

Національна Академія Наук України
Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського

На правах рукопису

Граф'

Кравченко Ірина Анатоліївна

УДК 577.152.351;15(088.8)

**Імобілізація лужної протеази та β -галактозидази
на полімерних носіях**

02.00.10 - біоорганічна хімія, хімія природних
та фізіологічно активних речовин

**Автореферат
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата хімічних наук**

Одеса, 1995

077.7

ДВЗ.000

Роботу виконано в Фізико-хімічному інституті ім. О.В.Богатського НАН України

Науковий керівник: - доктор хімічних наук, професор
Давиденко Т.І.

Офіційні опоненти: - доктор хімічних наук, професор
Кінтя П.К.
доктор біологічних наук
Карасьова Т.Л.

Провідна установа: - Інститут хімії поверхні НАН України

Захист дисертації відбудеться "26" грудня 1995 р.
о "13" год. на засіданні спеціалізованої ради Д 05.14.02 у Фізико-хімічному
інституті НАН України за адресою: 270080, Одеса, Люстдорфське шосе, во.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Фізико-хімічного інституту ім. О.В.Богатського НАН України.

Автореферат розіслано "23" листопада 1995 р.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат хімічних наук

Л.О.Літвінова

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00754979 (+)

Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. Існуючий арсенал медичних ферментних препаратів, які характеризуються високою некролітичною дією, та виконують функції препаратів замінювальної терапії, на даний час недостатній.

Крім цього, їх відрізняє швидка інактивація і, внаслідок, слабка дія. Отже, продовжується як пошук ефективних ферментних препаратів, так і розробка їх пролонгированих форм на підставі нових, або недостатньо розглянутих раніше носіїв.

Ряд проведених досліджень вказує на те, що систематичне вивчення впливу властивостей носія та методу іммобілізації на активність ферментів може виявити значні резерви як у підвищенні їх активності, так і в збільшенні ефективності медичного застосування.

Для створення реально працюючого ферментного препарату важливо ураховувати конкретні медичні вимоги, поряд з економічністю методу іммобілізації та його компонентів. Спільним же у всіх випадках залишається необхідність одержання стабільних препаратів.

Все вищевикладене визначає актуальність даної дисертаційної роботи, яка виконана в рамках проекту ДКНТ 1.02.07./122-97 "Створення нових лікарських препаратів на підставі іммобілізованих протеолітичних ферментів" і є частиною досліджень, які виконуються у Фізико-хімічному інституті ім. О.В.Богатського НАН України.

Мета роботи. Метою даної роботи було вивчення методів іммобілізації лужної протеази, β -галактозидази та інших гідролітичних ферментів, розгляд властивостей одержаних препаратів та галузей їх використання.

Наукова новизна. Розроблені способи іммобілізації лужної протеази та інших протеолітичних ферментів на перев'язувальних засобах з використанням гелей полісахаридів та полівінілового спирту. Активність одержаних препаратів склала 92-114% від початкової.

Розглянуто включення лужної протеази у гідрофільні мазеві композиції, головним компонентом яких є поліетиленоксид, зшитий γ -радіацією, при цьому спостерігається підвищення протеолітичної активності до 163-279%.

Розроблені способи закріплення комплексу ферментних препаратів для замінювальної терапії на харчових волокнах із застосуванням поліетиленоксиду та полівінілового спирту з високим зберіганням протеолітичної, амілолітичної, ліполітичної та β -галактозидазної активностей.

Показана можливість включення лужної протеази та β -галактозидази в радіаційно-зшитий полі-N-вінілкапролактан, а також β -галактозидази в ПВК, який стабілізовано сполуками фенольної природи.

На підставі даних ЯМР ^{13}C та ІЧ-спектроскопії доведено, що в останньому випадку комплексоутворення протікає шляхом утворення водневих зв'язків між карбонільною групою капролактама та гідроксильними групами фенолу та білка.

Вивчені властивості іммобілізованих ферментних препаратів: рН- та термооптимум, термо- та рН-стабільність, стабільність при зберіганні та γ -стерилізації, можливість функціонування в реакторі періодичної дії, здатність до спільної іммобілізації з антибіотиками, антисептичними та місцевоанестезуючими препаратами, сечовиною, літичним ферментним комплексом.

Виявлено, що рН-профіль активності лужної протеази, закріпленої на перев'язувальних засобах, ПВК, гідрофільних композиціях, харчових волокнах розширений та зміщений на 1.0-1.5 од. рН в область кислих значень, а для β -галактозидази на 1.0 од. рН в область лужних значень.

Для іммобілізованих препаратів спостерігається розширення термооптимума на 5-10 °С, поряд з підвищенням термостабільності.

Засобами ЯМР ^{13}C та ІЧ-спектроскопії, термогравіметрії, віскозиметрії показано утворення модифікованих форм ферментів.

