

УДК 577.15 (088.8)

І.І. Романовська<sup>1</sup>, А.П. Левицький<sup>2</sup>, С.С. Декіна<sup>1</sup>, А.М. Овсепян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України,  
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080,  
тел.: +38(048)766 20 44, e-mail: romairina@gmail.com

<sup>2</sup>ДУ «Інститут стоматології НАМН України»,  
вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026

## МУКОАДГЕЗИВНИЙ ГЕЛЬ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ЛІЗОЦИМОМ І КВЕРЦЕТИНОМ

**Мета.** Розробити мукоадгезивний гель з сумісно іммобілізованими лізоцимом і кверцетином, дослідити біохімічні, фізико-хімічні і біологічні властивості комплексного препарату. **Методи.** Бактеріологічну активність лізоциму визначали турбідиметрично, використовуючи як субстрат *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698. Вміст білка визначали за Лоурі-Хартрі, кверцетину – із застосуванням хлориду цирконію (IV) спектрофотометрично. Іммобілізацію здійснювали методом включення в гель. Лікувально-профілактичну дію комплексного гелю досліджували на щурах, у яких відтворювали гінгівіт за допомогою індометацину. **Результати.** З використанням натрієвої солі карбоксиметилцелюлози як матриці здійснено сумісну іммобілізацію лізоциму і кверцетину. Показано, що за масових відношень лізоцим: кверцетин: матриця (1: 0,4: 6) спостерігається повне включення лізоциму, кверцетину і збереження бактеріологічної активності ферменту. Отриманий гель має високі мукоадгезивні властивості (сила адгезії 6000 Па), пролонговану дію: час повного виходу ензиму і кверцетину з гелю становили 180 і 75 хв, відповідно. Іммобілізований лізоцим активний в широкому діапазоні значень рН, стабільний в кислому середовищі і при зберіганні. Застосування орального гелю з лізоцимом і кверцетином приводить показники запалення до норми. **Висновки.** Сумісна іммобілізація лізоциму та кверцетину в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози не впливає на біохімічні властивості ферменту. Отриманий мукоадгезивний гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином є препаратом з комплексною біологічною активністю, і чинить антимікробну і протизапальну дії.

*Ключові слова:* лізоцим, кверцетин, сумісна іммобілізація, мукоадгезія, біохімічні і біологічні властивості.

Безсумнівною перевагою сучасних мукоадгезивних лікарських форм – гелів є їх здатність до збільшеного часу контакту зі слизовою оболонкою за рахунок мукоадгезивних полімерів у їх складі; такі лікарські форми (ЛФ) зручні для застосування в стоматології та офтальмології [1, 2]. В даний час, у зв'язку зі зростаючою резистентністю мікроорганізмів до антибіотиків та інших антибактеріальних засобів, увага дослідників приділяється використанню при створенні ЛФ «природних антибіотиків»; в т.ч. бактеріологічного ензиму лізоциму.

© І.І. Романовська, А.П. Левицький, С.С. Декіна, А.М. Овсепян, 2015



Лізоцим (КФ 3.2.1.17) – гідролітичний ензим, що каталізує гідроліз  $\beta$ -1,4-глікозидних зв'язків між залишками N-ацетил-D-глюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти пептидоглікану клітинної стінки бактерій, що призводить до втрати їх життєздатності. Ензим нетоксичний, має також проти-запальну, стимулювальну щодо тромбоцитопоезу дію, впливає на імунореактивність організму. Відомо, що недоліки функціонування біологічно-активних речовин (БАР), а також ензимів (відсутність стабільності, короткий термін зберігання та ін.) можуть бути усунені при їх іммобілізації з використанням різних матриць, у т.ч. мукоадгезивних полімерів, проте кількість досліджень в галузі створення мукоадгезивних форм лізоциму достатньо обмежена. Так, отримані іммобілізовані препарати лізоциму з застосуванням похідних целюлози [3]; хітозану [4], високомолекулярних полімерів, активованих силановими реагентами [5], поліаміду [6], желатинового гідрогелю [7], криогелю полівінілового спирту [8] та ін.

