

УДК 577.15:663.15:615.012:504.06

**Т.И. Давиденко, И.И. Романовская, С.А. Андронати**

Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины,  
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина,  
тел.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Анализ методов и носителей для иммобилизации биологически активных веществ, физико-химических свойств, полученных с их использованием препаратов, показали перспективность их применения в ферментативной химии, для получения потенциальных диагностических и лекарственных средств и решения экологических проблем.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: биологически активные вещества, иммобилизация, ферментативный синтез, медицина, экология.*

Инженерная энзимология — классическая область биотехнологии, остается актуальной, поскольку иммобилизованные разными методами биологически активные вещества находят широкое применение в различных областях науки, тонком органическом синтезе, медицине, экологии.

Биотехнологические исследования в ФХИ имени А.В. Богатского НАН Украины проводятся на протяжении 30 лет и осуществляются в трех основных направлениях.

1. Ферментативный синтез БАВ: использование микроорганизмов, клеточных структур, ферментов в свободном и иммобилизованном виде в реакциях нитровосстановления, окисления, ацетилирования и гидролиза азотсодержащих соединений.

2. Медицинская биотехнология: создание потенциальных диагностических и лекарственных средств на основе иммобилизованных белков, ферментов, аллергенов, лекарственных препаратов.

3. Экологическая биотехнология: разработка ферментативных методов удаления фенольных поллютантов.

В результате исследований в области ферментативного синтеза впервые показано, что штаммы и бесклеточные экстракты *E. coli* ВКМБ-471, -870, -835, супернатант 9000 г и микросомы печени крыс селективно и эффективно восстанавливают нитрозамещенные бензойные кислоты, фенолы, бензо-2,1,3-тиадиазолы [6,10], 1,4-бенздиазепин-2-оны, дибензо-[b,f]-1,4-дiazепины [1,5,9], хиноксалиноны, бензофеноны, хинолоны [10] с образованием соответствующих аминопроизводных. Рис. 1 иллюстрирует образование аминопроизводных бензо-2,1,3-тиадиазола и 1,4-бенздиазепин-2-она с высокими выходами (70–90 %) и стереоспецифичностью восстановления нитрогруппы дибенздиазепина и хиноксалинона.

© Т.И. Давиденко, И.И. Романовская, С.А. Андронати, 2009



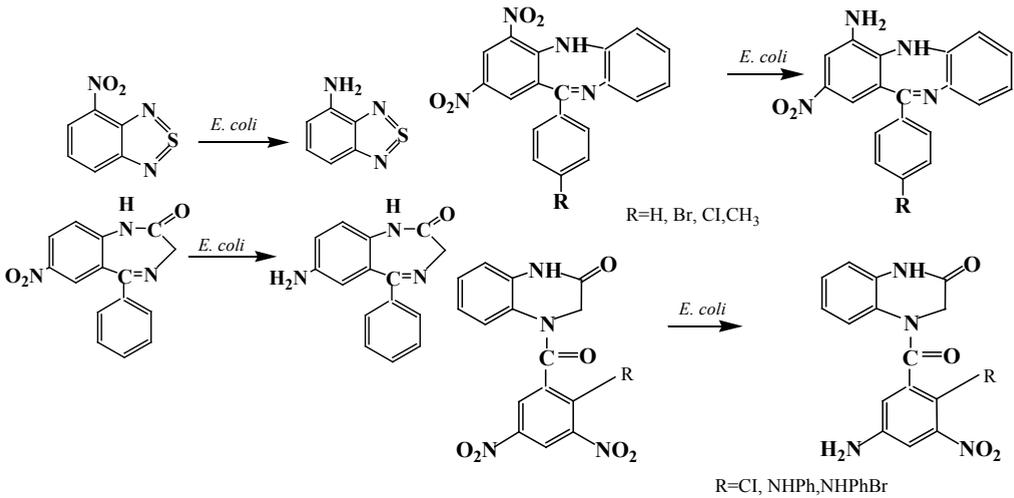


Рис.1. Восстановление нитросоединений клетками *E. coli* (37 °C, pH 7,4–8,5)

Fig.1. Reduction of nitro compounds by *E. coli* cells (37 °C, pH 7,4–8,5)

Установлено, что актиномицеты эффективно катализируют гидроксирование 1,4-бенздиазепин-2-онов с образованием оптически активных изомеров (40–50 %), обладающих более выраженной фармакологической активностью [9] (рис. 2), флуорена и флуоренона [8], а также с высокими выходами, проводят N-ацетилирование аминобензофенонов [3], аспергиллы – катализируют гидролиз 3-ацетокси- и гемисукцината 3-оксипроизводных 1,2-дигидро-3Н, 1,4 бенздиазепин-2-онов с максимальными выходами 3-оксипроизводных – 50 %.

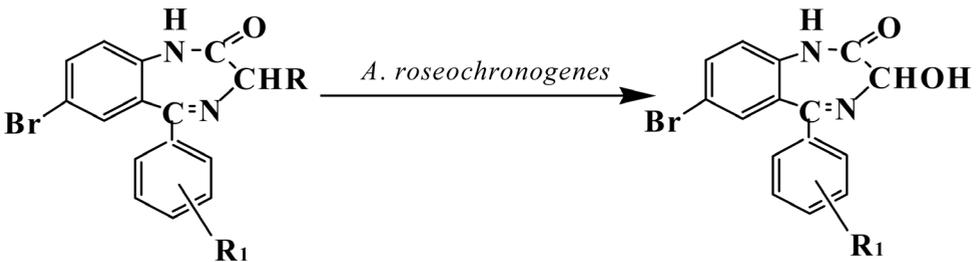


Рис. 2. Микробное гидроксирование 1,4-бенздиазепин-2-онов

Fig.2. Microbial hydroxylation of 1,4-benzodiazepene-2-ones

В неводных средах осуществлен катализируемый липазой *Penicillium solitum* синтез сложных эфиров n-бутилацетата и олеилолеата с высокими выходами и использованием фермента в ходе 3-х каталитических циклов.

