

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ПЕЛОЇДУ КУЯЛЬНИЦЬКОГО ЛИМАНУ У СКЛАДІ НОВОЇ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Одеса

Вступ

Надмірний вміст активних форм кисню, викликаний порушенням про- й антиоксидантних систем організму, є причиною багатьох захворювань [1]. Поряд із синтетичними препаратами, в останні роки все більший інтерес викликають природні антиоксиданти. Сьогодні на основі природних пелоїдів розробляються біологічно активні пелоїдопрепарати широкого спектра дії [2; 3].

В обміні речовин та енергії в пелоїді важлива роль належить окисно-відновним ферментам — оксидоредуктазам, які виконують певні функції у ґрунтовій біодинаміці [4].

У результаті різноманітних біохімічних реакцій окиснення органічних сполук утворюється та нагромаджується перекис водню, який у надлишку є дуже токсичним і шкідливим для живих організмів, оскільки він сприяє перекисному окисненню ліпідів, унаслідок чого руйнується мембрана клітин [5]. Інактивація перекису водню відбувається під впливом каталази та пероксидази. Саме завдяки цьому антиоксидантна активність пелоїдів відіграє певну роль у механізмі їх протизапальної дії [4].

Медична практика має в своєму розпорядженні низку препаратів, отриманих з лікувальних пелоїдів різного походження. Проте такі препарати містять у своєму складі лише незначну частину речовин, які забезпечують лікувальним пелоїдам високу терапевтичну активність. Крім того, деякі з

них викликають побічні алергічні реакції [6]. Тому актуальною проблемою залишається пошук шляхів збереження терапевтичної дії лікарських форм на основі пелоїду.

Метою роботи було порівняння активності каталази та пероксидази в нативних, сухих і відновлених зразках природних пелоїдів, а також встановлення ферментативної активності пелоїду Куяльницького лиману за умови його включення до складу лікарських пов'язок.

Матеріали та методи дослідження

Визначення активності ферментів засноване на обліку кількості переробленого в процесі реакції субстрату в оптимальних умовах температури, концентрації субстратів і наважки пелоїду.

Визначення пероксидазної активності проводили за методом К. А. Козлова [4].

Дослідження каталазної активності пелоїду виконували за методом Р. С. Кацнельсона і В. В. Єршова. Активність каталази визначали при 42 °С протягом 2,5 год, відбираючи аліквоти для аналізу кожні 30 хв. Каталазну активність пелоїду визначали за формулою

$$(V_{\text{хол}} - V_i) \cdot k,$$

де $V_{\text{хол}}$ — об'єм титранту, який було витрачено на титрування холостої проби;

V_i — об'єм титранту, який було витрачено на титрування дослідної проби;

k — коефіцієнт розрахунку на 1 г сухого пелоїду.

Контрольні визначення проводили аналогічним чином на наважках пелоїду, прогрітих у термостаті протягом 1,5 год при температурі 160–170 °С для інактивації ферментів.

Для отримання сухого пелоїду нативні зразки центрифугували при 8000 об/хв протягом 1 год. При цьому відбувається розділення на рідку фазу (відгін) і твердий залишок. Отриманий відгін піддається висушуванню при $t = 60$ °С до постійної маси. Твердий залишок висушується на повітрі до постійної маси. З метою отримання 100 г пелоїду, ідентичного нативному, необхідно змішати 60 г сухого залишку після центрифугування, 5 г сухої суміші солей і 35 см³ дистильованої Н₂О. Отриману суміш перемішують до однорідної маси [7].

Виготовлення пов'язок на основі нативного пелоїду проводили так: до наважки полівінілового спирту додавали дистильовану воду, змішували, підігріваючи, до однорідної консистенції. Після охолодження розчину додавали наважку нативного пелоїду. Останнім вносили гліцерин. Співвідношення компонентів у відповідності до порядку їх внесення становило 1 : 6 : 10 : 6. Отриману однорідну суміш наносили на марлеву пов'язку та залишали висихати до постійної маси при кімнатній температурі.