Практична цінність. Показана ефективність іммобілізованої на перев'язувальних засобах лужної протеази при лікуванні експериментальних опіків у кролів та гнійних ран у щурів, включеної у гідрофільні композиції для лізису опікового струпу рогики, та в поєднанні з ультразвуком при лікуванні кістково-суглобної патології.

На підставі запропонованого методу іммобілізації лужної протеази на перев'язувальних засобах з використанням полівінілового спирту та бури, одержано ефективний ранозагоювальний препарат "Протеїм".

Доведено, що у випадку експериментально викликаного у щурів панкреатиту, комплекс ферментів, закріплений на харчових волокнах, сприяє відновлюванню зниженої ферментативної активності до рівня норми.

На захист виносяться наступні результати дослідження:

- розробка та оптимізація методів іммобілізації лужної протеази, β -галактозидази та інших гідролітичних ферментів на природних та синтетичних полімерних носіях;

- вивчення фізико-хімічних властивостей одержаних іммобілізованих препаратів;
- ефективність використання іммобілізованої лужної протеази при лікуванні експериментальних опіків, гнійних ран, у поєднанні з ультразвуком при лікуванні кістково-суглобної системи, а також відновлювання до рівня норми зниженої ферментативної активності шлунково-кишкового тракту щурів комплексом ферментів, закріплених на харчових волокнах.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались на Всесоюзній конференції "Досягнення біотехнології агропромислового комплексу" (Чернівці, 1991), XV Менделєєвському з'їзді по загальній та прикладній хімії (Мінск, 1993), Міжнародній конференції "Перспективи створення та виробництва лікувальних засобів в Україні" (Одеса, 1993), Міжнародній науково-практичній конференції "Екологія хімічних виробництв" (Сєверодонецьк, 1994)

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей, тези 6 доповідей, одержано 1 позитивне рішення за заявою.

Об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку цитованої літератури. Робота викладена на 172 сторінках, містить 40 таблиць, 40 малюнків. Список цитованої літератури містить 223 найменування.

Основні результати

В роботі були використані: лужна протеаза із *Bacillus subtilis*, для якої характерна висока активність по казеїну, еластину та фібрину, при відсутності впливу на здорову тканину. В мультиензимних композиціях в поєднанні з β -галактозидазою із *Penicillium canescens*, оразою із *Aspergillus oryzae* та солізімом із *Penicillium solutum* вона компенсує дефіцит ферментів в травному тракті.

У зв'язку з цим робота була проведена у 2-х напрямках:

- іммобілізація лужної протеази для розробки ранозагоювальних препаратів;
- іммобілізація лужної протеази в поєднанні з β -галактозидазою для розробки препаратів замінювальної терапії.

Для іммобілізації застосовувались носії, які характеризувалися корисними у вказаних напрямках властивостями:

- природні - харчові волокна з пшеничних висівків, полісахариди: пектин, каррагінан, аубазидан, альгінат натрію;

- синтетичні - полі-N-вінілкапролакам, полівініловий спирт, полістиленгліколі, поліетилен з привитою поліакриловою кислотою, сополімери стиролу та дивінілбензолу.

Результати іммобілізації оцінювались по зв'язуванню білка та зберіганню ферментної активності.

При проведенні іммобілізації були використані різні методи, у тому числі:

1. Зшивка лужної протеази з полівініловим спиртом та полісахаридами тетраборатом натрію, при якій відбувається конденсація гідроксилів полімера та ферменту з борною кислотою.

Хімічна природа цього комплексу доведена фізико-хімічними методами, у тому числі даними ІЧ-спектроскопії. Аналіз ІЧ-спектрів дозволяє на підставі зміщення смуг ПВС та ферменту в зоні більш низьких частот припустити для іммобілізованих препаратів утворення комплексу ПВС-бура-фермент: [3450 (ПВС), 3470 (Ф) → 3390 (ІФ), 1630 (Ф) → 1610 (ІФ), 1450 (ПВС), 1440 (Ф) → 1430 (ІФ), 1390 (ПВС), 1400 (Ф) → 1380 (ІФ), 1115 (Ф) → 1130 (ІФ), 1070 (Ф) → 1055 (ІФ) cm^{-1}

2. Іммобілізація ферментів в радіаційно-шиті полімери: ПВС, ПЕГ, ПВК. Методом віскозиметрії було показано, що для зразків ПЕО та ПВС, які були піддані γ -опромінуванню, спостерігається збільшення характеристичної в'язкості. Підвищення характеристичної в'язкості свідчить про збільшення молекулярної маси полімера внаслідок утворення додаткових зшивок під впливом γ -випромінювання.

3. Закріплення гідролітичних ферментів на харчових волокнах за допомогою радіаційно-шитих полімерів.

4. Ковалентне зв'язування β -галактозидази на полістиленах з привитою поліакриловою кислотою та сополімерах стиролу та дивінілбензолу, за допомогою глутарового альдегіду та карбодімідів.

