

УДК 557.15 + 661.12 + 61

Т.С. Тодосійчук, Л.Г. Жолнер,
Л.М. Шинкаренко, В.О. Касперський**ВПЛИВ НАПОВНЮВАЧІВ ЛІКАРСЬКИХ
ФОРМ НА БАКТЕРІОЛІТИЧНУ АКТИВ-
НІСТЬ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ З
STREPTOMYCES RECIFENSIS V. *LYTICUS*
2435/М**

Streptomyces recifensis v. *lyticus* 2435/М синтезує гідролітичний і бактеріолітичний ферментний комплекс широкого спектра дії [1]. Активність ферментного препарату щодо основних збудників інфекційних захворювань і запальних процесів, а також встановлення його нешкідливості для людини є підставою для використання ферментного препарату в медицині, косметології, хірургії, дезінфікуючих миючих засобах тощо.

Гідролітичний ферментний комплекс містить ферменти, здатні руйнувати клітинні стінки багатьох грампозитивних коків і паличок, грамотрикативних бактерій та дріжджових організмів. Максимальна бактеріолітична дія виявляється по відношенню до мікроорганізмів, що належать до родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Lactobacillus*. У складі ферментного комплексу ідентифіковані специфічні літичні пептидази та протеази, мурамідази і гексозамінідази. Окремі ферменти комплексу проявляють фібринолітичну, колагеназну, еластазну та гіалуронідазну активність. Ці властивості дозволяють застосовувати гідролітичний ферментний комплекс як медичну субстанцію при створенні препаратів поверхневої дії для санації інфікованих ран різного походження, препаратів хірургії та отоларингології, косметичних засобів.

Досвід використання бактерицидних ферментних препаратів у медицині свідчить про необхідність створення різноманітних лікарських форм, зручних для хірургічної практики, отоларингології, опікової терапії та багатьох інших медичних напрямків. Характер ураження визначає застосування тієї чи іншої готової форми препарату – у вигляді порошку, у складі мазі чи іммобілізованому на носіях. Майже всі відомі нині лікарські форми виготовляються з використанням допоміжних речовин (наповнювачів), що мають бути фармакологічно і хімічно індиферентними. Існує

велика кількість допоміжних речовин, які розрізняються за походженням (природні, синтетичні, напівсинтетичні) та за хімічною природою (високомолекулярні, поверхневоактивні) [2,3]. Кожна з них має свої переваги й недоліки залежно від властивостей субстанції, з якою комбінується, та характеристик готової форми препарату. З'ясовано, що наповнювачі можуть значною мірою впливати на фармакологічну активність лікарських препаратів: посилювати або знижувати активність субстанції, змінювати характер дії внаслідок комплексоутворення, молекулярних реакцій тощо [4].

Проаналізувавши різні види допоміжних речовин з точки зору їх фармакологічних та інших властивостей, було вирішено вивчити можливість поєднання ферментного препарату з *S. recifensis* v. *lyticus* 2435/М з мікробними полісахаридами, аеросилом та вінілпіролідом. Вибір таких допоміжних речовин пов'язаний з їх біологічною нешкідливістю, потенційною здатністю стабілізувати і пролонговувати дію субстанції, а також стимулювати захисні сили організму [5,6].

Характеристики вибраних наповнювачів зумовлюють можливість їх застосування для створення готових лікарських форм, що мають властивості, необхідні для препаратів хірургії, відновної терапії тощо. У зв'язку з цим роботу було присвячено вивченню впливу вибраних допоміжних речовин на бактеріолітичну активність субстанції ферментного комплексу з *S. recifensis* v. *lyticus* 2435/М з метою створення лікарських форм медичного призначення.