В результате иммобилизации в каррагинан были получены активные и стабильные, многократного использования (до 11 раз), биокатализаторы восстановления нитропроизводных бенздиазепинов, бензо-2,1,3-тиадиазолов [7, 23, 25].

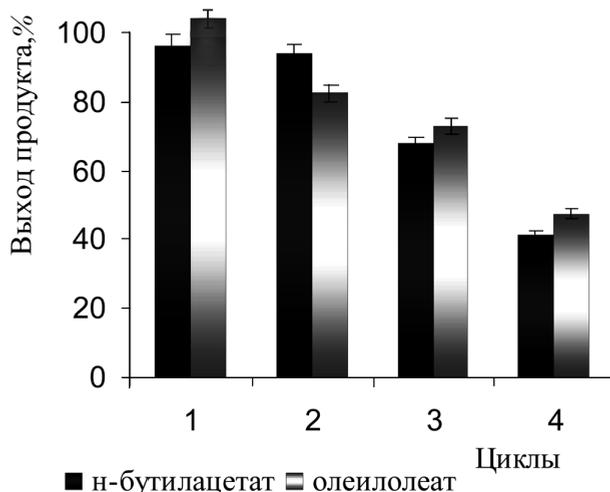


Рис. 3. Циклы использования свободной липазы *P. solitum* в синтезе н-бутилацетата и олеилолеата

Fig. 3. Cycles of free *P. solitum* lipase usage in n-butylacetate and oleoyl oleate synthesis

Иммобилизованная микросомальная фракция печени крыс на полиэтилене с привитыми полиаллиловым спиртом и полиакриловой кислотой, позволили оценить влияние ксенобиотиков на монооксигеназы печени млекопитающих и нарабатывать метаболиты 1,4-бенздиазепин-2-онов [2].

Эффективность энзимотерапии ограничена быстрой инактивацией ферментов, нестабильностью при хранении, стерилизации, автолизом, действием ингибиторов и др.

Фиксация ферментов и др. БАВ на носителе позволяет получать экономичные и стабильные препараты пролонгированного действия и разрабатывать новые пути их введения.

Выбор метода иммобилизации базируется на сведениях о химической структуре фермента или БАВ, физико-химических свойствах матрицы.

Возможно образование как ковалентной связи, так и невалентных взаимодействий между функциональными группами (амино-, карбоксильными, гидроксильными, сульфгидрильными, оксифенильными) боковых цепей аминокислот, стабилизирующих молекулы белка, и молекулами носителя [16].

При создании потенциальных диагностических и лекарственных средств на основе иммобилизованных БАВ особое внимание уделяли: выбору матрицы медицинского назначения, методу иммобилизации, соответствующему применению препарата, исследованию условий иммобилизации (рН, температуры, соотношения реагентов, пористости носителя, содержания реакционноспособных групп и др.), комплексному изучению физико-химических свойств полученных препаратов.

Результаты оценивали по сохранению ферментативной активности, содержанию белка или БАВ в сравнении со свободной формой, во времени, после стерилизации. Детально анализировались рН термозависимости ферментативной активности, кинетические параметры функционирования, термостабильность, устойчивость в кислых и щелочных средах.

Образование модифицированных форм доказано комплексом физико-химических методов (ИК-, УФ-спектроскопия, вискозиметрия, масс-спектрометрия и др.). С использованием гидролитических ферментов различного происхождения разработаны препараты для терапии ран и ожогов, заместительной терапии недостаточности пищеварения.

Для иммобилизации применяли различные носители (гидрофильные полимеры – ПЭГ, ПВК, ПВП, ПВС, ПЭО, перевязочные средства, угольные материалы, пищевые волокна, полисахариды, аэросилы) и физические (адсорбция, включение в гель, импрегнация) методы иммобилизации.

Для закрепления гидролитических ферментов с широкой субстратной специфичностью (на марле, нетканом материале, угольной ткани, при разработке глазных лекарственных пленок (ГЛП), пленочных форм аллергенов белковой природы) использовали перспективный метод модификации полимеров (ПВС, ПЭО) бурой [12-14,16]. Стабилизация и пролонгирование БАВ достигается за счет невалентных взаимодействий с полимером и включения в структуру сшитого полимера.

С использованием  $\beta$ -циклодекстрина, образующего клатраты с различными органическими соединениями, способствующего повышению биодоступности и растворимости БАВ [4], иммобилизовали пихтовое масло [16]. Комплексообразование подтверждено методами термогравиметрии, ИК- и ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектроскопии; определена структура клатрата  $\beta$ -циклодекстрина с основным компонентом пихтового масла – борнилацетатом (рис. 4). Молекула борнилацетата почти полностью погружена во внутреннюю гидрофобную полость  $\beta$ -циклодекстринового конического браслета. Борнеольный фрагмент размещен внутри полости матрицы, ацетильный – выходит из нее и образует водородную связь с одной из семи групп  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

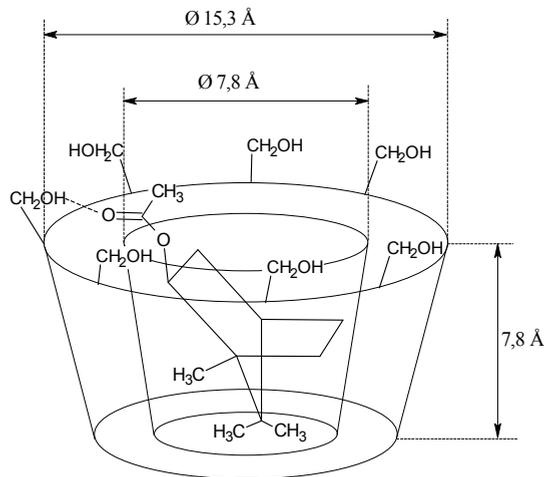


Рис. 4. Модель клатрата борнилацетата с  $\beta$ -циклодекстрином

Fig. 4. The clathrate model of bornyl acetate with  $\beta$ -cyclodextrin

Показана перспективность поли-N-винилкапролактама (ПВК), образующего комплексы включения с фенолами, антимикробными средствами: бронополом (рис. 5) и триклозаном, солями металлов, для иммобилизации БАВ [15–17, 27, 32].