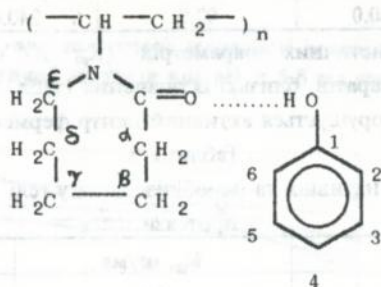
5. Іммобілізація β -галактозидази у ПВК за допомогою фенольних сполук. Для з'ясування характеру взаємодії фермента та фенолу з ПВК була вивчена структура мобельного комплексу, де замість ферменту був використан овальбумін.

При встроюванні овальбуміна в ПВК у спектрі ЯМР ^{13}C найбільш зміщені у сильне поле сигнали карбонільних груп капролактаманного фрагменту, що свідчить про участь карбонільної групи ПВК в утворюванні водневих зв'язків з білковою глобулою. Це підтверджується значним зменшенням фрагментарної рухливості саме карбонільних груп (удвічі).

Таблиця 1

Включення овальбуміна в матрицю ПВК в присутності фенолу
та без нього за даними ЯМР ^{13}C

Вуглець	ПВК		ПВК-овальбумін		ПВК-овальбумін- фенол		ПВК-фенол	
	δ , м.д	NT_1 , с	$\Delta\delta$, м.д	T_1^K/T_1	$\Delta\delta$, м.д	T_1^K/T_1	$\Delta\delta$, м.д	T_1^K/T_1
CO	177.50	3.29	-1.56	0.55	-0.98	0.72	-0.45	1.18
CH	46.09	0.228	-0.18	1.0	-0.43	0.83	0.39	1.11
CH ₂	34.08	0.109	0.92	-	-	-	0.03	-
C ^ε	42.47	0.129	-0.39	0.97	-0.19	0.79	-0.08	1.26
C ^α	37.08	0.126	0.32	0.98	0.37	0.91	-0.13	1.13
C ^γ	22.92	0.153	-0.20	0.88	-0.16	0.88	-0.06	1.05
C ^{β,δ}	29.42	0.154	0.33	0.84	0.63	0.71	-0.31	1.18



При встроюванні овальбуміну в матрицю ПВК, яка містить фенол, сигнали карбонільних груп, які вже були зміщені в сильне поле з-за утворення водневих зв'язків з молекулами фенолу, зазнають додаткове зміщення та займають позицію, близьку до тої, яка спостерігається при відсутності фенолу. При цьому фрагментарна рухливість карбонільних груп зменшується не так значно, як без фенолу.

На підставі проведених досліджень можна прийти до висновку, що макромолекула білка конкурує з фенолом за зв'язування з ПВК, утворюючи водневі зв'язки з карбонільними групами капролактаму.

За даними ГЧ-спектроскопії було показано, що взаємодія фенолу з ПВК супроводжується витісненням молекули води із структури полімера, що характеризується відсутністю смуги поглинання в зоні 3400 см^{-1} , у той час, як у спектрі самого ПВК така смуга чітко виявлена.

Імобілізацію лужної протеази на перев'язувальних засобах із застосуванням гелей полісахаридів та ПВС, зшитого тетраборатом натрію з наступним γ -опромінюванням, одержані іммобілізовані препарати з високим зберіганням (до 137%) активності, стійкі до γ -опромінювання та зберіганням.

Таблиця 2

Включення лужної протеази у полімерні гелі

Носій	До γ -опромінювання		Після γ -опромінювання	
	А, ПО/г	% збер. від теор.	А, ПО/г	% збер. від вих.
Каррагінан	320.0	57.0	440.0	137.5
Аубазидан	276.0	114.0	272.0	98.5
Пектин	345.6	113.0	272.0	78.8
Альгінат кальцію	240.0	102.0	176.0	74.0
ПВС	280.0	92.0	240.0	86.0

Порівняння кінетичних параметрів (K_m и V_{max}) нативного та іммобілізованого препаратів, близькі їх значення (табл. 3) свідчать про те, що при іммобілізації не порушується активний центр ферменту.

Таблиця 3

Кінетичні параметри нативної та іммобілізованої у гелі полісахаридів лужної протеази

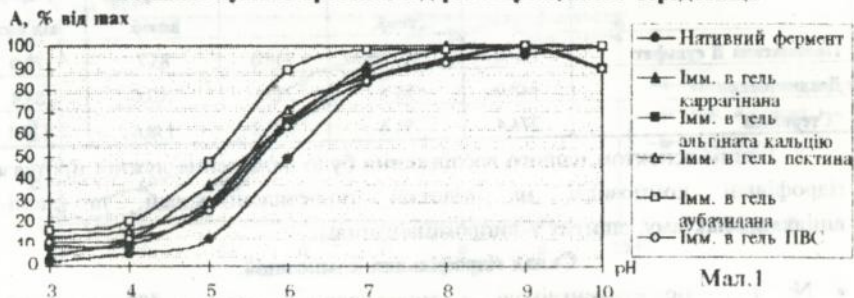
Носій	K_m , мг/мл	V_{max} , ПО/мг
-*	5.9	2.95±0.12
Пектин	9.6	2.08±0.10
Аубазидан	8.9	2.32±0.11
Каррагінан	10.0	2.03±0.13
Альгінат кальцію	8.76	2.41±0.16