Матеріали і методи. В дослідженні використано ферментний препарат, синтезований мутантним штамом *S. recifensis* v. *lyticus* 2435/М з бактеріолітичною активністю 120 тис. од/г, який отримано у дослідно-промислових умовах в АТ «Ензим» (м. Ладижин). Бактеріолітична активність ферменту та комплексу фермент-наповнювач визначалась турбідиметричним методом, згідно з яким за одиницю активності прийнято таку кількість ферменту, яка знижує густину суспензії тест-культури на 0,001 оптичної одиниці за 1 хв. Як тест-культури використовувались 24-годинні клітини *Staphylococcus aureus* 209 та *Pseudomonas fluorescens*, вирощені на МПА, що суспендувались у дистильованій воді (рН 7,0) до оптичної густини 0,7–0,8 ОД (при 540 нм, кюветі 0,5 см). Ця густина відповідає концентрації клітин $(3-4) \times 10^9$ кл/мл. Реакційна суміш (4 мл суспензії тест-культури та ферментний препарат в кон-

центрації 0,1 мг/мл суспензії) інкубувалась при 37° С протягом 30–120 хв та за різницею оптичної густини суспензії до і після реакції (по спектрофотометру СФ-26 при довжині хвилі 540 нм) розраховувалась величина бактеріолітичної активності (ЛА) за формулою:

$$ЛА = \frac{(ОДв - С \times ОДк) \times N}{0,001 \times T}, \text{ од/мл,}$$

де ОДв, ОДк – величина вихідної і кінцевої густини суспензії; С – коефіцієнт автолізу; N – розведення ферменту; T – час інкубації, хв; 0,001 – коефіцієнт перерахунку.

Вплив наповнювачів на активність ферменту визначався також за залишковою активністю, порівнюючи відсоток падіння оптичної густини суспензії (або "лізису") тест-культури ферментом та комплексом фермент-наповнювач.

За допоміжні речовини лікарських форм було взято відповідні матеріали.

Мікробні полісахариди – біополімери з молекулярною вагою 6–9 млн, здатні утворювати стабільні гелі, пролонговувати дію фармакологічних субстанцій, стимулювати захисні сили організму. У роботі застосовувались мікробні полісахариди аубазідан, ксантан, поліміксан, отримані в дослідно-промислових умовах в АТ "Ензим".

Аеросил (торгова марка "Сілард") є високодисперсний, з великою питомою поверхнею матеріал та високою адсорбційною здатністю. У воді аеросил у концентрації 1–4% утворює студені і сприяє кращій фіксації на шкірі.

Полівінілпіролідон (ПВП) – полімер N-вінілпіролідону з молекулярною вагою 10 – 100 тис, що розчиняється у воді, спирті, гліцерині; стабілізує емульсії і суспензії.

Композиції фермент-наповнювач готувались шляхом механічного змішування компонентів в сухому вигляді або водному середовищі у певних пропорціях.

Механічна суміш фермент-полісахарид у співвідношенні 1:1, розчинена у дистильованій воді (рН 7,0) до стану рідкого геля (1–3%), досліджувалась на здатність руйнувати клітини тест-культур *S.aureus*, *Ps.fluorescens*. Процес деградації проводився при 37°С, з навантаженням по ферменту 0,1 мг/мл. Ступінь лізису клітин (або зниження оптичної густини) фіксувалась на спектрофотометрі СФ-26. Контролем у досліді був ферментний препарат без наповнювачів.

Оптимальне співвідношення полісахарид-фермент та вплив густини геля на активність фермента визначались при зміні концентрації полісахаридів у межах 2,5–10,0 мг/мл.

Вивчення активності ферменту при витримці з плівкою ПВП проводилось на чашках з добовими тест-культурами, які розсівались газоном на чашки і зверху накладалась аплікація плівки. Культури вирощувались при 37°С протягом 24 годин, і після чого на газон накладалась така ж аплікація і повторно термостатувалась.

Результати експериментів було оброблено математичними методами [7].

Результати та їх обговорення. З метою визначення можливості створення готової лікарської форми ферментного препарату у вигляді аерозоля, геля та желеподібної пасти, які зручно наносити на раневі поверхні та вводити у внутрішні органи (носоглотку, гортань тощо) було використано аубазідан (А), ксантан (К), поліміксан (П), одержані в АТ "Ензим".

Аналіз наведених результатів (табл.1) показує, що використані полісахариди при контакті з ферментом (1:1) на 5–20% знижують його бактеріолітичну активність, про що свідчить рівень деградації клітин.