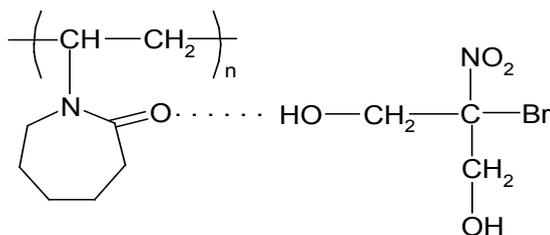


Рис.5. Образование комплекса ПВХ-бронопол

Fig.5. Complex formation of PVC-bromopol

Методами ЯМР  $^{13}\text{C}$ - и ИК-спектроскопии установлено, что комплексообразование осуществляется за счет образования водородной связи между карбонильной группой капролактамных звеньев и гидроксильными группами стабилизаторов (фенольных соединений, бронопола, белков), а также в результате вытеснения воды из структуры полимера и происходящего при этом уплотнения структуры. Макромолекулы белка конкурируют со стабилизатором за связывание с ПВХ, однако молекулы стабилизатора остаются включенными в полимерную матрицу.

Итогом более чем 20-летней работы в области иммобилизации протеолитических ферментов явилось создание противораневых и противоожоговых повязок пролонгированного действия — «Эластотеразы иммобилизованной» (совместно с Институтом микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного и Институтом фармакологии и токсикологии НАН Украины) — препарата, разрешенного к производству и клиническому применению в Украине и России [12, 16]. Препарат представляет собой салфетки из марли или нетканого материала, на которых закреплен фермент эластотераза (щелочная сериновая протеиназа *Bacillus subtilis* 316 М) с активностью 160–240 ПЕ/г. Препарат сохраняет 70–80 % исходной активности, стабилен после  $\gamma$ -стерилизации (20 кГр) и при 2-х летнем хранении, отличается высокой удельной активностью.

На стадии клинической апробации находится эффективный ранозаживляющий препарат «Иммобилизованная на АУВМ щелочная протеаза», отличающийся высокими некролитическими и адсорбционными свойствами, дренирующим эффектом, стабильный в условиях хранения и  $\gamma$ -стерилизации, пролонгированного действия [11]. Эксперименты на лабораторных животных показали его большую активность по сравнению с профезимом, имозимазой, ируксомом. Сроки очищения экспериментальных гнойных ран сокращались с 11 до 3 суток.

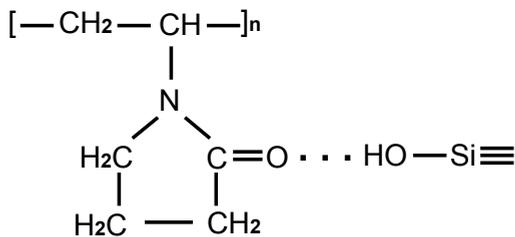
Для лечения ран и ожогов были получены мази, гели, пленки, пластыри с включенными протеолитическими и литическими ферментами, комплексные препараты, содержащие протеиназы и антибактериальные средства (диоксидин, полимиксин, декаметоксин) [13, 16, 38].

Особый интерес представляют полимерные гидрогелевые раневые покрытия пленочного типа [41], которые, в отличие от сорбционных ферментных перевязочных средств (марлевых, нетканых материалов и др.), обладают рядом достоинств: пластичностью, возможностью визуального контроля за состоянием раны, охлаждающим действием. Они лизируют некротические образования, предотвращают развитие инфекции, создают влажную среду, оптимальную для регенерации, способствуют элиминации экссудата, подавлению микрофлоры.



В настоящее время совместно с Московской государственной академией тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова получено гидрогелевое раневое покрытие на основе модифицированного поли-N-винилпирролидона (ПВП)) с иммобилизованной щелочной протеазой (пленки диаметром 9 см, площадью 63,6 см<sup>2</sup>, толщиной 0,35 мм, средней массой 3 г), с количественным сохранением активности, стабильностью при хранении, устойчивостью к действию повышенных температур (k термоинактивации для свободного и иммобилизованного препарата составили  $2,76 \cdot 10^{-2}$  и  $8,42 \cdot 10^{-4}$  мин<sup>-1</sup>, соответственно), пролонгированного действия [37].

Полимерный гидрогелевый материал представляет собой органо-неорганический гибрид (рис.6) — продукт объединения кремнийсодержащего соединения и ПВП в целостную структуру с образованием множественных водородных связей между кислородом карбонильной группы лактамного кольца ПВП и водородом силанольной группы золя поликремниевой кислоты.



**Рис.6. Формирование органо-неорганического гибрида ПВП-поликремниевая кислота**  
**Fig. 6. Formation of PVP/polysilicic acid organo-inorganic hybrid**

При разработке препарата для заместительной терапии недостаточности пищеварения осуществлена иммобилизация липазы *Penicillium solitum* (фермент полностью инактивируется в среде желудочного сока) на углеродном волокнистом материале АУВМ “ДНЕПР-МН” (Институт проблем материаловедения НАН Украины) с помощью ПВС, сшитого бурой.

Выбор носителя обусловлен его широким использованием в аппликационной терапии, энтеросорбции и гемосорбции [19] вследствие высоких адсорбционных характеристик, развитой пористости. Предложенный метод позволяет, при использовании АУВМ с  $V_s$  0,41–1,3 см<sup>3</sup>/г и массовом соотношении фермент:матрица 1:30–1:60 (рис. 7), получать высокоактивные (20–40 ЛЕ/мг) иммобилизованные препараты, стабильные в кислой среде и при длительном хранении, пролонгированного действия [40, 44], с высокими адсорбционными характеристиками. Разработанный препарат «Энсоферм» находится в стадии клинических исследований.