Результати дослідження та їх обговорення

Широкого практичного застосування в медицині здобули процедури з сухими віднов-



леними природними пелоїдами, тому що при розробці методів сучасної пелоїдотерапії була врахована здатність природних пелоїдів зберігати в сухому вигляді основні фізико-хімічні властивості та біологічно активні речовини [8].

Пріоритетним завданням даного дослідження було порівняння антиоксидантних властивостей нативних і сухих зразків пелоїду Куяльницького лиману та Сакського озера. З метою встановлення можливості відновлення сухих зразків було проведено їх регенерацію шляхом додавання відповідної до початкової вологості кількості розчину ропи й інкубації при 37 °С протягом 2 і 5 діб.

Для отриманих зразків була встановлена пероксидазна активність, результати представлені на рис. 1.

Отримані результати вказують на значне зменшення пе-

роксидазної активності при висушуванні нативних зразків пелоїду (в 3–4 рази). При регенерації сухого пелоїду протягом 2–5 днів активність пероксидази дещо відновлюється. Зразки, які інкубували при 37 °С протягом 5 днів показали кращі результати пероксидазної активності (втрата активності порівняно з нативними зразками становить приблизно 20 % для зразків пелоїду Куяльницького лиману та 30 % — для пелоїду Сакського озера).

Таким чином, встановлено, що оптимальною умовою для відновлення пероксидазної активності сухого пелоїду є його регенерація протягом 5 днів.

Аналогічно була досліджена активність каталази (табл. 1).

Встановлено, що при висушуванні активність каталази в зразках пелоїду Куяльниць-

кого лиману зменшується в 1,5 рази і не відновлюється при регенерації протягом 2–5 днів.

Висушування пелоїду Сакського озера призводить до втрати активності каталази приблизно на 70 % у перші 30 хв інкубації, але вже через 2,5 год різниця каталазної активності між нативними та сухими зразками становить лише 25 %. Зразки, що піддавалися регенерації протягом 2–5 днів, показали кращу динаміку каталазної активності, і на 150-й хвилині інкубації втрата активності була в межах 5–10 %, що є прийнятним результатом.

Таким чином, можна припустити, що найбільш імовірним є невелика кількість вільних ферментів у складі нативного пелоїду як Куяльницького лиману, так і Сакського озера. Тому при висушуванні ми спостерігаємо практично повну їх інактивацію. Однак як нативний, так і сухий пелоїд містить мікроорганізми, які продукують пероксидазу та каталазу, що доводиться відновленням активності цих ферментів протягом інкубації з субстратом, а також відновленням ферментативної активності протягом 2–5 днів.

Враховуючи, що метою роботи є створення лікарської форми на основі пелоїду, для якої зберігалась би ферментативна активність, нами були розроблені лікувальні пов'язки. У цій лікарській формі ми намагалися провести іммобілізацію вільних ферментів за до-

Од/г сухого пелоїду

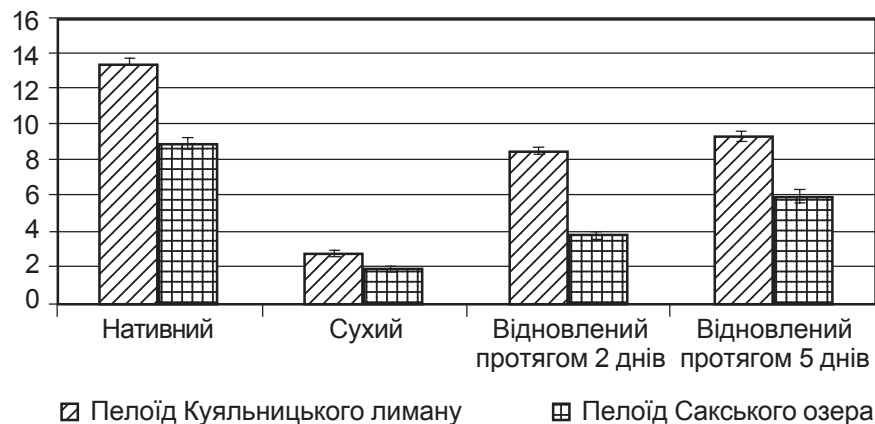


Рис. 1. Пероксидазна активність зразків пелоїду, Од/г сухого пелоїду

Таблиця 1
Активність каталази в зразках пелоїду Куяльницького лиману та Сакського озера, Од/г сухого пелоїду при температурі інкубації 42 °С