Проте мукоадгезивні і фізико-хімічні властивості іммобілізованих препаратів у даних дослідженнях детально не вивчені. Слід також відмітити можливість посилення позитивних лікувальних властивостей іммобілізованого лізоциму додаванням природнього поліфенолу – кверцетину, що має високу терапевтичну активність, унікальні протизапальну і ін. види активності (капіляропротекторна, протівірусна, антиоксидантна). У зв'язку з вищенаведеним, цілеспрямована розробка мукоадгезивних гелевих форм антибактеріальної і протизапальної дії з використанням природних БАР є актуальною задачею. Перспективними носіями для іммобілізації БАР є похідні карбоксиметилцелюлози, у тому числі її натрієва сіль (Na-КМЦ) внаслідок нетоксичності, добрих гелеутворювальних і мукоадгезивних властивостей, економічності, широкого медичного застосування.

Мета роботи – створення мукоадгезивного гелю з іммобілізованими на основі натрієвої солі карбоксиметилцелюлози лізоцимом і кверцетином, дослідження біохімічних, фізико-хімічних і біологічних властивостей препарату.

### Матеріали і методи

У роботі використовували лізоцим, виділений з яєчного білка (КФ 3.2.1.17) (М.м. 14,4 кДа, 68000 од/мг, «Applichem», Бельгія), клітини *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 («Sigma-Aldrich», Німеччина), натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) (М.м. 125 кДа, FMC Biopolymer, Ірландія), кверцетин (Merck, Німеччина). Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом (субстрат – клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665) [9]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв. Вміст білка контролювали методом Лоурі-Хартрі [10], кверцетину – за допомогою хлориду цирконію [11].

Іммобілізацію лізоциму і кверцетину здійснювали згідно розробленої методики включення в гель Na-КМЦ. До складу гелю додавали спиртову настоянку м'яти перцевої для поліпшення органолептичних властивостей, гліцерин – для підвищення еластичності і полегшення розчинності БАР, хлоргексидину біглюконат, як консервант. Кінцева концентрація лізоциму в гелі становила



0,5 %, кверцетину – 0,2 %, Na-КМЦ – 3 %. Визначення і розрахунок адгезії отриманого гелю проводили згідно методу [12]. Як модель слизової оболонки використовували поверхню тонкого кишківника свині.

Перед експериментом тканину промивали фізіологічним розчином, висікали зразки слизової площею 5 см<sup>2</sup>, однорідні за морфологією. В процесі експерименту слизову тканину додатково зволожували. Мукоадгезивний гель закріплювали на рухомому штоці з товщиною шару 0,3 мм, і з'єднували з слизовою. Фіксували навантаження на шток і час утримування (60 с). Далі під кутом 90 °С здійснювали відрив штоку з закріпленням на ньому гелем. Адгезію розраховували як силу відриву штоку з нанесеним гелем від слизової.

Для вивчення залежності бактеріолітичної активності лізоциму від рН рівні за активністю проби іммобілізованого і вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (рН 3,0–10,0), з наступним визначенням активності. Вплив температури на активність вільного і іммобілізованого ензиму вивчали в діапазоні 20–80 °С (0,1М Na-фосфатний буфер, рН 7,4). Для вивчення динаміки виходу лізоциму та кверцетину до 1 г іммобілізованого препарату додавали 5 см<sup>3</sup> дистильованої води. Через рівні проміжки часу протягом 3 год відбирали по 0,1 см<sup>3</sup> розчину і визначали бактеріолітичну активність лізоциму і кількість кверцетину. Отриманий гель зберігали при температурі +4 °С. Визначали збереження бактеріолітичної активності іммобілізованого лізоциму з інтервалом часу в один місяць протягом одного року.

Лікувально-профілактичну дію комплексного гелю досліджували на щурах, у яких відтворювали гінгівіт за допомогою індометацину [13]. Для цього білим щурам інтрагастрально вводили 10 мг/кг індометацину (виробництво АТ «Софарма», Болгарія). Через 24 години тварин піддавали евтаназії під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) шляхом тотальної кровотечі із серця. Усіх тварин було поділено на 5 груп по 7 голів у кожній: 1-а – контроль, 2–5 групи отримували індометацин, 3-я група за три доби до введення індометацину отримувала аплікації гелю з вмістом лізоциму 5 мг/мл, 4-а група – з вмістом кверцетину 2 мг/мл і 5-а – гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином (5 і 2 мг/мл, відповідно). Аплікації гелями робили щоденно за 30 хвилин до годівлі. В гомогенаті ясен визначали рівень біохімічних маркерів запалення [14]: вміст малонового діальдегіду і активність еластази, активність уреазі (біохімічний маркер мікробного обсіменіння) [15] і активність лізоциму (показник неспецифічного імунітету) [9], а також активність антиоксидантного фермента каталази [14]. За співвідношенням відносних активностей уреазі і лізоциму розраховували ступінь дисбіозу за Левицьким [16], а за співвідношенням активності каталази і вмісту МДА розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс АПІ [14].