Медико-биологические исследования (НИИ педиатрии, акушерства и гинекологии МЗ Украины) подтвердили высокие адсорбционные свойства препарата, наличие дозозависимого эффекта; нормализацию функций печени при экспериментальном токсическом поражении, хроническом гепатохолецистите. Показана безвредность препарата и отсутствие побочного действия на интегральные показатели организма при хроническом введении.

Показано, что разработанное пленочное покрытие на основе ацетилфталилцеллюлозы для иммобилизованной липазы в два раза увеличивает активность фермента в кислой среде, моделирующей желудочный сок [30].

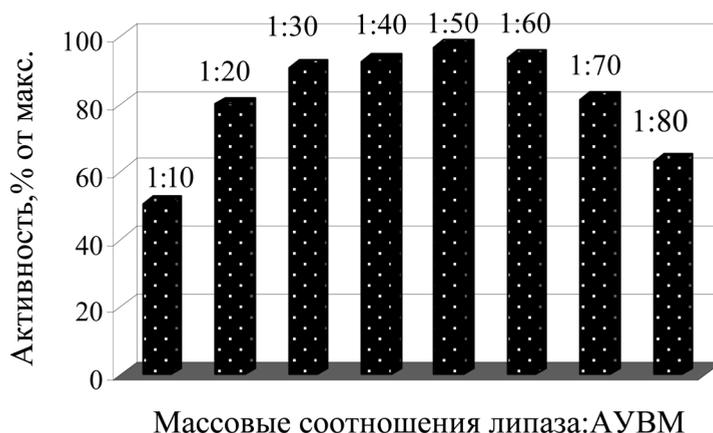


Рис. 7. Влияние массового соотношения фермент: матрица на активность липазы, иммобилизованной на АУВМ с использованием ПВС, сшитого бурой

Fig. 7. Influence of enzyme/matrix mass ratio on lipase activity immobilized on ACFM with using of borax-linked PVA

В качестве основы для ГЛП, содержащих торфот и протеазы, использовали биосовместимые сополимеры акриламида, винилпирролидона и этилакрилата, поливиниловый спирт, сшитый бурой [13,16].

Экспериментальные исследования ГЛП в комплексной терапии ожогов глаз кроликов (Институт глазных болезней и тканевой терапии имени В.П. Филатова АМН Украины) показали, что признаки ожоговой болезни купировались в 1,5 раза быстрее по сравнению с контрольной группой. Иммобилизованный препарат (матрица ПВС) проходит стадию клинической апробации.

Учитывая, что папаин — препарат выбора в офтальмологии, получены его стабильные, иммобилизованные совместно с мочевиной ГЛП (матрица ПВС) [39]. Добавление мочевины (обусловлено ее действием, денатурирующим белковую молекулу) приводит к усилению протеолитической активности в 1,7 раза; введение активаторов (смесь L-цистеина и динатриевой соли ЭДТА), способствует повышению активности свободного и иммобилизованного фермента в 4,3 и 10,6 раз, соответственно. Полученные результаты позволяют значительно уменьшить концентрацию фермента в ГЛП, что экономически выгодно.

На моделях тяжелых щелочных ожогов роговицы глаз кроликов (Институт глазных болезней и тканевой терапии имени В.П.Филатова АМН Украины) показан оптимальный некролитический эффект локального характера без повреждения здоровой ткани после 45 мин действия препарата, что позволяет проводить неотложную кератопластику [45].

При изучении иммобилизации литических ферментных комплексов (ЛФК) *Streptomyces sp.* — стерилазы и лизорицефина, предоставленных НТУУ КПИ, Днепропетровским национальным университетом, препаратов широкого спектра действия, способных лизировать клеточные стенки ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей, — определено, что их совместная иммобилизация с протеазами позволяет увеличить бактериолитическую активность в 1,5–3 раза (рис. 8) [14, 25, 38].

Получены препараты бактериолитического действия, закрепленные на перевязочных средствах, комплексные препараты с бактериолитической и протеолитической активностями, ГЛП. Первичная апробация показала их перспективность при лечении заболеваний ЛОР-органов (мезотимпанитов, эпитимпанитов, отитов грибковой этиологии), в терапии ожогов глаз кроликов [38].

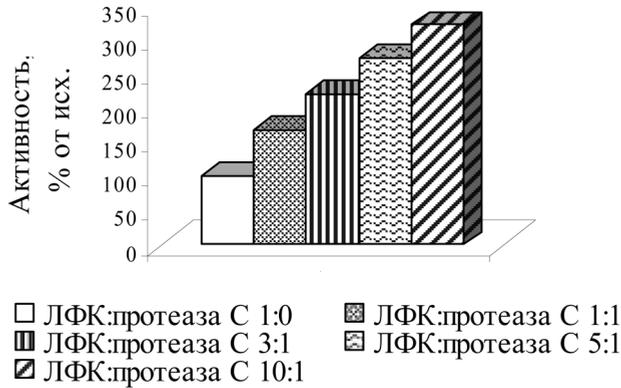


Рис. 8. Совместная иммобилизация лизорицефина и протеазы C

Fig. 8. Joint immobilization of lyzoricefine and protease C

Постоянно возрастающая частота аллергических заболеваний, в т.ч. аллергических ринитов (АР), основные принципы диагностики и терапии, включая СИТ, недостатки парентерального метода введения (введение аллергенов не в «шоковый орган», быстрое всасывание, сложность создания субдозировки, возможность возникновения анафилактических реакций, болезненность процедур для пациента, неэкономичность [22]) — вызвали необходимость разработки их иммобилизованных форм и новых путей введения: перорального и интраназального.

Исследования осуществляются совместно с ООО «Имунолог», Одесским и Винницким государственными медицинскими университетами. В работе использовали коммерческие препараты пищевых (аллерген белка куриного яйца — АБКЯ), бытовых (аллерген домашней пыли — АДП), аллергенов пыльцы березы (АПБ) и ржи (АПР), стандартизованные в ед. РНУ (белковый азот), стабилизированные 0,4 % фенолом, новокаином, ацелизин-КМП, метиленовый синий (МС).

