УДК 615.355:577.152.34

І.І. Романовська, С.С. Декіна

Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, тел.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: romairina@gmail.com, s.dekina@gmail.com

РОЗРОБКА ТЕКСТИЛЬНОГО РАНОВОГО ПОКРИТТЯ З ПРОТЕАЗОЮ С *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

На основі біогелю з бурих морських водоростей Laminaria japonica Aresch «Ламідан» з іммобілізованою протеазою С, закріпленого на текстильному матеріалі (ефект «подвійного депо»), розроблено ранове покриття з високою протеолітичною активністю (475 од/г ферментного препарату) пролонгованої дії (24 год). Отримання стабілізованої форми ферменту підтверджено дослідженням фізико-хімічних характеристик (pH- і термооптимуму, pH- і термостабільності, в'язкості розчину полімеру з протеазою С). Іммобілізований препарат в умовах ранового вмісту(pH 5,5) на 90% переважає за активністю вільний фермент.

Ключові слова: протеаза С, «Ламідан», «подвійне депо», ранове покриття пролонгованої дії, іммобілізація.

Незважаючи на існуюче різноманіття форм сучасних перев'язувальних матеріалів з протеолітичною активністю (полімерні плівки, аерозолі, гідроколоїди, губки), текстильні покриття залишаються традиційним засобом терапії ран. Переваги їх застосування зумовлені високою сорбційною здатністю, паропроникністю, драпуванням на рані та ін. [2, 4, 6–8, 10]. В даний час перспективне створення на їх основі препаратів з комплексною біологічною активністю, пролонгованої дії, що виключають необхідність частих перев'язок.

Новим перспективним носієм для закріплення (іммобілізації) протеолітичних ферментів на текстильному матеріалі є природний біогель «Ламідан», одержуваний з бурої морської водорості ламінарії японської (*Laminaria japonica Aresch*); його основу на 35% складає альгінат натрію — біодеградуємий полімер, що має гемостатичні, сорбційні властивості [2]. «Ламідан» також містить поліненасичені жирні кислоти, хлорофіл і його похідні, рослинні волокна (8,6%), ряд мікроелементів (кальцій, йод, селен, магній, цинк, мідь) і вітамінів (А, B_{12}, С, Е, D, К), що сприяють прискоренню процесів ранозагоєння.

Метою даного дослідження є створення текстильного ранового покриття пролонгованої протеолітичної дії з використанням біогелю «Ламідан».

© І.І. Романовська, С.С. Декіна, 2011

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували папаїн («Merck», ФРН); трипсин («Merck», ФРН), терилітин (ФС 42-2245-84, Росія); лужну протеазу (ДП «Ензим», Україна), протеазу С *Acremonium chrysogenum*, штам 291-1, (ДП «Ензим», Україна); гель «Ламідан» з *Laminaria japonica Aresch* (ТУ У 15.2-34396838-001:2006).

Протеолітичну активність визначали згідно [5] з використанням стандартного низькомолекулярного субстрату для протеаз — N-α-бензоїл-D,L-аргінін-*n*-нітроанілід гідрохлориду. За одиницю протеолітичної активності приймали таку кількість ферменту, що за 1 хв при 37 °С сприяє утворенню 1 мкмоль *n*-нітроаніліну. Вміст білка визначали методом Лоурі-Хартрі [9]. Дослідження білково-фракційного складу протеази С та протеолітичної активності (за бензоїл-DL-аргінін-нафтиламідом) проводили методом електрофорезу в 10% ПААГ згідно [3], з використанням наступних маркерних білків: фосфорилаза В (97 кДа), бичачий сироватковий альбумін (66 кДа), овальбумін (45 кДа), карбоангідраза (30 кДа), інгібітор трипсину з сої (20 кДа), L-лактальбумін (14 кДа). Іммобілізацію здійснювали згідно [11].