Досліджуваний зразок	Час інкубації, хв					
	0	30	60	90	120	150
Пелоїд Куяльницького лиману						
сухий	4,60±0,02	12,40±0,06	17,50±0,07	22,00±0,05	27,60±0,08	32,90±0,12
нативний	18,90±0,10	29,80±0,09	34,40±0,11	39,20±0,15	45,90±0,12	50,00±0,22
відновлений протягом 2 днів	13,60±0,02	19,30±0,04	22,70±0,11	26,30±0,10	34,10±0,13	30,80±0,22
відновлений протягом 5 днів	8,00±0,02	8,90±0,08	13,80±0,08	16,50±0,08	21,10±0,19	24,10±0,11
Пелоїд Сакського озера						
сухий	4,80±0,04	9,30±0,05	18,10±0,16	26,30±0,11	31,50±0,13	34,20±0,17
нативний	25,30±0,09	30,30±0,15	35,00±0,09	35,90±0,06	36,30±0,11	43,50±0,10
відновлений протягом 2 днів	11,40±0,07	26,60±0,10	33,40±0,18	33,40±0,14	35,80±0,15	41,50±0,18
відновлений протягом 5 днів	6,90±0,03	16,50±0,11	23,20±0,21	27,50±0,19	33,50±0,12	39,00±0,15

помогою полівінілового спирту і таким чином зберегти їх активність у процесі висушування.

Ферментативна активність каталази лікувальних пов'язок на основі нативного пелоїду Куяльницького лиману не тільки не поступається нативному пелоїду, а навіть перевищує його показники (рис. 2). Це може бути обумовлено тим, що каталаза підвищує свою активність, знаходячись у іммобілізованому стані.

При дослідженні розроблених лікарських форм було встановлено, що пов'язки на основі нативного пелоїду мають пероксидазну активність, яка майже відповідає активності нативного пелоїду (табл. 2). Необхідно також відмітити, що за умови регенерації пов'язок (замочування у воді при температурі 37 °С протягом 2–5 днів) пероксидазна активність зростає на 50 % порівняно з нативними зразками.

Висновки

Виходячи з отриманих результатів, встановлено, що при регенерації сухих зразків природних пелоїдів частково відновлюється їх ферментативна активність, яка втрачається за умов висушування.

Також встановлено, що пелоїд Куяльницького лиману демонструє кращі показники пероксидазної активності порівняно з пелоїдом Сакського озера. Висушування пелоїдів призводить до зниження їх пероксидазної та каталазної активності.

За умов регенерації, протягом 2–5 днів, активність пероксидази майже відновлюється як у зразках пелоїду Куяльницького лиману, так і в зразках пелоїду Сакського озера, активність каталази відновлюється лише в зразках пелоїду Сакського озера.

Розроблена лікарська форма на основі нативного пелоїду Куяльницького лиману за показниками каталазної активності не тільки не поступається нативному пелоїду, а й перевищує його активність приблизно на 30 %, а за умов ре-