При разработке стабильных форм аллергенов для введения *per os* изучили их фиксацию на природных и синтетических носителях [24, 26, 27, 29]. Отмечены положительные результаты иммобилизации на ПВК и аэросиле А-380: высокая степень связывания, устойчивость при хранении, получение гранул ПВК с аллергенами, стабилизированными менее токсичными, чем фенол, аспирином и резорцином, селективное связывание белка аэросилом А-380, пролонгированность действия при моделировании рН желудка и кишечника.

Разработка иммобилизованных аллергенов для интраназального пути введения проводилась с целью лечения и диагностики АР, диагностики непереносимости новокаина и аспирина, диагностики состояния слизистой оболочки носовой полости с помощью метиленового синего и индикатора для измерения рН носовой слизи.

Учитывая преимущества ПП-полимерных пленок (точность дозировки, пролонгирующее действие, удобство применения), были получены стабильные пленочные

формы (матрица ПВС) АДП, АБКЯ, АПБ в возрастающих дозах [31]. Для диагностики АР разработали ПП с аллергенами в дозе 200 PNU, временем выхода из пленки — 20–25 мин. [20, 31].

Усиление пролонгирования достигается при модификации носителя бурой. Время выхода аллергена из пленки зависит от концентрации модификатора. Образование комплекса белка с носителем и бурой доказано исследованием кинематической вязкости растворов ПВС до и после иммобилизации и подтверждено методом УФ-спектроскопии на модельных аллергенах овальбумине (рис. 9) и лизоциме.

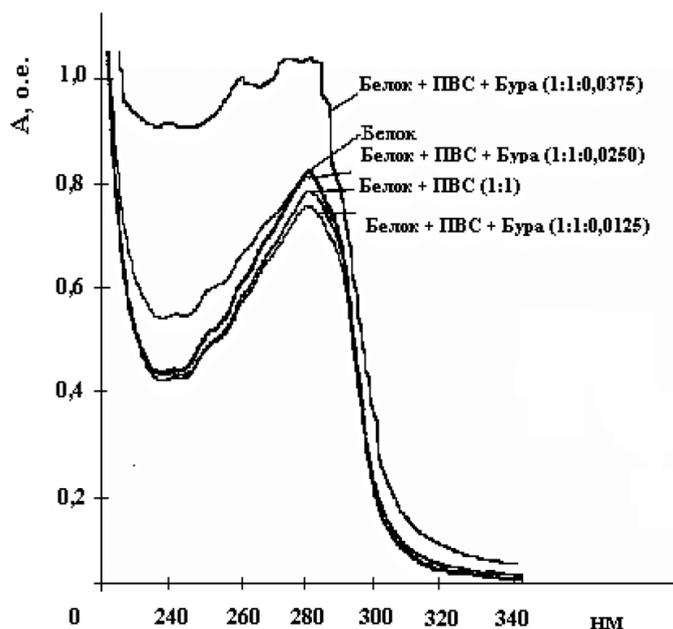


Рис. 9. Образование комплекса ПВС-белок-бура

Fig 9. Complex formation of PVA-protein-borax

Для диагностики непереносимости новокаина и аспирина, функционального состояния слизистой носа разработаны ПП на основе ПВС, желатины, желатинизированной в комбинации с ПВП для интраназального введения с количественным содержанием ЛС. Изучены их свойства, проведена биофармацевтическая оценка [33].

С использованием ПП с аллергенами (матрица ПВС) впервые предложен метод интраназальной диагностики и СИТ аллергических ринитов (АР), апробированный на 35 больных-добровольцах круглогодичным АР (КАР), вызванном АДП. Положительные результаты суммарно составили 88,5 %, отличные и хорошие — 71,4 % (Одесский и Винницкий государственные медицинские университеты) [20–22, 46]. Интраназальная СИТ ПП с пыльцевыми аллергенами проводилась на 40 больных КАР и показала отличные результаты в 72,5 % случаях, положительные — у 20 % пациентов (НИИ оториноларингологии имени А.С. Коломейченко АМН Украины) [46].

Интраназальная провокационная проба ПП с АДП (28 пациентов) показала нарастание симптоматики АР в соответствии с выходом аллергена из пленки у 89,3 % больных КАР. Отмечена достоверность и относительная безвредность метода [22, 46]. С помощью желатиновых ПП с новокаином (50 мкг/ПП) и ацелизином (матрица ПВС, 3 мг аспирина/ПП) были достигнуты высокие результаты в диагностике не-

переносимости этих ЛС больных, сенсibilизированных к новокаину, с аспириновой бронхиальной астмой [28, 33, 48]. На рис. 10 представлены достоверные отличия клинических показателей: местных симптомов и состояния носового дыхания у больных с аспириновой бронхиальной астмой и нечувствительных к аспирину.

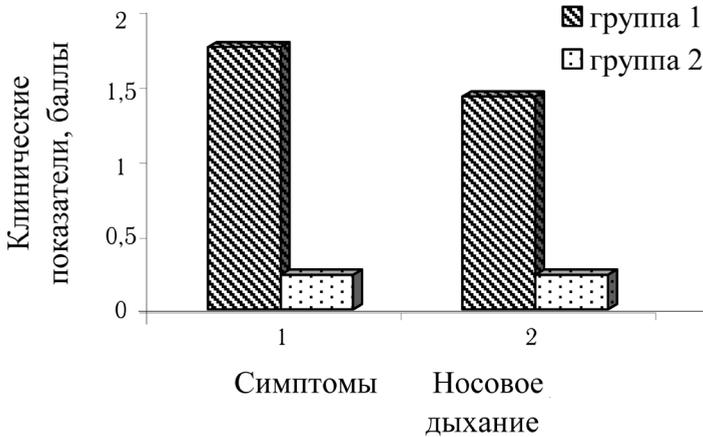


Рис. 10. Сравнительная оценка клинических показателей при проведении назального провокационного теста с помощью ДП с ацелизином  
Группа 1 – пациенты с чувствительностью к аспирину, группа 2 – пациенты, нечувствительные к аспирину

Fig 10. Comparative assessment of clinical indices of diagnostic films with acelysine at nasal provocational test. Group 1 – patients with aspirin sensitivity, group 2 – patients with aspirin insensitivity

Рис. 11 иллюстрирует выход из пленки и продвижение метиленового синего в носовой полости; время продвижения по слизистой оболочке носа позволяет достоверно оценить ее транспортную функцию в норме и при патологии [28, 47].