Для вивчення залежності протеолітичної активності лужної протеази від pH, рівні за активністю проби іммобілізованого і вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (pH 3,0—12,0), з наступним визначенням активності. Вплив температури на протеолітичну активність вільного і іммобілізованого ферменту вивчали в діапазоні 10—70 °С при pH 7,4. Для вивчення термостабільності рівні за активністю проби термостатували при 60 °С і визначали залишкову активність з інтервалом 10—20 хв. Константи термоінактивації обчислені з використанням кінетичної схеми дисоціативної термоінактивації для іммобілізованого препарату, і за тангенсом кута нахилу прямої графіку залежності натурального логарифму величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії для вільного [1].

Результати дослідження та їх обговорення

Для отримання ранового покриття на текстильній основі з «Ламіданом» та протеолітичними ферментами нами досліджена іммобілізація у «Ламідан» низки протеаз, що застосовуються у рановій та опіковій терапії, масові співвідношення фермент: носій, фізико-хімічні особливості функціонування, можливість довготривалого зберігання протеолітичної активності.

У табл. 1 наведені результати іммобілізації досліджуваних протеаз в біогель «Ламідан». Втрата протеолітичної активності папаїном, трипсином, терилітином, лужною протеазою в ході іммобілізації може бути обумовлена інактивуючою дією носія, внаслідок наявності значної іонної сили гелю. Показано, що зміна масових відношень матриця: фермент у межах 1:0,02 — 1:1 також не призвела до позитивних результатів [11].

Таблиця 1

Активність вільних та іммобілізованих у гель «Ламідан» протеолітичних ферментів

Table 1

Activity of free and immobilized in to «Lamidan»gel proteolytic enzymes

Фермент	Протеолітична активність, од/г	
	до іммобілізації	після іммобілізації
Папаїн	365,2 ± 18,1	0
Трипсин	273,4 ± 12,9	53,3 ± 2,9
Терилітин	34,5 ± 1,8	0
Лужна протеаза	83,7 ± 4,5	0
Протеаза С	494,9 ± 26,7	473,0 ± 24,3

Тому об'єктом для іммобілізації у «Ламідан» була обрана протеаза С, яка відрізнялася кількісним збереженням протеолітичної активності масових відношеннях ламідан : фермент 1: 0,04. Значне зменшення приведеної в'язкості полімеру (альгінату натрію, який є основною складовою біогелю) при додаванні ферменту може свідчити про утворення білкового асоціату альгінат-білок, при цьому відбувається компактизація білкових молекул за рахунок іонних взаємодій (рис. 1).

Рис. 1. Вплив ферменту на реологічні характеристики альгінату натрію

Fig. 1. The effect of enzyme on sodium alginate rheological characteristics

Вивчення фракційно-білкового складу протеази дозволило виявити 13 білкових фракцій в діапазоні молекулярних мас від <10 до 43 кДа: М.м. основних білків: 10–16 кДа (≈ 50%), 19–20 кДа (≈ 20%) і 24–43 кДа (≈ 30%) (рис. 2 а). Показано, що 65% білка препарату має протеолітичну активність (рис. 2 б), найбільш висока активність (43,10%) визначена для фракції № 2.

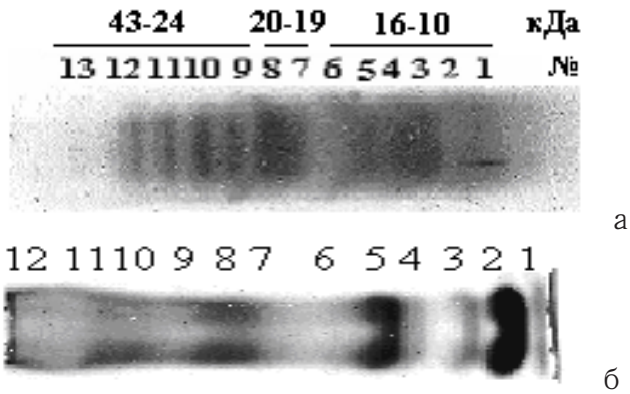

Рис. 2. Електрофореграми препарату протеази С:

а – SDS-електрофорез, б – нативний електрофорез.

