

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ПРОТЕАЗИ С У БІОГЕЛЬ ЛАМІДАН

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

Традиційним текстильним матеріалам належить вагоме місце серед медичних перев'язувальних засобів. Ефективність їх застосування зумовлена такими властивостями, як висока сорбційна здатність, еластичність, драпованість, повітропроникність, легкість та ін. Основні зусилля дослідників сьогодні зосереджені на проблемі надання перев'язувальним засобам додаткових лікувальних властивостей шляхом введення в текстильний матеріал необхідних препаратів. При цьому важливо, щоб уведений препарат здійснював довготривалу дію, що забезпечить пролонгований ефект, усуне необхідність частих перев'язок, не порушуватиме процесу загоєння рани [1–4].

Одним із найбільш перспективних носіїв для створення таких матеріалів є природний екстракт-біогель — ламідан. Сировиною для нього є бурі морські водорості ламінарії японської (*Laminaria japonica Aresch*), а його основою на 35% є альгінат натрію [5]. Окрім солей альгінової кислоти ламідан містить ліпіди (поліненасичені жирні кислоти), пігменти (хлорофіл і його похідні), золу (22,6%), рослинні волокна (8,6%), а також деякі мікроелементи (кальцій, йод, селен, магній, цинк, мідь) і вітаміни (А, В₁₂, С, Е, D, К).

Підставою для вивчення іммобілізації протеази С у ламідан стала можливість отримання високоефективного матеріалу з властивістю регенерувати травмовані шкірні покриви та прискорювати відновлення тканин. Розробка таких видів лі-

карських форм є актуальною проблемою для різних галузей медицини, таких як травматологія, опікова терапія та ін.

Метою роботи було дослідження методу іммобілізації протеази С у ламідан і фізико-хімічних властивостей отриманого препарату.

Матеріали та методи дослідження

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

Протеолітичну активність визначали згідно [6] з використанням N- α -бензоїл-D,L-аргінін-n-нітроанілід гідрохлориду. За одиницю протеолітичної активності брали таку кількість ферменту, що за 1 хв при 37 °С сприяє утворенню 1 мкмоль n-нітроаніліну. Вміст білка контролювали методом Лоурі — Хартрі [7].

Дослідження білково-фракційного складу протеази С і протеолітичної активності проводили методом електрофорезу в ПААГ згідно з [8].

Іммобілізацію здійснювали, попередньо розчиняючи 40 мг ферментного препарату у 5 см³ натрій-фосфатного буферного розчину (рН 7,4; 0,03 М). Отриманий розчин додавали при постійному перемішуванні до 10 см³ гелю ламідану, після цього однорідну суміш рівно-

мірно розподіляли на тканинному покритті для формування пов'язок, сушили при кімнатній температурі та герметично пакували.

Для вивчення залежності протеолітичної активності лужної протеази від рН, однакові за активністю проби іммобілізованого та вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (рН 4,0–10,0), з подальшим визначенням активності. Вплив температури на протеолітичну активність вільного й іммобілізованого ферменту вивчали в діапазоні від 10 до 70 °С при рН 7,4. Для вивчення термостабільності однакові за активністю проби термостатували при 60 °С і визначали залишкову активність з інтервалом 10–20 хв. Константи швидкості інактивації обчислені з використанням кінетичної схеми дисоціативної термоінактивації для іммобілізованого препарату і за тангенсом кута нахилу прямої графіка залежності натурального логарифма величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії для вільного.

Результати дослідження та їх обговорення

З метою отримання ранового покриття на текстильній основі з ламіданом і протеолітичним ферментом було необхідно вивчити можливість іммобілізації кількох протеаз, що з успіхом застосовуються у рановій та опіковій терапії в медицині, масові співвідношення фермент : носій, фізико-хімічні особливості функціонування отриманих препаратів, а також

Таблиця 1

Визначення протеолітичної активності протеаз,
імобілізованих у ламідан

Фермент	Протеолітична активність, ПО/г		Збереження активності, % від початкової
	До імобілізації	Після імобілізації	
Папаїн	365,2	—	0
Трипсин	273,4	53,3	19,5
Терилітин	34,5	—	0
Лужна протеаза	83,7	—	0
Протеаза С	494,9	473,0	95,9

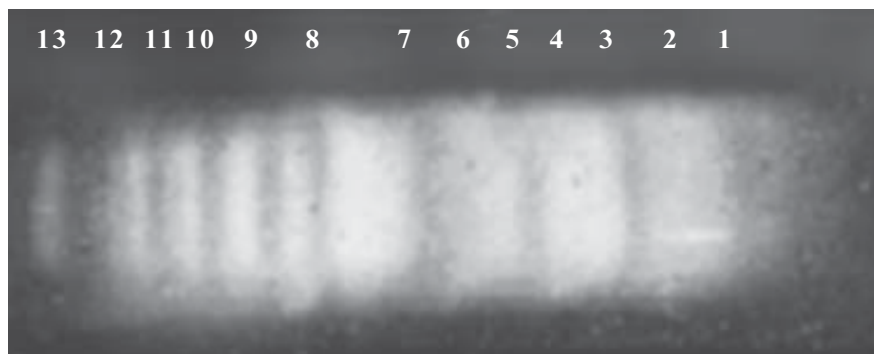


Рис. 1. Електрофореграма препарату протеази С

можливість довготривалого збереження.