Ферментативна активність, ОД/г сухого пелоїду

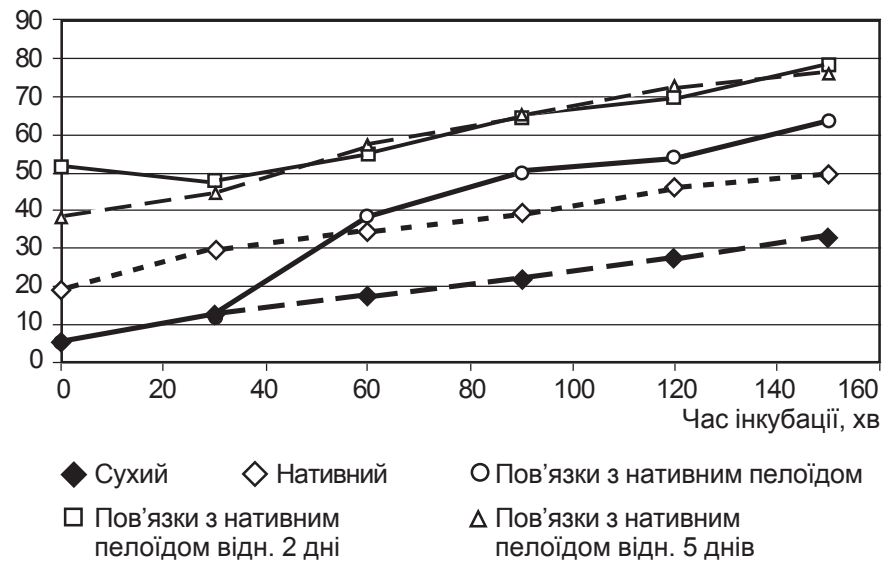


Рис. 2. Активність каталази в пов'язках на основі нативного пелоїду Куяльницького лиману, ОД/г сухого пелоїду

Таблиця 2

Пероксидазна активність пелоїду Куяльницького лиману в складі пов'язок, ОД/г сухого пелоїду

Досліджуваний зразок	ОД/г сухого пелоїду
Пелоїд нативний	13,49±0,23
Пелоїд сухий	2,71±0,12
Пов'язки з нативним пелоїдом	12,93±0,16
Пов'язки, інкубовані протягом 2 днів при 37 °С	18,59±0,09
Пов'язки, інкубовані протягом 5 днів при 37 °С	20,61±0,03

генерації — на 50 %. Пероксидазна активність пов'язок вірогідно не відрізняється від активності нативного пелоїду, а при їх інкубації протягом 2 і 5 днів перевищує на 35–50 % відповідно.

Розроблена лікарська форма у вигляді пов'язок повністю зберігає каталазну та пероксидазну активність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Тринус Ф. П. Фармакологическая регуляция воспаления / Ф. П. Тринус, Б. М. Клебанов, И. М. Гондта. — К., 1987.
2. Антиоксидантные свойства гуминовых веществ пелоидов / Н. П. Авакумова, А. Я. Герчиков, В. Р. Хайрулина, А. В. Жданова // Химико-фармацевтический журнал. — 2011. — Т. 45, № 3. — С. 50–51.
3. Низкодубова С. В. Экспериментальное обоснование и клиническое применение экстрактов лечебной грязи / С. В. Низкодубова // Во-

просы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. — 1986. — № 5. — С. 15.

4. Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв / Ф. Х. Хазиев. — М.: Наука, 1976.

5. Нечипуренко О. Н. Грязи — природные биогенные стимуляторы, механизмы целебного действия / О. Н. Нечипуренко // Провизор. — 1998. — № 6. — С. 54–57.

6. Агапов А. И. Способ получения пелоидопрепаратов гуминового ряда / А. И. Агапов, Н. П. Авакумова, Е. К. Баталова // Вопросы курортологии. — 1999. — № 2. — С. 33.

7. Пат. 201005381 Україна, МПК А 61 К 8/96, 35/02; А 61 Q 19/00; А 61 Р 17/00. Основа для виробництва косметичних та лікувальних грязьових препаратів / І. А. Кравченко, М. І. Скіпа, О. В. Альтер, С. Д. Саленко. — № 95862; заявл. 05.05.2010; опубл. 12.09.2011, Бюл. № 17.

8. Лещинский А. Ф. Пелоидо- и фармакотерапия при воспалительных заболеваниях / А. Ф. Лещинский, З. И. Зуза. — К., 1985.