Fig. 2. Protease C preparation electrophoregramms:

a — SDS-electrophoresos, b — native electrophoresis

При закріпленні іммобілізованої протеази С на тканинній основі (марлі) отримані текстильні покриття, основні характеристики яких наведені в табл. 2. Відзначено кількісне включення білку і 95% збереження протеолітичної активності (475 од/г).

Таблиця 2

Характеристики текстильного покриття з іммобілізованою протеазою С

Table 2

The characteristics of textile coatings with immobilized protease C

Показники	Одиниці вимірювання	Результати визначення
Протеолітична активність	од/г ферменту	475,0 ± 15,6
Вміст ферменту	мг/г препарату	40 ± 2,7
Площа	$см^2$	36 ± 2,1
Маса	г	0,83 ± 0,05
Розчинність у воді, у фіз. розчині	—	нерозчинні, набрякають
Строк зберігання	рік	1,5

Максимальна активність препарату спостерігається через 4 год і протягом тривалого часу (24 год) вона залишається постійною (рис. 3).

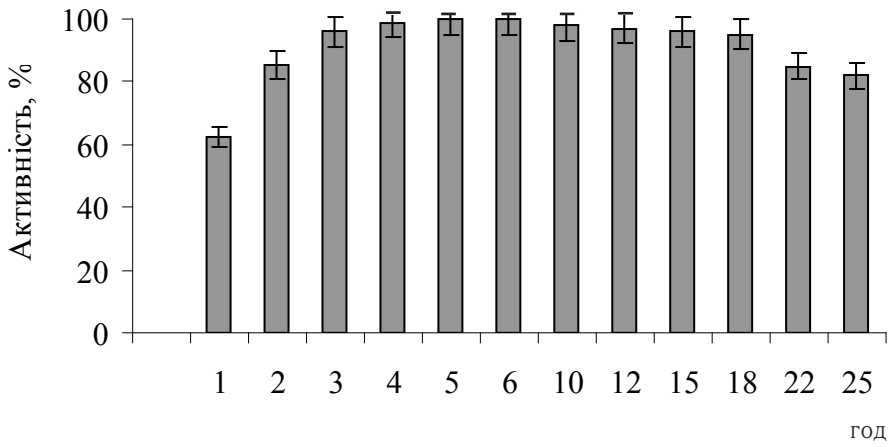

Рис. 3. Залежність протеолітичної активності іммобілізованної протеази С від часу її інкубації у водному розчині (37 °С)

Fig. 3. The dependence of immobilized protease C proteolytic activityon the incubation time in water solution (37 °C)

Пролонгованість протеолітичної дії препарату забезпечується ефектом «подвійного депо» [4], що створюється завдяки включенню ферменту в «Ламідан» з наступним закріпленням на текстильному матеріалі. Отриманий іммобілізований препарат стабільний при зберіганні в умовах низьких температур (0—4 °С) протягом 1,5 років.

При вивченні залежності протеолітичної активності від pH середовища не спостерігалося значних змін pH-профілю іммобілізованого ферменту порівняно з вільним, однак слід зазначити, що при вивченні pH-стабільності при pH 5,5 (37 °С) через 2 години інкубації активність іммобілізованої протеази становила 60%, тоді як вільна в даних умовах не функціонувала (рис. 4). Така поведінка іммобілізованого ферменту пояснюється стабілізуючою дією матриці.

Вивчення температурних залежностей протеолітичної активності протеази С виявило стабілізацію іммобілізованого препарату в умовах високих температур (60—70 °С); порівняння констант термоінактивації вільної та іммобілізованої протеази С показало, що іммобілізований фермент більш стійкий за високих температур, ніж його вільна форма (0,176 $хв^{-1}$ і 0,209 $хв^{-1}$, відповідно).