У табл. 1 наведені результати імобілізації деяких протеаз у ламідан. Втрата активності чотирьох із них пояснюється високою концентрацією солей у ламідані. Зміна масових співвідношень носій : фермент у межах 1 : 0,02 – 1 : 1 не призвела до позитивних результатів. Виходячи з отриманих даних, об'єктом для імобілізації була обрана протеаза С, яка практично повністю зберігала свою протеолітичну активність при масовому співвідношенні ламідан : фермент 1 : 0,04.

Однак протеаза С являє собою суміш кількох екзопротеїназ, тому цікаво було дослідити білково-фракційний склад даного препарату методом SDS-електрофорезу білків у ПААГ (рис. 1).

У електрофоретичному спектрі ферменту можна виділити три основні зони (табл. 2). Основна кількість матеріалу (49,42 %) зосереджена в більш низькомолекулярній частині спектра протеази з відносною електрофо-

ретичною рухливістю (R_f) у 15 % ПААГ від 0,40 до 0,58. Дана частина спектра виглядає як масивна, розтягнута, інтенсивно забарвлена пляма. Денситометруванням виділені у цій зоні 6 основних фракцій; 28,49 % білків (фракції 1 і 2) цієї зони мають молекулярну масу < 10 кДа. Молекулярна маса білків фракції 3 — (11,5±3,8) кДа (11,4 % у загальному спектрі). Вміст фракції 4 (М. м. 14,00±0,80) становить 9,08 % у загальному спектрі. Молекулярні маси фракцій 5, 6 (М. м. 16,0–14,5) становлять 12,05 %.

Далі середньорухлива частина спектра, в якій ідентифікуються дві смуги зі значеннями R_f у 15 % ПААГ відповідно 0,37; 0,34. Відмічені смуги кількісно близькі одна одній. Питомі частки в спектрі 10,60 і 9,43 %, молекулярні маси білків 18,5; 20,0 кДа відповідно.

У малорухливій частині спектра ферменту ідентифікуються п'ять смуг зі значеннями R_f у 15 % ПААГ відповідно 0,31; 0,28; 0,25; 0,22 і 0,16. Найбільша фракція білка у цій зоні —

№ 10. Кількісно вона становить у загальному спектрі 8,85 % (М. м. 26,3 кДа). Питомі частки та молекулярні маси білків цих фракцій такі: № 9 — 7,48 %, (24,0±7,6) кДа; № 11 — 6,78 %, (30,0±9,1) кДа; № 12 — 6,21 %, (33,5±9,8) кДа; № 13 — 1,27 %, (43,0±9,8) кДа.

Таким чином, у спектрі протеази всього ідентифікуються тринадцять білкових фракцій у діапазоні молекулярних мас від < 10 до 43 кДа. Молекулярні маси основних білків 10–16 кДа (50 %), 18–20 кДа (20 % усіх білків) і 24–43 кДа (30 % білків).

Нативний електрофорез виявив збереження протеолітичної активності як у кислому

Таблиця 2

Білкові фракції препарату
протеази С, виявлені
SDS-електрофорезом

№ фракції	R_f	Молекулярна маса, кДа	Питома частка фракції в спектрі, %
Швидка зона			
1	0,58	Продукти деградації	5,29
2	0,54	<10,0	11,60
3	0,49	11,5	11,40
4	0,46	14,0	9,08
5	0,40	14,5	20,48
6	0,43	16,0	12,05
Всі фракції зони	0,58–0,40	<10,0–16,0	49,42
Середньорухлива зона			
7	0,37	18,5	10,60
8	0,34	20,0	9,43
Всі фракції зони	0,34–0,37	18,0–20,0	20,03
Повільна зона			
9	0,31	24,0	7,48
10	0,28	26,3	8,85
11	0,25	30,0	6,78
12	0,22	33,5	6,21
13	0,16	43,0	1,27
Всі фракції зони	0,16–0,31	24,0–43,0	30,59

Таблиця 3

Характеристики іммобілізованої у ламідан протеази С

Показники	Результати визначення
Протеолітична активність, ПО/г ферменту	475,0±15,6
Вміст ферменту, мг/г препарату	40,0±2,7
Органолептичні характеристики	Однорідні непрозорі еластичні текстильні покриття
Площа, см ²	36,0±2,1
Товщина, мм	3,5±0,3
Маса, г	0,83±0,05
Розчинність у воді, у фізіологічному розчині	Нерозчинні, набрякають

(рН=4,9) середовищі (знайдено 16 білкових фракцій з $R_f=0,09-0,9$, з яких тільки 9 властива протеолітична активність), так і в лужному (рН=8,9) (знайдено 2 білкові фракції з $R_f=0,05-0,33$).