Експериментальні дані опрацьовували статистично згідно [17].

### Результати та їх обговорення

Результати досліджень масових відношень лізоцим : кверцетин : матриця (Na-КМЦ) показали, що при таких (1:0,4:6) відношеннях спостерігається повне включення білка лізоциму і збереження його бактеріолітичної активності,



кількісне – кверцетину з утворенням гелю, основні характеристики якого представлені в табл. 1.

Таблиця 1

**Характеристика мукоадгезивного гелю  
з іммобілізованими лізоцимом и кверцетином**

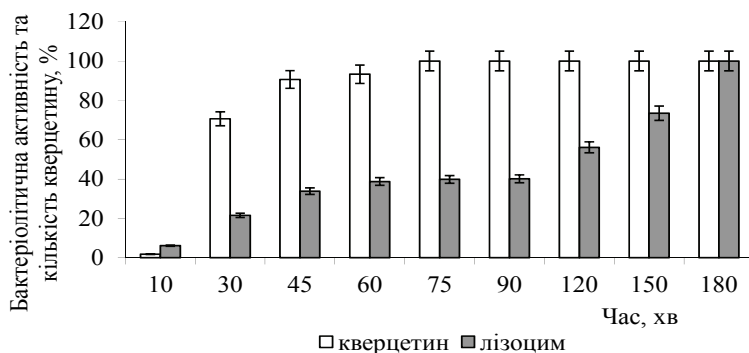
Table 1

**Characteristics of mucoadhesive gel with immobilized lysozyme and quercetin**

Показники	Результати визначення*
Бактеріолітична активність	60100±3000 од/г препарату
Вміст ферменту	5±0,3 мг/г препарату
Вміст кверцетину	2±0,1 мг/г препарату
Вміст води	95±5,6 %
Органолептичні характеристики	однорідний гель жовто-зеленого кольору з м'ятним запахом
pH гелю	6,5±0,3

Примітка: n\* =5

Слід відмітити достатньо сильні мукоадгезивні властивості отриманого препарату, так, сила його адгезії до слизової оболонки дорівнює 6000 Па, тоді як у фармації використовують полімери з мукоадгезією до слизової у діапазоні 2000–9000 Па. Важливою властивістю мукоадгезивних гелів є тривалість дії, що сприяє ефективності їх застосування. Нами показаний пролонгований повний вихід ферменту з іммобілізованого препарату – одержаного гелю – (рис. 1) після 180 хв інкубації в умовах, наближених до фізіологічних (pH 6,2, t = 37 °C), який досягається, ймовірно, за рахунок нековалентних взаємодій ензиму з носієм.



**Рис. 1. Залежність вивільнення лізоциму і кверцетину з гелю від часу інкубації**

Примітка: (pH 6,2; t=37 °C); n=5, P< 0,05–0,01

**Fig. 1. Dependence of lysozyme and quercetin release from the gel on incubation time**

Note: (pH 6,2; t=37 °C); n=5, P< 0,05–0,01



Однак кверцетин вивільняється за більш короткий час (75 хв), можливо за рахунок механічного включення у структуру гелю.

При дослідженні залежності бактеріолітичної активності лізоциму від рН інкубаційного середовища (рис. 2) відзначено розширення рН-профілю іммобілізованого ферменту у бік кислих значень, що пояснюється стабілізуючим впливом матриці – утворенням сприятливого мікрооточення ферменту.

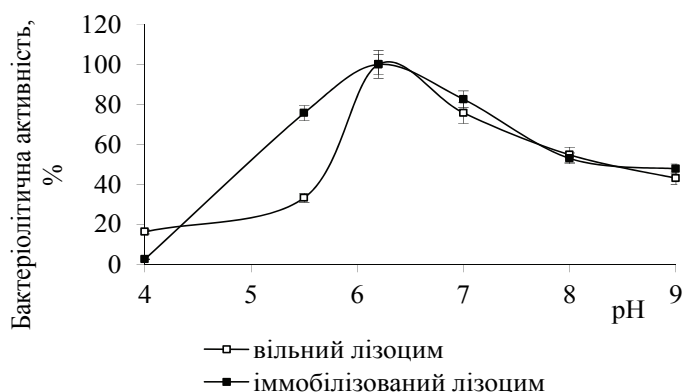


Рис. 2. Залежність бактеріолітичної активності вільного та іммобілізованого лізоциму від рН інкубаційного середовища