*- нативний фермент

Вивчення властивостей одержаних іммобілізованих препаратів показало, що внаслідок іммобілізації спостерігається розширення їх рН-оптимума функціонування, а також зміщення його на 1-2 од. рН в область кислих значень. На одержання більш стабільних препаратів вказує також збільшення зберігання активності іммобілізованої лужної протеази при інкубації її протягом 4-х годин при рН-5.5. Активність лужної протеази, іммобілізованої в гелі ПВС складає - 86%, пектину - 82%, аубазидану - 76%, тоді як для нативного ферменту - 56%.

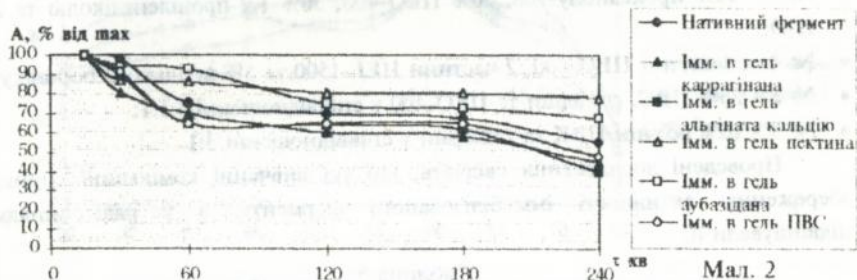
Подібна поведінка іммобілізованої у полімерні гелі лужної протеази в області кислих значень рН свідчить про стабільність її функціонування в умовах гнійної рани (мал.1,2).

Залежність протеолітичної активності іммобілізованої та нативної лужної протеази від рН інкубаційного середовища



Мал. 1

Залежність протеолітичної активності іммобілізованої та нативної лужної протеази при рН = 5.5 від часу інкубації



Мал. 2

На підставі проведених досліджень був запропонований ранозагоювальний препарат "Протеїм", одержаний іммобілізацією лужної протеази на марлі за допомогою ПВС, зшитого тетраборатом натрію.

На даний препарат розроблена ТФС.

Даний метод іммобілізації дозволяє проводити сумісну іммобілізацію лужної протеази з поліміксином, декаметоксином та "Стеридазою" із зберіганням 78.9-127.1% вихідної активності.

Таблиця 4

Імобілізація лужної протеази сумісно з поліміксином, декаметоксином та "Стерилазою"

Антимікробний агент	До γ -опроміювання		Після γ -опроміювання		% збер. від вих.
	А, ПО/г	% збер. від теор.	А, ПО/г	% збер. від імов.	
Поліміксин В сульфат	280.0	92.0	240.0	85.7	78.9
Декаметоксин	248.0	81.6	253.6	102.0	83.4
"Стерилаза"	274.4	91.6	380.8	138.6	127.1

Іншим аспектом нашого дослідження було включення лужної протеази у гідрофільні композиції на підставі поліетиленгліколей та полі-N-вінілкапролактаму, зшитих γ -випромінюванням.

Склад гідрофільних композицій:

- № 1 - поліетиленгліколі з молекулярною масою 400 та 1500 у співвідношенні 4:1;
- № 2 - 40% ПЕГ-1500, 20% ПЕО-400, 30% 1,2 пропіленгліколя та 2% H_2O ;
- № 3 - 18% проксанолу-268, 20% ПЕО-400, 30% 1,2-пропіленгліколю та 2% H_2O ;
- № 4 - 8 частин ПЕО-400, 2 частини ПЕГ-1500 та 5% вугільного порошку;
- № 5 - 25% ПВС, гліцерин та ПЕО-400 у співвідношенні 1:1:1;
- № 6 - 10% розчин ПВК та гліцерин у співвідношенні 3:1.

Проведені дослідження свідчать, що усі вивчені композиції сприяли збереженню активності іммобілізованого ферменту, а у ряді випадків підвищували її.

Таблиця 5.

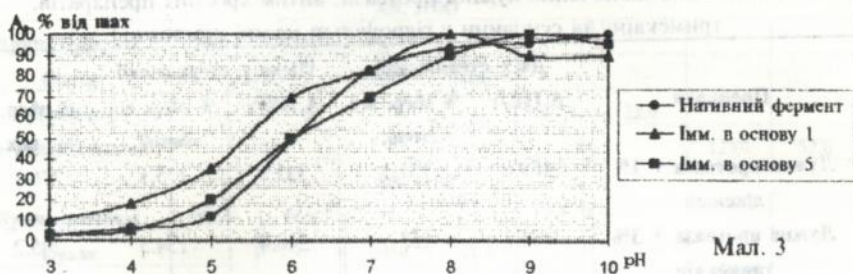
Включення лужної протеази у гідрофільні композиції.