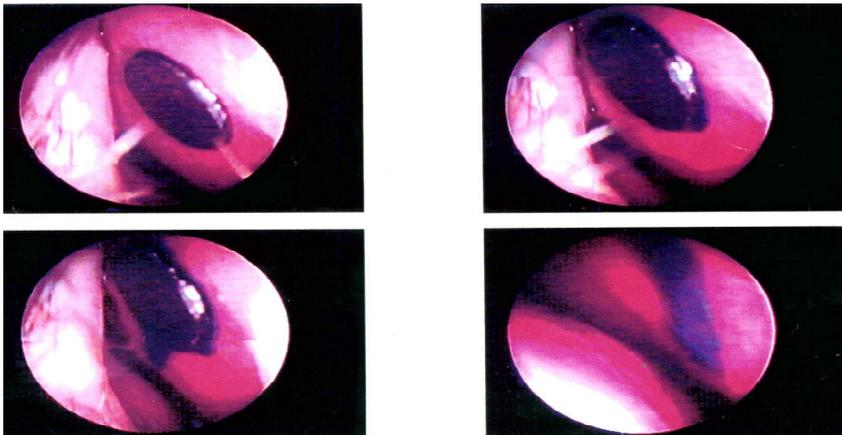


Рис. 11. Исследование функции мерцательного эпителия слизистой оболочки носовой полости с помощью диагностической пленки с метиленовым синим

Fig. 11. Investigation of nasal cavity ciliated epithelium mucuous membrane with methylene blue containing diagnostic film

Особое внимание уделяется проблеме элиминации высокотоксичных поллютантов — фенолов из растворов и сточных вод ферментативными методами. Их преимуществом являются: возможность проведения реакции в широких диапазонах рН и температуры с образованием нетоксичных продуктов. Однако существенными недостатками ферментативного окисления фенолов являются однократность использования и нестабильность фермента, поэтому его стабилизация с возможностью многократного использования путем иммобилизации — актуальная задача.

Активным биокатализатором конверсии фенолов является пероксидаза хрена (ПОХ). Механизм биоконверсии состоит в следующем: ПОХ катализирует процесс окисления фенолов в присутствии  $H_2O_2$  с образованием соответствующих феноксильных радикалов, диффундирующих из активного центра фермента в раствор, которые неферментативно полимеризуются с образованием полиароматических продуктов [42].

Исследованы физико-химические свойства свободного фермента, разработаны условия трансформации фенолов (рН 4,0–7,5, температура 20–45 °С, время инкубации 0,5–1 ч, мольное соотношение субстрат: пероксид водорода 0,1(0,5):1, диапазон концентраций фенолов 0,025–1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>. Активность ПОХ 0,025–1,0 Ед/мг) [43], с высокой степенью их биоконверсии. Определены кинетические параметры ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) реакции. Методами QSAR и QSPR [34, 35] осуществлен анализ реакционной способности фенолов (41 соединение) в реакциях пероксидазного окисления (совместно с лабораторией теоретической химии ФХИ имени А.В. Богатского НАН Украины).

С помощью методов множественной линейной регрессии получены модели, адекватно описывающие реакционную способность замещенных фенолов с использованием электронных параметров молекул, липофильности, рефракции и параметров формы (рис. 12). Подтверждено влияние электронных свойств заместителей в ароматическом кольце фенолов на степень их биоконверсии.

Полученные модели позволяют с достаточной надежностью прогнозировать реакционную способность новых фенольных субстратов ПОХ.



Рис. 12. Вклады структурных дескрипторов в изменение: а)  $K_m^{-1}$ ; б)  $V_{max}$  ( $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_z$  — моменты инерции вдоль координатных осей, Log P — липофильность, DM — дипольный момент, EN — сумма электроотрицательностей атомов,  $q_o$  — заряд на фенольном атоме кислорода,  $\Delta E = E_{HOMO}^2 - E_{LUMO}^3$ )

Fig. 12. Structural descriptors contributions to the change of а)  $K_m^{-1}$ ; б)  $V_{max}$  ( $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_z$  — moments of inertia lengthways the coordinate axes, Log P — lipophilicity, DM — dipole moment, EN — total electronegativity of atoms,  $q_o$  — phenolic oxygene atom partial charge,  $\Delta E = E_{HOMO}^2 - E_{LUMO}^3$ )

Впервые исследованы различные методы иммобилизации пероксидазы (в каррагинан, поли-N-винилкапролактан, на гидратцеллюлозной мембране), свойства иммобилизованных препаратов. Получены стабильные и активные биокатализаторы с возможностью многократного использования (до 22 раз при ковалентном связывании с гидратцеллюлозной мембраной методом периодатного окисления (рис. 13) для элиминации фенольных соединений (25,0–100,0 ммоль/дм<sup>3</sup>) [18, 32, 36].