Рис. 4. Протеолітична активність вільної і іммобілізованої протеази С в умовах ранового вмісту (pH 5,5)

Fig. 4. Free and immobilized protease C proteolytic activity in wound content (pH 5,5) conditions

В результаті проведеної роботи досліджено вплив біогелю «Ламідан» на збереження активності при іммобілізації протеолітичних ферментів різного походження (папаїн, трипсин, терилітин, лужна протеаза, протеаза С), методом електрофорезу вивчений молекулярно-масовий склад білкових фракцій і активність препарату протеази С, отримані текстильні покриття пролонгованої дії, з підвищеною pH- і термостабільністю, з 95% збереженням протеолітичної активності для потенційного використання у терапії ран і опіків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики — М: Изд-во МГУ,1976. — 321 с.

2. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Андронати С.А. Иммобилизация биологически активных веществ. Обзор // Мікробіол. і біотехнол. — 2009. — Т. 6, № 2. — С. 8–22.

3. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. — М.: Наука, 1976. — 332 с.

4. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Савилова Л.Б. Текстиль и медицина. Перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием // Рос. хим. журн. — 2002. — Т. 46, № 1. — 133–141.

5. Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. — М: ДеЛи принт. — 2003. — 385 с.

6. Романовская И.И., Давиденко Т.И., Декина С.С., Пашкин И.И., Андронати С.А. Иммобилизация биологически активных веществ с целью создания потенциальных диагностических и лекарственных средств // Журн. органіч. та фармацевтич. хімії. — 2009. — Т. 7, № 3 (27). — С. 69—78.

7. Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. — 2005. — Вып. 8. — С. 38—46.

8. Юданова Т.Н., Решетов И.В. Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Хим.-фарм. журн. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 24—31.

9. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48, № 1. — P. 422—427.

10. Seabra J.I., Gil M.H. Cotton gause bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical application // Braz. J. Pharm. Scinces — 2007. — V. 43, № 4. — P. 535—542.

11. Пат. на винахід 83786 Україна, МПК(2006) C12N11/00 Спосіб іммобілізації протеази С / Романовська І.І., Декіна С.С.; заявник та власник патенту Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України. — № а 2007 13084; заявл. 26.11.07; опубл. 11.08.08, Бюл. № 15.

УДК 615.355:577.152.34

И.И. Романовская, С.С. Декина

Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина,
тел.: +38 (048) 765 94 31, e-mail: irinaroma@gmail.com, s.dekina@gmail.com

РАЗРАБОТКА ТЕКСТИЛЬНОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ С ПРОТЕАЗОЙ С *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

Реферат

На основе биогеля из бурых морских водорослей *Laminaria japonica Aresch* «Ламидан» с иммобилизованной протеазой С, закрепленного на текстильном материале (эффект «двойного депо»), разработано раневое покрытие с высокой протеолитической активностью (475 ед/г) пролон-

гированного действия (24 ч). Получение стабилизированной формы фермента подтверждено исследованием физико-химических характеристик (pH- и термооптимума, pH- и термостабильности, вязкости раствора полимера с протеазой С). Иммобилизованный препарат в условиях раневого содержимого (pH 5,5) на 90% превосходит по активности свободный фермент.

Ключевые слова: протеаза С, «Ламидан», «двойное депо», раневое покрытие пролонгированного действия, иммобилизация.

UDC 615.355:577.152.34

I.I. Romanovska, S.S. Dekina

A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute, NASU, 86, Lyustdorfska road,
Odesa, 65080, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: irinaroma@gmail.com, s.dekina@gmail.com

THE DEVELOPMENT OF TEXTILE WOUND COATING WITH *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* PROTEASE C

Summary

Basing on the brown marine algae *Laminaria japonica Aresch* «Lamidan» biogel with immobilized protease C, fixed on the textile material («double depot» effect), the wound coating with high proteolytic activity (475 U/g), prolonged action (24 h) was developed. Obtaining of enzyme stabilized form was confirmed by investigation of physico-chemical features (pH- and thermooptima, pH- and thermostability, viscosity of polymer solution with protease C). The immobilized preparation in conditions of wound content (pH 5,5) on 90% surpasses in activity free enzyme.

Key words: protease C, «Lamidan», «double depot», the wound coatings of prolonged action, immobilization.