Композиція	До γ -стерилізації		Після γ -стерилізації		% збер. від вих.
	А, ПО/г	% збер. від теор.	А, ПО/г	% збер. від імов.	
1	215.2	179.3	279.2	129.7	232.6
2	229.6	191.3	297.6	129.6	247.9
3	140.0	116.0	317.6	264.5	263.2
4	108.0	254.7	118.4	226.8	279.2
5	156.8	130.5	196.0	125.0	163.1

Внаслідок іммобілізації було визначено підвищення рН- та термостабільності іммобілізованих препаратів, зміщення рН-області

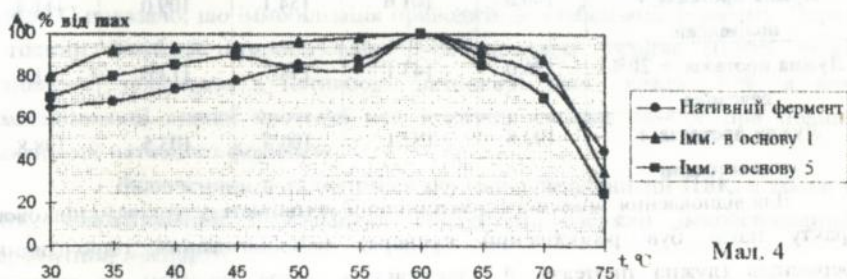
функціонування ферменту з рН - 9.0-10.0 (для нативного) до рН 6.0-7.0 (для іммобілізованого) (мал. 3-5).

Залежність протеолітичної активності лужної протеази, включеної у мазеві основи, від рН інкубаційного середовища



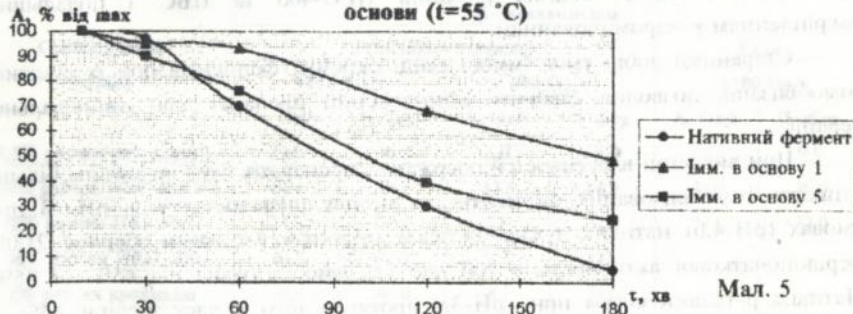
Мал. 3

Залежність протеолітичної активності лужної протеази, включеної у мазеві основи від температури



Мал. 4

Термостабільність лужної протеази, включеної у мазеві основи (t=55 °C)



Мал. 5

У вивчені гідрофільні композиції сумісно з лужною протеазою можливо включати також інші лікарські препарати, які мають антимікробну, дегідратуючу та місцевознеболюючу дію.

Таблиця 6.

Комплексне включення лужної протеази, антимікробних препаратів, тримекаїну та сечовини у гідрофільні мазеві композиції.

Препарат	До γ -стерилізації		Після γ -стерилізації		
	А,ПЕ/г	% збер. від теор.	А,ПЕ/г	% збер. від іммоб.	% збер. від вих.
Лужна протеаза + 1% діоксидін	189.6	157.3	332.8	175.5	276.1
Лужна протеаза + 3% тримекаїн	183.2	152.6	246.4	134.5	205.2
Лужна протеаза + 1% діоксидін + 3% тримекаїн	170.4	141.9	314.4	184.5	261.8
Лужна протеаза + поліміксин	140.6	101.6	154.1	109.0	111.4
Лужна протеаза + 20% сечовина	176.0	143.1	198.7	113.0	161.6
Лужна протеаза + декаметоксин	102.8	192.1	106.4	103.5	198.8

Для відновлення зниженої ферментативної активності шлунково-кишкового тракту нами був розроблений препарат іммобілізованих гідролітичних ферментів (лужна протеаза, β галактозидаза, ораза, солісім) на харчових волокнах із пшеничних висівок. Іммобілізацію здійснювали шляхом просочування ХВ із водних розчинів ПЕО-400 та ПВС з подальшим закріпленням γ -опромінюванням.

Старанний добір умов іммобілізації окремих ферментів при їх сумісній іммобілізації, дозволив створити комплексний препарат для замінювальної терапії.

При вивченні властивостей одержаних препаратів була визначена більша стійкість іммобілізованих ферментів до впливу низьких значень рН. В цих умовах (рН-4.0) нативна лужна протеаза протягом 3-х годин зберігає 21.0% першопочаткової активності, у той час як іммобілізована від 65% до 85%. Нативна β -галактозидаза при рН-3.0 протягом того ж часу зберігає 83%, а іммобілізована 90-100%.