Fig. 2. Dependence of bacteriolytic activities of free and immobilized lysozyme on pH of the incubation medium

Вивчення впливу температури на активність іммобілізованого лізоциму (рис. 3) показало звуження термопрофілю активності ферменту в діапазоні 60–80 °С, що може бути пов'язано з конфігураційними змінами білкової молекули під впливом продуктів часткової термодеструкції носія.

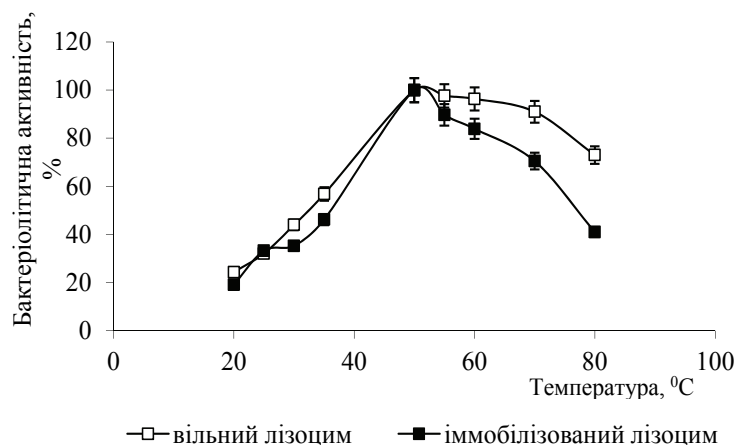


Рис. 3. Залежність бактеріолітичної активності вільного та іммобілізованого лізоциму від температури

Fig. 3. Dependence of bacteriolytic activities of free and immobilized lysozyme on the temperature



Показано, що іммобілізований лізоцим протягом 3 год в умовах слабко-кислого середовища (рН 5,5) практично повністю зберігає бактеріолітичну активність (при 25 °С і 37 °С) (рис. 4), тоді як вільний – лише 25–30 % (рис. 2), що свідчить про стабілізацію ензиму внаслідок іммобілізації.

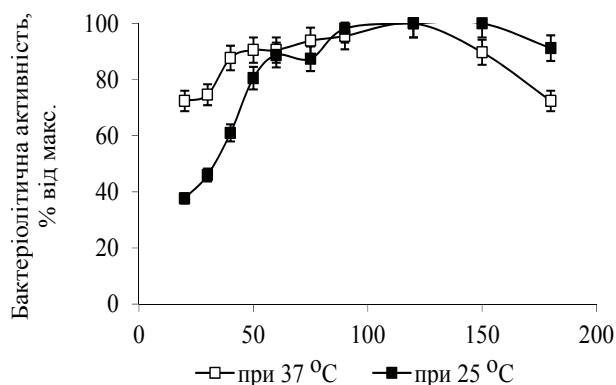


Рис. 4. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації при рН 5,5 та температурі 25 °С і 37 °С

Fig. 4. Dependence of hydrolytic activity of the immobilized lysozyme on incubation time at pH 5.5 and the temperature of 25 °С and 37 °С

В розробленому гелі протягом року повністю зберігалась ферментативна активність лізоциму і вміст кверцетину (табл. 2).

Таблиця 2

Бактеріолітична активність лізоциму та кількість кверцетину в мукоадгезивному гелі протягом його зберігання

Table 2

Bacteriolytic lysozyme activity and the amount of quercetin in mucoadhesive gel during its storage

Час зберігання	Активність лізоциму		Вміст кверцетину	
	од/мг	%	мг/г	%
Після іммобілізації	60010±3005	100,0	2,0±0,1	100,0
1 міс	59800±2990	99,5	1,99±0,1	99,5
2 міс	59680±2984	99,3	1,97±0,1	98,5
3 міс	59680±2984	99,0	1,96±0,04	98,0
4 міс	59680±2984	99,1	1,95±0,05	96,5
10 міс	56855±2842	94,6	1,92±0,11	96,0
12 міс	54871±2742	91,3	1,90±0,1	95,5

Примітка: n =5, P < 0,05



В таблиці 3 представлено результати визначення біохімічних маркерів в яснах щурів за умов експериментального гінгівіту та вплив іммобілізованого лізоциму і кверцетину на їх рівень. З цих даних видно, що у щурів з гінгівітом достовірно зростає рівень МДА, еластази і уреази, однак знижується рівень лізоциму і каталази. Застосування гелю *per os* з лізоцимом і кверцетином нормалізує вищезазначені показники.