У результаті іммобілізації були отримані текстильні покриття, характеристики яких наведені в табл. 3. При іммобілізації відзначене кількісне включення ферменту і 96%-не збереження протеолітичної активності (475 од/г). Максимум активності ферменту спостерігається через 1 год, і протягом тривалого часу (24 год) вона залишається постійною, ство-

рюючи тим самим пролонговану протеолітичну дію. Отриманий іммобілізований препарат стабільний при зберіганні в умовах низьких температур (0–4 °С) протягом 12 міс.

Реологічні властивості ламідану з іммобілізованою протеазою С вивчали, визначаючи відносну, питому, приведену і кінематичну в'язкість розчинів альгілату натрію (оскільки ламідан на 35 % складається з альгілату) й альгілату з протеазою. В усіх випадках спостерігали значне зменшення в'язкості розчину носія з ферментом, що може свідчити про утворення білкового асоціату по-

лімеру з білком і подальшої компактизації молекул.

При вивченні залежності протеолітичної активності від рН середовища в інтервалі 3,0–12,0 (рис. 2, а) не спостерігалося значного розширення рН-профілю активності іммобілізованого ферменту порівняно з вільним, однак слід зазначити, що при вивченні рН-стабільності при рН 5,5 (37 °С) через 2 год інкубації активність іммобілізованої протеази становила 60 %, тимчасом як вільна не функціонувала в даних умовах. Така поведінка іммобілізованого ферменту пояснюється стабілізувальною дією матриці.

Температурні залежності протеолітичної активності протеази С наведені на рис. 2, б. Порівняння констант термоінактивації вільної та іммобілізованої протеази С, розрахованих за тангенсом кута нахилу прямої графіка залежності натурального логарифма величин залишкової активності препаратів від часу, показало, що іммобілізований фермент більш стійкий при високих температурах, ніж його вільна форма (0,176 хв⁻¹ і 0,209 хв⁻¹ відповідно).

Таким чином, у результаті проведеної роботи досліджено

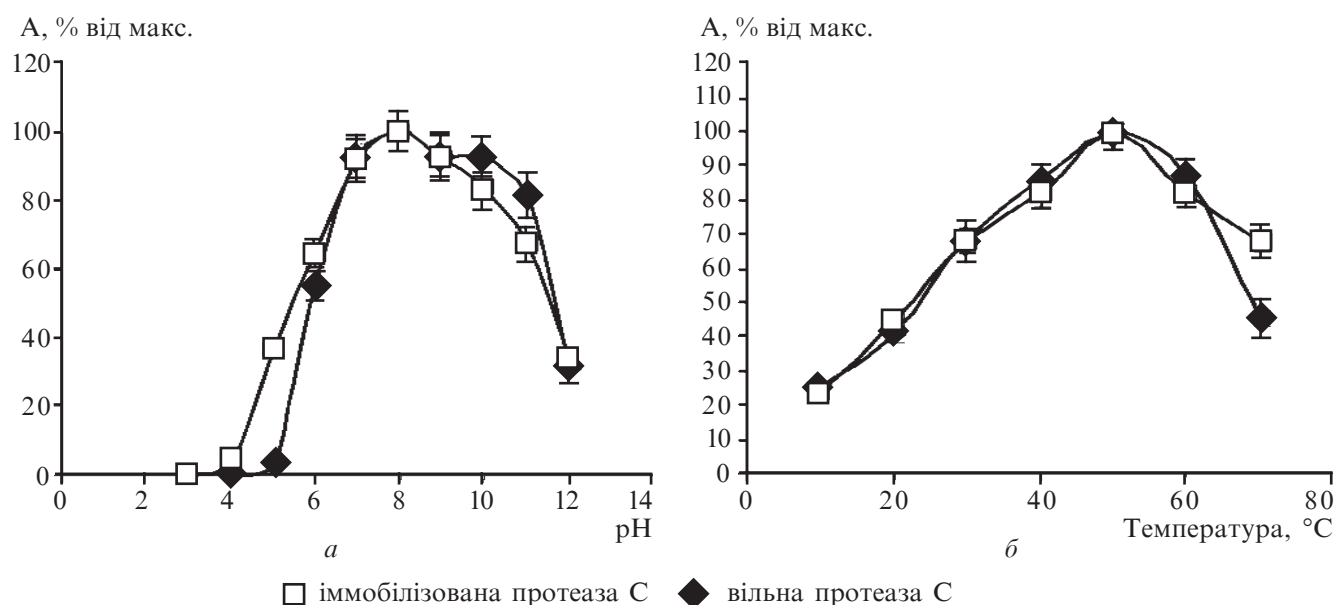


Рис. 2. Залежність активності (А) вільної та іммобілізованої протеази С: а — від рН; б — від температури інкубаційного середовища