Таблиця 7

Активності іммобілізованих на ХВ ферментів в комплексному препараті

Ферменти	ПА,	% збер.	АА,	% збер.	ЛА,	% збер.	β-гал.,	% збер.
	Од/г	ПА	Од/г	АА	Од/г	ЛА	Од/г	β-гал.
ХВ, ПЕО								
Лужня протеаза	86.4	89.0						
Ораза			2605	88.0				
Солізи					8078	22.0		
β-Галактозидаза							123.0	52.0
ХВ, ПВС								
Лужня протеаза	83.4	86.4						
Ораза			2984	91.3				
Солізи					9116	31.0		
β-Галактозидаза							83.7	47.4

Порівняння термічної інактивациі іммобілізованих та нативних ферментів при 55°C показало, що іммобілізація приводить до стабілізації ферменту. Через 3 години інкубації іммобілізована β-галактозидаза зберігає 80-95% своєї активності, порівняно з нативною, активність якої складає 30%, а для іммобілізованої лужної протеази цей показник складає 38-43% при повній інактивациі нативного ферменту.

Включенням β-галактозидази у радіаційно-зшитий ПВК, а також у ПВК, стабілізований фенольними сполуками, одержан іммобілізований ферментний препарат.

Таблиця 8.

Іммобілізація β-галактозидази у полі-N-вінілкапролактамі

Стабілізуючий розчин	β-галактозидаза					
	<i>Penicillium canescens</i>				<i>E.coli</i>	
	9114 Од/г		600 Од/г		31100 Од/г	
	А, Од/г	% збер.	А, Од/г	% збер.	А, Од/г	% збер.
0.5% розчин резорцину*	32.6	30.0	5.0	16.0	13.3	9.0
10% розчин ПЕГ 40000	44.4	80.0	13.8	44.0	34.0	36.0
10% розчин ПЕГ 6000	23.6	50.0	7.0	42.0	33.6	33.0
40% розчин ПЕО-400	30.2	103.0	7.7	22.8	-	-
1% розчин крохмалю	16.8	46.0	8.7	28.0	-	-
ПВК (γ-овром.)	17.2	32.9	-	-	-	-

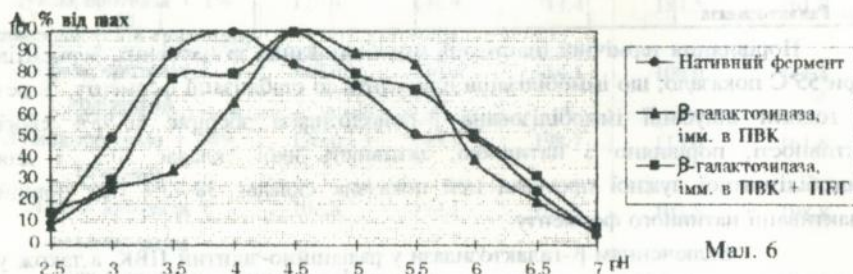
*у всіх останніх випадках використовували 0.5% розчин резорцину, виготовлений на розчині полімеру (ПЕГ, крохмаль).

При іммобілізації ферменту в нерозчинні гранули ПВК доцільно готувати стабілізаційне середовище на розчині гідрофільних полімерів, що сприяє зберіганню вихідної активності ферменту з 30% до 103%. певним критерієм стабільності та пролонгированої дії одержаного комплексу є десорбція резорцину та β -галактозидази з його структури. При визначенні ступеню їх десорбції було показано що і фермент, і резорцин вимиваються поступово протягом 2-4 годин, що становить для ферменту - 77.2%, а для резорцину - 17%.

Для одержаних препаратів були вивчені їх властивості.

Для препаратів іммобілізованої β -галактозидази спостерігається зміщення рН-оптимума активності з рН 4.0 до рН 4.5-5.5 (мал.6).

Залежність активності нативної та іммобілізованої β -галактозидази від рН інкубаційного середовища



Мал. 6

Аналіз термозалежності не виявив помітних відмін у поведінці нативного та іммобілізованого ферментів.

Для іммобілізації β галактозидази нами були використані також сополімери стиролу та дивінілбензолу та поліетилен з привитою поліакриловою кислотою.

Іммобілізація на цих носіях здійснювалась ковалентними методами: на сополімері стиролу та дивінілбензолу за допомогою глутарового альдегіду, а на привитому поліетилени водорозчинним карбодімідом.

В результаті добору умов іммобілізації була показана доцільність проведення іммобілізації ферменту протягом 8-10 годин (для співвідношення фермент:носії 30-50 мг/г, при цьому активність одержаного препарату становить 70% від максимальної).

При іммобілізації β -галактозидази на сополімері стиролу та дивінілбензолу її активність складала 210.5 Од/г носія при 13.5% зберіганні

активності та 16.3% зв'язуванні білка, а при іммобілізації на ПЕ з ПАК активність склала 105.3% при 10.9% зв'язуванні білка.