Рис. 13. Многократное использование ковалентно иммобилизованной на гидратцеллюлозной мембране ПОХ в реакции окисления фенола

Fig 13. Repeated using of HRP covalently immobilized on cellulose hydrate membrane in the reaction of phenol oxidation

Таким образом, изученные методы инженерной энзимологии позволяют получать стабильные высокоактивные препараты БАВ, перспективные для применения в области ферментативной химии, медицины, экологии.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Богатский А.В., Давиденко Т.И., Бондаренко Г.И., Котляр И.И. Ферментативное восстановление нитразепама // Докл. АН УССР. — Сер. биол. — 1979. — № 1. — С. 132-134.
2. Богатский А.В., Давиденко Т.И., Севастьянов О.В. Использование иммобилизованной фракции микросом печени животных для реакций превращения 1,4-бенздиазепин-2-онов // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51, № 4. — С. 382-386.
3. Богатский А.В., Андронати С.А., Давиденко Т.И., Середа Н.П. и др. Ферментативный синтез 2-(ациламино-R-пропиониламидо)-бензофенонов // Докл. АН СССР. — 1980. — Т. 252, № 5. — С. 1129-1132.
4. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. — Одесса: Астропринт, 2004. — 720 с.
5. Давиденко Т.И., Котляр И.И., Бондаренко Г.И., Богатский А.В. Ферментативное восстановление нитразепама и 2,4-динитро-5Н-11-п-R-фенилбензо- (b,f)-1,4-бензодиазепинов при поражении крыс циррозом // Докл. АН УССР. — Серия. биол. — 1981. — № 8. — С. 58-61.
6. Давиденко Т.И., Котляр И.И., Беленькая И.А., Андронати С.А. Микробиологическое восстановление нитропроизводных бензо-2,1,3-тиадиазола // Хим.-фарм. журн. — 1984. — Т. 18, № 4. — С. 467-470.



7. Давиденко Т.И., Котляр И.И., Бондаренко Г.И. и др. Восстановление нитропроизводных 1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-онов иммобилизованными клетками *E. coli* // Хим.-фарм. журн. — 1984. — Т. 18., № 9. — С. 1105-1110.
8. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В. Ферментативное гидроксирование флуорена // Хим.-фарм. журн. — 1984. — № 7. — С. 66-68.
9. Давиденко Т.И., Заболотская Н.И., Мищенко Н.П., Андронати С.А., Кузнецов В.Д. Гидроксирование 1,4-бензодиазепин-2-онов актиномицетами // Докл. АН СССР. — 1984. — Т. 278, № 4. — С. 878-880.
10. Давиденко Т.И., Бондаренко Г.И. Региоспецифичное нитровосстановление клетками *E. coli* // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1988. — № 5. — С. 71-75.
11. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Сергеев В.П. и др. Иммобилизация протеолитических ферментов на угольной ткани АУВМ «Днепр» // Хим.-фарм. журн. — 1992. — Т. 26, № 6. — С. 40-42.
12. Давиденко Т.И., Чуенко А.В., Захарова И.Я. и др. Иммобилизованная эластотераза // Хим.-фарм. журн. — 1997. — Т. 31, № 8. — С. 7-9.
13. Давиденко Т.И., Бондаренко Г.И., Сотникова Е.П. и др. Совместная иммобилизация террилитина и торфота // Хим.-фарм. журн. — 1998. — Т. 32, № 3. — С. 54-56.
14. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Чуманова М.А. и др. Литическая активность иммобилизованной стерилизы // Хим.-фарм. журн. — 2001. — Т. 35, № 10. — С. 14-17.
15. Давиденко Т.И., Пашкин И.И., Шапиро Ю.Е. и др. Стабилизация поли-N-винилкапролактама // Доп. НАН України. — 2002. — № 12. — С. 108-113.
16. Давиденко Т.И. Иммобилизация ферментных препаратов // Вісник ОНУ, Серія хім. — 2003. — Т. 8, № 4. — С. 135-147.
17. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Осейчук О.В., Декина С.С. Структура и образование комплексов включения фенолов в поли-N-винилкапролактама // Доповіді НАН України. — 2005. — № 9. — С. 145-150.
18. Декина С.С., Осейчук О.В., Романовская И.И. Иммобилизация пероксидазы в каррагинане из *Rhyllophora nervosa* // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2005. — Т. 10. — № 9. — С. 120-126.
19. Пимоненко Н.Ю., Сергеев В.П., Соколова Ю.А. и др. IV Республ. конф. «Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия»: Тез. докл. — Донецк, 1988. — С. 23-24.
20. Пухлик С.М., Романовская И.И., Давиденко Т.И. Клинико-экспериментальное исследование изготовления и применения иммобилизованных аллергенов в ринологии // Ринология. — 2002. — № 1. — С. 42-44.
21. Пухлик С.М., Дедикова И.В., Романовская И.И. Иммобилизация аллергена на носителе — новая технология для специфической иммунотерапии круглогодичного аллергического ринита // Журн. вушних, носових та горлових хвороб. — 2003. — № 3. — С. 24-25.
22. Пухлик Б.М., Пухлик С.М., Корицкая И.В. и др. Современные взгляды на проблему лечения аллергического ринита // Укр. пульмонолог. журн. — 2004. — № 2. — С. 18-21.
23. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Восстановление нитрозамещенных бензо-2,1,3-тиадиазолов иммобилизованными клетками *E. coli* // Хим.-фарм. журн. — 1989. — Т. 23, № 4. — С. 473-476.
24. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация аллергенов белка куриного яйца и домашней пыли // Доп. НАН України. — 2000. — № 1. — С. 160-164.
25. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация литического ферментного комплекса лизорицефина // Прикл. биохим. и микробиол. — 1999. — № 1. — С. 68-71.
26. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация аллергенов на полимерных носителях // Вісник ОНУ. Серія хім. — 2002. — Т. 6, № 1. — С. 146-151.
27. Романовская И.И., Давиденко Т.И., Арбид А. и др. Включение аллергенов пыльцы ржи и белка куриного яйца в поли-N-винилкапролактама // Фізіологічно — активні речовини. — 2002. — Т. 34, № 2. — С. 87-90.
28. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Диагностические полимерные пленки с новокаином и метиленовым синим // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2004. — Т. 9, № 3. — С. 108-113.
29. Романовская И.И., Давиденко Т.И., Эльсаббаг А. и др. Адсорбция аллергенов пыльцы ржи и белка куриного яйца аэросилом // Хим.-фарм. журн. — 2004. — № 10. — С. 15-17.



30. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Создание кислотоустойчивой формы иммобилизованной на углеродной ткани АУВМ „Днепр-МН” липазы *Penicillium solitum* // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2005. — Т. 10, № 1. — С. 72-79.
31. Романовська І.І., Пухлік С.М., Пухлік Б.М. Іммобілізація алергенів для створення потенційних діагностичних та лікарських засобів інтраназального способу введення // Одеський медичний журн. — 2006. — Т. 94, № 2. — С. 25-29.
32. Романовская И.И., Осейчук О.В., Севастьянов О.В., Давиденко Т.И. Иммобилизация пероксидазы в поли-N-винилкапролактаме // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2005. — Т. 10, № 8 — С. 49-54.
33. Романовська І.І., Пухлік С.М. Полімерні плівки для інтраназальної діагностики непереносимості до аспірину // Досягнення біології та медицини. — 2006. — № 2 (8). — с.16-20.
34. Романовская И.И., Кузьмин В.Е., Осейчук О.В., Муратов Е.Н., Артеменко А.Г., Андронати С.А. GSPR анализ реакционной способности субстратов пероксидазы // Вісник ОНУ.— Серія хім. — 2006.— Т. 11, № 5.— С. 59-77.
35. Романовская И.И., Муратов Е.Н., Кузьмин В.Е., Осейчук О.В., Артеменко А.Г., Андронати С.А. Анализ влияния структуры фенольных соединений на степень их ферментативной конверсии // Доп. НАН України. — 2006. — № 9. — С. 161-166.
36. Романовська І.І., Осійчук О.В. Фізико-хімічні дослідження іммобілізованого на гідратцелюлозній мембрані препарату пероксидази хрону // Медична хімія. — 2006.-№ 6.-С.55-61.
37. Романовська І.І., Декіна С.С. Розробка раневого гідрогелевого покриття з іммобілізованою лужною протеазою *Vacillus subtilis* на основі модифікованого полі-N-вінілпіролідону // Досягнення біології та медицини, 2007. — № 1. — С. 88-91.
38. Романовська І.І., Тагунова І.К., Пухлік С.М., Чаланова Р.І. Іммобілізація літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis var lyticus* // Одеський медичний журнал. — 2007. — Т.99, № 1. — С. 19-23.
39. Романовська І.І., Декіна С.С. Іммобілізація папаїну та сечовини в полівініловий спирт // Медична хімія, 2007 — №1. — С. 35 — 40.
40. Романовская И.И., Бондаренко Г.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация липазы *Penicillium solitum* на углеродном волокнистом материале «ДНЕПР-МН»// Хим.-фарм. журн. — 2008. — Т.42, № 6. — С.49-51.
41. Юданова Т.Н., Решетов И.В. Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Хим.-фарм. журн. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 24-31.
42. Veitch N.C., Smith A.T. Horseradish peroxidase // Adv. Inorg. Chem. — 2001. — Vol. 51. — P. 107-162.
- 43 Т. I. Davidenko, O. V. Oseychuk, O. V. Sevastyanov, I. I. Romanovskaya. Peroxidase oxidation of phenols // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2004. — V. 40, № 6. — P. 542-546.
44. Пат. 7861, Україна, МПК 7 С 12N 11/00 Спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів / Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, Г.І. Бондаренко (Україна ). — Заявка № 20041209892; Заявл. 03.12.2004; Опубл. 15.07.2005. Бюл.№ 7.
45. Пат. № 13238. Україна. МПК А61F 9/007. Композиція інгредієнтів для очної лікарської плівки /І.І. Романовська., С.С. Декіна, Г.І. Бондаренко, Р.І. Чаланова., С.А Якименко, Т.І Давиденко. — № 200509628; Заявл. 13. 10. 2005; Опубл. 15.03.2006. Бюл. № 3.
46. Пат. 4268А Україна, МПК 7 А61В 10/00. Спосіб специфічної імунотерапії алергічних ринітів /Б.М. Пухлік, С.М. Пухлік, Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, Д.І. Заболотний. — № 2000074259; Заявл. 17.07.2000; Опубл. 15.10.2001. Бюл. № 9.
47. Пат. 9349, Україна, МПК 7 А61В 6/02 Композиція інгредієнтів для діагностичних плівок /Романовська І.І., С.М. Пухлік, Т.І. Давиденко, Б.М. Пухлік, — № 200502712; Заявл. 25.03.2005; Опубл. 15.09.2005. Бюл. № 9.
48. Пат. 17899, Україна, МПК 7 А61К 9/56 Спосіб діагностики непереносимості аспірину / І.І. Романовська, С.М. Пухлік, № 200604451; Заявл. 20.04.2006; Опубл. 16.10.2006. Бюл. № 10.

**Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, С.А. Андронаті**

Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України,  
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна,  
тел.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

## **ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

### **Реферат**

Дослідження методів і носіїв для іммобілізації біологічно активних сполук, аналіз фізико-хімічних властивостей отриманих з їх використанням препаратів, показали перспективність застосування розроблених БАР у галузі ферментативної хімії, для отримання потенційних діагностичних і лікарських засобів та вирішення екологічних проблем.

**К л ю ч о в і с л о в а:** біологічно активні сполуки, іммобілізація, ферментативний синтез, медицина, екологія.

**T.I. Davidenko, I.I. Romanovskaya, S.A. Andronati**

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine  
Lustdorfskaya Rd, 86, Odessa, 65080, Ukraine  
тел.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

## **IMMOBILIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

### **Summary**

Investigation of the methods and carriers for immobilization of biologically active compounds, the analysis of physico-chemical features of the preparations obtained with their using have shown the prospects of application of biologically active developed compounds in the field of enzymatic chemistry for creation of potential diagnostic and medical products as well as solution of the environmental problems.

**К e y w o r d s:** biologically active compounds, immobilization, enzymatic synthesis, medicine, ecology.