Таблиця 3

**Вплив аплікацій гелю з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином на біохімічні показники ясен щурів з гінгівітом ( $M \pm m$ , в усіх групах  $n=7$ )**

Table 3

**Effect of gel application with immobilized lysozyme and quercetin on biochemical indices of rats' gums with gingivitis ( $M \pm m$ , in all groups  $n=7$ )**

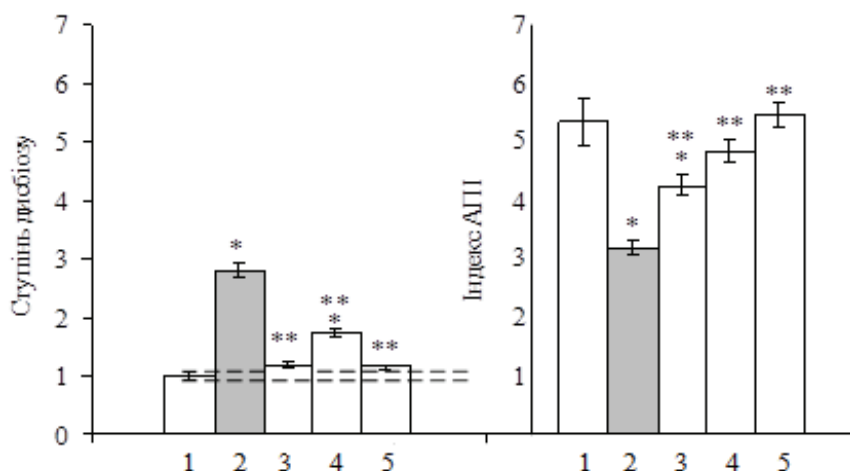
№ № пп	Групи	МДА, мкмоль/кг	Еластаза, мккат/кг	Уреаза, мккат/кг	Лізоцим, од/кг	Каталаза, мкат/кг
1	Контроль	10,8±0,3	40,0±2,0	2,03±0,31	364±67	5,75±0,28
2	Гінгівіт	15,5±0,8 $p < 0,01$	54,2±5,1 $p < 0,05$	3,83±0,25 $p < 0,01$	220±31 $p < 0,05$	4,87±0,19 $p < 0,01$
3	Гінгівіт + лізоцим 5 мг/мл	12,1±0,6 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$	41,0±4,0 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$	2,28±0,46 $p > 0,3$ $p_1 < 0,05$	312±52 $p > 0,3$ $p_1 > 0,05$	5,14±0,26 $p > 0,05$ $p_1 > 0,3$
4	Гінгівіт + кверцетин 2 мг/мл	11,5±0,6 $p > 0,1$ $p_1 < 0,01$	47,6±3,9 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	2,91±0,30 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$	279±38 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	5,49±0,27 $p > 0,3$ $p_1 > 0,05$
5	Гінгівіт + лізоцим (5 мг/мл) + кверцетин (2 мг/мл)	10,1±0,5 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$	40,8±4,0 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$	2,12±0,32 $p > 0,5$ $p_1 < 0,01$	356±52 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$	5,68±0,28 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$

Примітка:  $p$  – по відношенню до гр. 1;  $p_1$  – по відношенню до гр. 2.

На рис. 5 показано дані про ступінь дисбіозу та індексу АПІ в яснах щурів з гінгівітом і дисбіозом. Видно, що при патології в яснах зростає в 2,8 рази ступінь дисбіозу і знижується в 1,7 разів індекс АПІ. Гель з лізоцимом і кверцетином нормалізує обидва показники.

Таким чином, в результаті нековалентної іммобілізації лізоциму і кверцетину в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози отримано гель з високою адгезією до слизових оболонок, пролонгованої дії, стабільний при зберіганні і за умов кислого середовища, що має антимікробну і протизапальну дію і лікувально-профілактичні властивості.





