — середнє значення M, стандартне відхилення sd). Для визначення статистичних відмінностей кількісних показників у виділених групах і підгрупах тварин застосовувалися непараметричні критерії (критерій знаків і U-критерій Манна — Уїтні). Вірогідними дані вважалися при рівнях значущості P<0,05 і P<0,01. Розрахунок показників виконували за допомогою SPSS 15.0.

Результати дослідження та їх обговорення

У досліджах *in vitro* досліджено збереження гідролітичної активності лізоциму після іммобілізації при різних масових відношеннях фермент : носій (рис. 1), доведена доцільність використання 0,5–1%-ї концентрації лізоциму в плівці.

У результаті іммобілізації ферменту в желатині з додаванням Na-КМЦ отримані однорідні прозорі полімерні плівки блідо-жовтого кольору, товщиною 0,4 мм, характеристики яких наведені в табл. 1.

Нами показано 100 % збереження активності іммобілізованого лізоциму після антисеп-

Гідролітична активність, % від вих.



Рис. 1. Залежність гідролітичної активності лізоциму від його вмісту у мукоадгезивних лікувальних плівках



Таблиця 1
Характеристики вільного й іммобілізованого лізоциму

Властивість ферменту	Лізоцим	
	Вільний	Іммобілізований
Активність, од/см ³	2500±125	2500±125
pH-оптимум	6,2	6,7
Термооптимум, °C	50–55	45–60
Час зберігання, міс.	0,25	6

тичної обробки плівок хлоргексидину біглюконатом, препаратом бактерицидної дії відносно грам-позитивних і грам-негативних бактерій.

Досліджено здатність іммобілізованого лізоциму (вміст у

плівці 0,5–1 %) дифундувати з МАЛП у водний розчин. Згідно з проведеними експериментами, 75 % літичної активності іммобілізованого ферменту спостерігається вже через 30 хв інкубації.

Результати експериментів у I біологічній серії досліджень подані на рис. 2. Найбільша концентрація лізоциму у тканині спостерігається після використання МАЛП з 1,0%-м вмістом ферменту. Тривалість аплікації повинна бути не менше 15 хв.

Результати експериментів II біологічної серії наведені в табл. 2, з якої видно, що моделювання стоматиту спричинює вірогідне збільшення рівня маркерів запалення (еластази та МДА), значне (у 2,6 рази) збільшення активності уреазы

та явну тенденцію до збільшення активності лізоциму. Однак через великий розкид показників зміна активності лізоциму невірогідна.

Таким чином, використання лізоцимних МАЛП на основі желатину забезпечує надходження ензиму до ураженої ділянки, з подальшою ферментативною протизапальною й антимікробною дією при експериментальному стоматиті.

Ці дані свідчать про доцільність клінічного дослідження МАЛП з лізоцимом у хворих на стоматит.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Левицкий А. П.* Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса : КП ОГТ, 2005. – 74 с.
2. *Morishita M.* Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? (Review) / M. Morishita, N. A. Peppas // *Drug Discovery Today*. – 2006. – Vol. 11, N 19/20. – P. 905–910.
3. *Лікарські форми у вигляді полімерних плівок як засіб лікування стоматологічних та інших захворювань слизової оболонки (огляд літератури та власних досліджень)* / І. С. Гриновець, Т. Г. Калинюк, А. В. Мальований [та ін.] // *Журнал АМН України*. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 336–343.
4. *Харенко Е. А.* Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор) / Е. А. Харенко, Н. И. Ларионова, Н. Б. Демина // *Хим.-фарм. журнал*. – 2009. – Т. 43, № 4. – С. 21–29.
5. *Punitha S.* Polymers in mucosal adhesive buccal drug delivery system — a review / S. Punitha, Y. Girish // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol. 1, N 2. – P. 170–186.
6. *Якубке Х. Д.* Аминокислоты, пептиды, белки / Х. Д. Якубке. – М. : Наука, 1985. – С. 335–356.
7. *Ткачук Н. И.* Биохимические изменения в тканях полости рта крыс при воспроизведении стоматита с помощью пчелиного яда / Н. И. Ткачук, В. Я. Скиба, А. П. Левицкий // *Вісник стоматології*. – 2007. – № 6. – С. 16–20.
8. *Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости (метод. рекомендации)* / А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.]. – Одесса, 2010. – 16 с.
9. *Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков : метод. рекомендации* / сост. А. П. Левицкий, О. А. Макаренко [и др.]. – К. : ГФЦ, 2007. – 22 с.

Вміст лізоциму, од/кг тканини

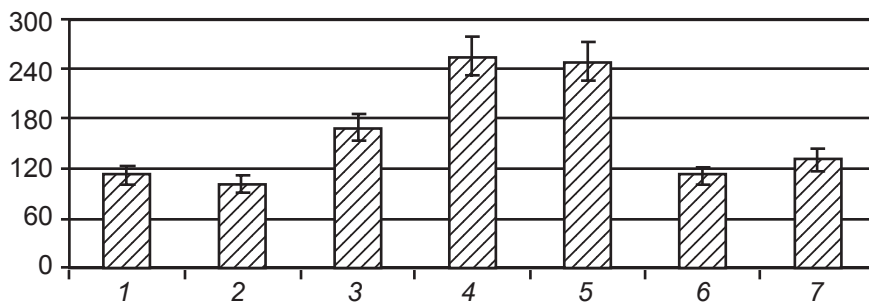


Рис. 2. Нагромадження лізоциму в тканині слизової оболонки порожнини рота щурів після накладання мукоадгезивних лікувальних плівок із лізоцимом: 1 — контроль; 2 — концентрація лізоциму 0,1 % (20 хв); 3 — концентрація лізоциму 0,5 % (20 хв); 4 — концентрація лізоциму 1,0 % (20 хв); 5 — концентрація лізоциму 1,0 % (15 хв); 6 — концентрація лізоциму 1,0 % (10 хв); 7 — концентрація лізоциму 1,0 % (5 хв)

Таблиця 2

Вплив мукоадгезивних лікувальних плівок з лізоцимом на біохімічні показники слизової оболонки порожнини рота щурів при експериментальному стоматиті

Показник	1-ша група, контроль	2-га група, стоматит	3-тя група, стоматит + МАЛП
Еластаза, мкат/кг	0,030±0,002	0,049±0,003 p<0,001	0,037±0,003 p>0,05; p ₁ <0,05
МДА, ммоль/кг	15,1±1,1	19,8±0,8 p<0,05	16,0±1,0 p>0,1; p ₁ <0,05
Уреаза, мк-кат/кг	1,02±0,24	2,63±0,44 p<0,05	1,06±0,43 p>0,05; p ₁ >0,3
Лізоцим, од/кг	138±32	87±34 p>0,1	210±70 p>0,1; p ₁ >0,05

Примітка. p — показник вірогідності різниці з 1-ю групою; p₁ — показник вірогідності різниці з 2-ю групою.