Таблиця 9.

Іммобілізація β -галактозидази на сополімері стиролу та дивінілбензолу та ПЕ-ПАК

(Співвідношення фермент:носії 50 мг/г)

Носій	Активність, Од/г	% зберігання активності	% зв'язування білка	Субстрат
*	31100			п-НФГ
Сополімер стиролу та дивінілбензолу	210.5	13.5	16.3	п-НФГ
ПЕ-ПАК	105.3	6.8	10.9	п-НФГ
*	6043			лактоза
Сополімер стиролу та дивінілбензолу	30.2	10.0	16.3	лактоза

* - нативний фермент.

Одержані препарати іммобілізованої β -галактозидази успішно функціонували в реакторі періодичної дії при 60-65% конверсії лактози.

Результати медико-біологічних випробувань

Для одержаних препаратів були проведені медико-біологічні випробування.

Лужна протеаза, іммобілізована на перев'язувальних засобах за допомогою ПВС, зшитого тетраборатом натрію, успішно використовувалася при лікуванні експериментальних опіків III-Б ступеню у кролів та гнійних ран у щурів. В останньому випадку строки очищення ран скорочувалися з 12 до 4-х днів.

Таблиця 10.

Результати лікування гнійних ран у щурів протеолітичними ферментами

Препарат	Середні строки (доба)			
	Очищення ран	Поява грануляцій	Початок епітелізації	Загоєння ран
Іммобілізована лужна протеаза	4.0 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	6.0 \pm 0.3	5.5 \pm 0.5
Нативний трипсин	8.2 \pm 1.0	10.0 \pm 1.0	11.2 \pm 0.9	21.0 \pm 1.5
Пов'язки з фізіологічним розчином	12.0 \pm 1.4	18.5 \pm 1.7	20.5 \pm 1.8	29.0 \pm 2.1

Порівняння одержаних результатів з літературними даними, дозволяє прийти до висновку про перспективність використання цього препарату при лікуванні гнійних ран та опіків.

Препарати, одержані при іммобілізації лужної протеази в гідрофільні мазеві композиції на основі поліетиленгліколей, також показали свою перевагу перед нативними ферментами. Дані препарати були використані для гідролізу опікового струпу рогивки при експериментальному опіку ока у кролів. Відрив некротичної тканини наступав через 20-25 хвилин після нанесення препарату, після цього поверхня була готова до пластичного закриття.

Необхідно відмітити позитивні результати, одержані при лікуванні кістково-суглобної патології, які включають остеохондроз грудного та шийного відділів хребта та переломи кісток.

Комплексний поліферментний препарат для замінювальної терапії витримав медико-біологічні випробування в ДНЦІЗ (м. Харків) на моделі гострого холодового панкреатиту. Згідно одержаних даних, препарат відновлює знижені внаслідок патології ферментативні активності до рівня норми.

Таблиця 11

Активність іммобілізованих ферментів у відрізу тонкої кишки щурів

Групи тварин	ЛА, мкмоль олеїнов. к-ти/мл	% від норми	ПА, прот. од/мл	% від норми	β-гал. акт. мкмоль Глю/час	% від норми
Норма	2.71±0.31		0.18±0.024		23.92±1.4	
Патологія	1.08±0.12	39.9	0.11±0.018	61.1	15.35±2.41	64.17
Патологія + іммобіліз. ферменти	2.89±0.34	106.6	0.167±0.013	92.8	23.56±3.61	98.49

Висновки

1. Розроблено метод іммобілізації лужної протеази та інших протеолітичних ферментів на перев'язувальних засобах з використанням гелів полісахаридів та полівінілового спирту зі збереженням для каррагінану - 57%, ПВС - 92%, альгінату Са - 102%, пектину - 113%, аубазидану - 114% першопочаткової активності. Одержані препарати стабільні при γ-стерилізації та зберіганні.

2. Вивчено включення лужної протеази у гідрофільні мазеві композиції, на основі поліетиленоксиду, зшитого γ-радіацією, при цьому спостерігається підвищення її активності до 163:279%.

3. Розроблено спосіб закріплення комплексу ферментних препаратів для замінювальної терапії на харчових волокнах із застосуванням поліетиленоксиду та полівінілового спирту з високим збереженням протеолітичної, амілолітичної, ліполітичної та β -галактозидазної активностей.

4. Показана можливість включення лужної протеази та β -галактозидази в радіаційно-зшитий полі-N-вінілкапролактан з 90+98% збереженням протеолітичної та 45+62% β -галактозидазної активностей, а також β -галактозидази в нерозчинні гранули ПВК, стабілізовані резорцином. Додавання в останньому випадку ПЕГ-40000 дозволяє збільшувати ферментативну активність до 80%.