вплив препарату ламідан на збереження активності при іммобілізації протеолітичних ферментів різного походження (папаїн, трипсин, терилітин, лужна протеаза, протеаза С), методом електрофорезу вивчено кількісний склад білкових фракцій препарату та визначено їх молекулярні маси; розроблено ефективний спосіб іммобілізації протеази С у біогель ламідан з кількісним включенням ферменту й отримано текстильні покриття пролонгованої дії, рН- та термостабільні з 95%-м збереженням протеолітичної активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Олтаржевская Н. Д.* Текстиль и медицина. Перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием / Н. Д. Олтаржевская, М. А. Коровина, Л. Б. Савилова // Российский химический журнал. — 2002. — Т. 46, № 1. — С. 133-141.
2. *Давиденко Т. И.* Иммобилизация ферментных препаратов / Т. И. Давиденко // Вісник ОНУ. Серія хімія. — 2003. — Т. 8, № 4. — С. 135-147.
3. *Юданова Т. Н.* Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) / Т. Н. Юданова, И. В. Решетов // Хим.-фарм. журнал. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 24-31.
4. *Шаповалов С. Г.* Современные раневые покрытия в комбустиологии / С. Г. Шаповалов // ФАРМиндекс-Практик. — 2005. — Вып. 8. — С. 38-46.

5. *Ермак И. М.* Взаимодействие бактериальных липополисахаридов с белками и полисахаридами. Модификация физиологической активности липополисахаридов: автореф. дис. ... д-ра хим. наук / И. М. Ермак. — Владивосток, 2006.

6. *Полыгалова Г. В.* Определение активности ферментов / Г. В. Полыгалова, В. С. Чердниченко, Л. В. Римарева. — М.: ДеЛи принт, 2003. — 385 с.

7. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // Anal. Biochem. — 1972. — Vol. 48, N 1. — P. 422-427.

8. *Духин С. С.* Электрофорез / С. С. Духин, Б. В. Дерягин. — М.: Наука, 1976. — 332 с.

УДК 615.355:577.152.34

I. I. Романовська, С. С. Декіна, Н. В. Мартинюк

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ПРОТЕАЗИ С У БІОГЕЛЬ ЛАМІДАН

Досліджено вплив препарату ламідан на збереження активності при іммобілізації протеолітичних ферментів різного походження (папаїн, трипсин, терилітин, лужна протеаза, протеаза С). Методами SDS- і нативного електрофорезу вивчено кількісний склад білкових фракцій препарату протеази С, їх молекулярні маси й активність. Розроблено ефективний спосіб іммобілізації протеази С у біогель ламідан із кількісним включенням ферменту й отримано текстильні покриття пролонгованої дії з 95%-м збереженням протеолітичної активності.

Ключові слова: ранові покриття, ламідан, протеаза С, електрофорез, іммобілізація.

UDC 615.355:577.152.34

I. I. Romanovska, S. S. Dekina, N. V. Martynyuk

PROTEASE C IMMOBILIZATION IN BIOGEL LAMIDAN

The influence of Lamidan preparation on activity preservation with proteolytic enzymes of different origin (papain, trypsin, terrilytin, alkalint protease, protease C) immobilization was studied. Using the SDS- and native electrophoresis methods, the quantitative composition of protease C preparation fractions was investigated, their molecular masses and activity were determined. An effective method of protease C immobilization in biogel lamidan was developed, with quantitative entrapment of enzyme; the textile coatings with prolonged action and 95% retaining of proteolytic activity were obtained.

Key words: wound coatings, lamidan, protease C, electrophoresis, immobilization.

*Передплатуйте
і читайте
журнал*



ДОСЯГНЕННЯ БІОЛОГІЇ та МЕДИЦИНИ

У випусках журналу:

Передплата приймається
у будь-якому передплатному
пункті

Передплатний індекс 08205

- ◆ Фундаментальні проблеми медицини та біології
- ◆ Нові медико-біологічні технології
- ◆ Оригінальні дослідження
- ◆ Огляди
- ◆ Інформація, хроніка, ювілеї