**Рис. 5.** Вплив іммобілізованих лізоциму і кверцетину на ступінь дисбіозу та індекс АПІ в яснах щурів, у яких відтворювали гінгівіт

(1 – контроль, 2 – гінгівіт, 3 – гінгівіт+лізоцим, 5 мг/мл, 4 – гінгівіт+кверцетин, 2 мг/мл, 5 – гінгівіт+лізоцим (5 мг/мл)+кверцетин (2 мг/мл)

\* –  $p < 0,05$  в порівнянні з групою 1; \*\* –  $p < 0,05$  в порівнянні з групою 2

**Fig. 5.** Effect of immobilized lysozyme and quercetin on the degree of dysbiosis and API-index in gums of rats, which mimies gingivitis

(1 – control, 2 – gingivitis, 3 – gingivitis + lysozyme, 5mg / ml, 4 – gingivitis + quercetin, 2 mg / ml, 5 – gingivitis + lysozyme (5 mg / ml) + quercetin (2 mg / ml), \* –  $p < 0.05$  compared with group 1; \*\* –  $p < 0.05$  compared with group 2

**И.И. Романовская<sup>1</sup>, А.П. Левицкий<sup>2</sup>, С.С. Декина<sup>1</sup>, А.М. Овсепян<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины,  
Лютдорфская дор., 86, Одесса, 65080, тел. +38(048)766 20 44,  
e-mail: romairina@gmail.com

<sup>2</sup>ГУ «Институт стоматологии НАМН Украины»,  
ул. Ришельевская, 11, Одесса, 65026

## МУКОАДГЕЗИВНИЙ ГЕЛЬ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ЛІЗОЦИМОМ І КВЕРЦЕТИНОМ

### Реферат

**Цель.** Разработать мукоадезивный гель с совместно иммобилизованными лизоцимом и кверцетином, исследовать биохимические, физико-химические и биологические свойства комплексного препарата. **Методы.** Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрически, используя в качестве субстрата *Micrococcus lysodeikticus* 2665. Содержание белка определяли по Лоури-Хартри, кверцетина с применением хлорида циркония (IV) спектрофотометрически. Иммобилизацию осуществляли методом включения в гель. Лечебно-профилактическое действие комплексного геля исследовали на крысах, у которых воспроизводили гингивит с помощью индометацина. **Результаты.** С использованием натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы в качестве матрицы осуществлена совместная иммобилизация лизоцима и кверцетина методом включения в гель. Показано, что при массовых отношениях лизоцим: кверцетин: матрица





(1:0,4:6) наблюдается полное включение лизоцима и кверцетина, сохранение бактериолитической активности фермента. Полученный гель обладает высокими мукоадгезивными свойствами (сила адгезии 6000 Па), пролонгированным действием: время полного выхода белка энзима и кверцетина из геля составили 180 и 75 мин, соответственно. Иммуобилизованный лизоцим активен в широком диапазоне значений рН, стабилен в кислой среде и при хранении. Применение орального геля с лизоцимом и кверцетином приводит показатели воспаления в норму. **Выводы.** Совместная иммуобилизация лизоцима и кверцетина в натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы не влияет на биохимические свойства фермента. Полученный мукоадгезивный гель с иммуобилизованными лизоцимом и кверцетином является препаратом с комплексной биологической активностью, и оказывает антимикробное и противовоспалительное действие.

*Ключевые слова:* лизоцим, кверцетин, совместная иммуобилизация, мукоадгезия, биохимические и биологические свойства.

I.I. Romanovska<sup>1</sup>, A.P. Levitsky<sup>2</sup>, S.S. Dekina<sup>1</sup>, A.M. Ovsepiyan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine  
86, Lustdorfska dor., Odesa, Ukraine, 65080, tel.:+38 (48) 765 94 31,  
e-mail: romairina@gmail.com  
<sup>2</sup>SI «Institute of stomatology NAMS of Ukraine», Odesa, Ukraine,  
11, st. Rishelyevskaya, Odesa, 65026