5. Були вивчені фізико-хімічні властивості усіх одержаних іммобілізованих ферментних препаратів: рН- і термооптими, рН- та термостабільність, в окремих випадках кінетичні параметри. Показано, що рН-оптимум активності лужної протеази, закріпленої на перев'язувальних засобах, ПВК, гідрофільних композиціях, харчових волокнах розширений та оптимум зміщен на 1.0+1.5 одиниці в область кислих значен рН, а для β -галактозидази - на 1.0 одиницю в лужну область. Для іммобілізованих препаратів спостерігається розширення термооптиму на 5-10°C, поряд із збільшенням термостабільності.

6. Показана ефективність іммобілізованої на перев'язувальних засобах лужної протеази при лікуванні експериментальних опіків у кролів та гнійних ран у щурів; включеної у гідрофільні композиції для лізису опікового струту рогівки, а також спільно з ультразвуком при лікуванні кістково-суглобної патології. В результаті проведених досліджень запропонований ефективний ранозагоювальний препарат "Протеїм".

7. Доведено, що у випадку експериментально викликаного у щурів панкреатиту, комплекс ферментів, закріплених на харчових волокнах, сприяє відновленню зниженої ферментативної активності до рівня норми.

Основний зміст дисертації викладено в роботах

1. Кравченко І.А., Давиденко Т.І. Иммобилизованая β -галактозидаза. Деп. 30.09.91. № 3813-В-91. 14 с.
2. Кравченко І.А., Давиденко Т.І., Кириш Ю.Э. и др. Иммобилизация β -галактозидазы в поли-N-винилкапролактан // Доклады АН Украины. - 1993. - № 3. - С. 142-146.
3. Кравченко І.А., Давиденко Т.І. Лечебные пластыри с протеолитическими ферментами // Фармаком. - 1993.- № 10-11. - С. 46-52.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

4. Крусир Г.В., Черно Н.К., Кравченко И.А. Иммуобилизация ферментов заместительной терапией на пищевых волокнах // Доклады АН Украины. - 1994. - № 5. - С.146-149.

5. Крусир Г.В., Кравченко И.А., Черно Н.К. и др. Иммуобилизация ферментов на пищевых волокнах // Прикл. биохим. и микробиол. - 1994. - т. 30, вып. 6. - С. 849-856

6. Давиденко Т.И., Кравченко И.А. Иммуобилизация протеолитических ферментов. Деп. 27.05.94. № 88- хп 94, Черкассы.

7. Давиденко Т.И., Кравченко И.А., Сидорова Т.Г. Способ очищения сточных вод от фенольных соединений. Заявка № 93101186.

8. Кравченко И.А., Давиденко Т.И., Севастьянов О.В. и др. Разработка комплексных методов удаления фенола и его производных // XV Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Минск, 24-29 мая 1993 г., т. 2. - С. 416.

Результаты диссертации опубликованы также как тезисы 5 докладов на научных конференциях.

Кравченко И.А. Иммуобилизация щелочной протеазы и β -галактозидазы на полимерных носителях.

Диссертация - на правах рукописи - на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 01.00.10 - биорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ. Физико-химический институт НАН Украины, Одесса, 1995.

Защищается 6 научных работ, в которых изучены основные закономерности иммуобилизации щелочной протеазы, β -галактозидазы и других гидролитических ферментов на полимерных носителях. Изучены основные физико-химические свойства полученных иммуобилизованных препаратов. Разработан способ закрепления комплекса ферментных препаратов для заместительной терапии на пищевых волокнах; щелочной протеазы на перевязочных средствах, а также путем включения ее в гидрофильные мажевые композиции. Показана возможность включения указанных ферментов в радиационно-сшитый и стабилизированный фенольными соединениями поли-N-винилкапролактан.

Доказана эффективность использования иммуобилизованных ферментов при различных заболеваниях.

Kravchenko I.A. Immobilization of alkaline proteasa and β -galactosidasa on polymer carriers.

Thesis for a master's degree in chemistry specialization 02.00.10 biochemistry, chemistry of naturally and physiologically active substances. Physical-Chemical Institute of NAS Ukraine, Odessa, 1995.

Six scientific papers are presented for defence. They treat the main regularities of immobilization of alkaline proteasa, β -galactosidasa and other hydrolitic ferments on polymer carriers.

A study was made of the main physical-chemical properties of received immobilized preparations.

There was found a method of fixing a complex of ferment preparations on food fibers; of alkaline proteasa on dressing fabric and also by including it into hydrophylic ointment compositions.

There was shown a possibility of including the said ferments into radiation-bound and stabilized by phenol compositions of poly-N-vinilcaprolactam.

Tere was proved the effectiveness of using immobilized ferments for various diseases.

Ключові слова: гідролітичні ферменти, лужна протеаза, β -галактозидаза, полімерні носії, полісахариди, ПЕО, ПВС, ПВК.

Підп. до друку 3.ІІ.95. Формат 60x84/16. ПапІр офсетний. *зак 288*
Друк офсетний. І,ІЗ ум.друк.арк. І,05 обл.-вид. арк. Тираж 100пр.

Одеський державний політехнічний університет.
270044, Одеса, пр. Шевченка, І