## MUCOADHESIVE GEL WITH IMMOBILIZED LYSOZYME AND QUERCETIN

### Summary

**Aim.** To develop mucoadhesive gel with jointly immobilized lysozyme and quercetin and to investigate biochemical, physical, physico-chemical and biological properties of the complex preparation. **Methods.** The bacteriolytic activity of lysozyme was determined turbidimetrically, using *Micrococcus lysodeikticus* 2665 as substrate. Protein content was determined by Lowry-Hartree and that of quercetin – with usage of zirconium (IV) chloride, spectrophotometrically. Immobilization was conducted by gel entrapment method. Therapeutic and preventive action of complex gel was investigated on rats, with gingivitis, which was modelled using indomethacin. **Results.** Using the carboxymethyl cellulose sodium salt as support, the joint immobilization of lysozyme and quercetin was conducted by gel entrapment method. It was shown, that at mass ratio lysozyme: quercetin: matrix (1: 0.4: 6), the complete degree of lysozyme and quercetin inclusion is observed, with preservation of bacteriolytic enzyme activity. The obtained gel possesses high mucoadhesive properties (adhesive force equals 6000 Pa), prolonged action: the time of complete release of enzyme and quercetin was 180 and 75 min, respectively. The immobilized lysozyme is active in the wide range of pH-values, stable in acidic medium and during storage. The usage of oral gel with lysozyme and quercetin leads the indices of inflammation to the norm. **Conclusions.** The joint immobilization of lysozyme and quercetin in sodium carboxymethyl cellulose does not influence the biochemical properties of enzyme. The obtaining mucoadhesive gel with immobilized lysozyme and quercetin is the preparation with complex biological activity, antimicrobial and anti-inflammatory effect.

*Key words:* lysozyme, quercetin, joint immobilization, mucoadhesion, biochemical and biological properties.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lee, J.W., Park Robinson, J. H. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2000, V. 89. – С. 850–866.
2. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор) // *Химико-фармацевтический журнал* – 2009. – Т. 43, № 7. – С. 17–24.
3. Lu Z., Zhang J., Ma Y. Biomimetic mineralization of calcium carbonate/carboxymethylcellulose microspheres for lysozyme immobilization // *Materials Science and Engineering*. – 2012. – V. 32, № 7. – P. 1982–1987.
4. Pirasa A. M., Maisetta G., Sandreschi S. Preparation, physical–chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – V. 67. – P. 124–131.
5. Anirudhan T. S., Rauf T. A. Lysozyme immobilization via adsorption process using sulphonic acid functionalized silane grafted copolymer // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – V. 107. – P. 1–10.
6. Takahashi D., Hamada T., Izumi T. Immobilization of lysozyme on poly (N-isopropyl acrylamide)/2-hydroxyethyl methacrylate copolymer core–shell gel beads // *Polymer Bulletin*. – 2012. – V. 68, № 6. – P. 1777–1788.
7. Kuijpers A. J., Wachemb P. B., Luyn M. J. In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves // *Journal of Controlled Release*. – 2000. – V. 67, № 1–2. – P. 323–336.
8. Декина С.С., Романовская И.И., Овсепян А.М., Молодая А.Л., Паукин И. И. Имобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта // *Biotechnologia Acta* – 2014. – V. 7, № 3. – P. 69–73.
9. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.
10. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Analytical Biochemistry*. – 1972. – V. 48, № 2. – P. 422–427.
11. Ogura H., Shikiba Y., Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids // *J. of Pharmaceutical Sciences* – 1968. – V. 57, № 4. – P. 705–706.
12. Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B. Mucoadhesive drug delivery systems: quantitative assessment of interaction between synthetic and natural polymer films and mucosa // *Pharmaceutical Chemistry Journal* – 2008. – V. 42, № 7. – P. 392–399.
13. Radi Z. A., Khan N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract // *Exper. Toxicol. Pathology*. – 2006. – V. 58, № 1. – P. 163–173.
14. Левицкий А. П., Деньга О. В., Макаренко О. А., Демьяненко С.А., Россаханова Л. Н., Кнава О. Э. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости (методические рекомендации). – Одесса: КП ОГТ, 2010. – 16 с.
15. Левицкий А. П., Макаренко О. А., Селиванская И.А., Россаханова Л.Н., Деньга О.В., Почтарь В.Н., Скидан К.В., Гончарук С. В. Ферментативный



метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков (методические рекомендации). – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 26 с.

16. *Патент* на корисну модель № 43140, Україна, МПК (2009) G01N 33/48 «Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин» / Левицький А. П., Деньга О. В., Селіванська І.О., Макаренко О.А., Дем'яненко С.О., Цісельський Ю. В. Заявка № U200815092 від 26.12.2008. Опубл. 10.08.2009. Бюл. № 15.

17. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Моріон, 2000. – 320 с.

Стаття надійшла до редакції 26.05.15