Таблиця 1. Вплив полісахаридів на процес дезінтеграції клітин ферментом

Склад суміші	Оптична густина суспензії, ОД			
	вихідна	20 хв	40 хв	120 хв
Тест-культура <i>S. aureus</i>				
А + Фермент	0,75	0,40	0,35	0,25
П + Фермент	0,75	0,60	0,45	0,30
К + Фермент	0,75	0,40	0,30	0,18
Фермент	0,75	0,35	0,10	0,08
Тест-культура <i>Ps. fluorescens</i>				
А + Фермент	0,75	0,60	0,45	0,25
П + Фермент	0,75	0,53	0,35	0,15
К + Фермент	0,75	0,55	0,30	0,10
Фермент	0,75	0,20	0,09	0,04

Таке зниження активності може вважатись припустимим для подальшої роботи по створенню лікарської форми. У випадку ж застосування ксантану як наповнювача активність майже не втрачається, а тому він може розглядатися як більш прийнятний для сполучення з даним ферментним комплексом. Для визначення впливу різних концентрацій полі-

сахаридів на активність ферменту при їх тривалому попередньому контакті, приготовлені суміші витримувались протягом 1, 3, 7 діб з наступним визначенням залишкової активності. В результаті експерименту з'ясувалося, що концентрація полісахаридів та попередня витримка з ферментом значно впливають на активність комплексу, а в деяких випадках немає прямої залежності між цими величинами. Аубазідан майже в усіх варіантах помітно знижував активність ферменту, наближаючись до значень контролю лише при 7-добовій попередній витримці у концентрації 10,0 мг/мл. Можливо, в такому разі потрібна більша концентрація полісахариду, а стабілізація активності даної суміші на 7-му добу може свідчити про здатність аубазідану пролонговувати дію препарату. Різниця в дії комплексів фермент-полісахарид щодо використаних тест-культур була незначною і по окремих показниках коливалася в межах 5–10 %. На рис. 1 показано динаміку зміни активності ферменту в сумішах при граничних застосованих концентраціях 2,5 мг/мл (рис. 1а) та 10,0 мг/мл (рис. 1б) щодо *S. aureus*.

Помічено, що при 24-годинній попередній витримці ксантан і поліміксан навіть підвищують активність ферменту, що правда, через 7 діб картина змінюється. Привертає увагу комплекс фермент-ксантан, дія якого у всіх випадках наближається до дії самого ферментного препарату, змінюючись у межах 5–10 %.

З огляду на отримані дані, більшу увагу було приділено визначенню оптимальної концентрації ксантану у гелевій суспензії (табл. 2).

Одержані дані свідчать, що залишкова ак-

Таблиця 2. Вплив концентрації ксантану у комплексі фермент-ксантан та часу його попередньої витримки на активність ферменту (по відношенню до обох тест-культур).

Концентрація ксантану, мг/мл	Залишкова активність (%) при попередній витримці		
	1 доба	3 доби	7 діб
2,5	90,0	80,0	75,0
5,0	100,0	80,0	75,0
7,5	100,0	85,0	80,0
10,0	110,0	80,0	90,0
Контроль	100,0	100,0	100,0

тивність ферменту при контакті з ксантаном досить висока (70–90 %), а в окремих випадках залишається на рівні контролю або перевищує її (1 доба, 10,0 мг/мл). Однак можна виділити варіанти, де суміш проявляє високу активність при 24-годинному контакті і залишається на достатньому рівні через 7 діб. Це гелеві суспензії із вмістом ксантану 7,5 і 10,0 мг/мл. Виходячи з отриманих результатів, можна передбачити, що лікарська форма препарату з таким вмістом наповнювача може бути ефективною як приготовлена екстемпорально (безпосередньо перед нанесенням на рану), так і у складі форми тривалішого зберігання.

Відносна похибка одержаних експериментальних даних не перевищувала 5%.

Наступний етап роботи був присвячений визначенню впливу аеросилу та ПВП на бактеріолітичну активність ферментного препарату.

Водні суспензії фермент-аеросил у спів-

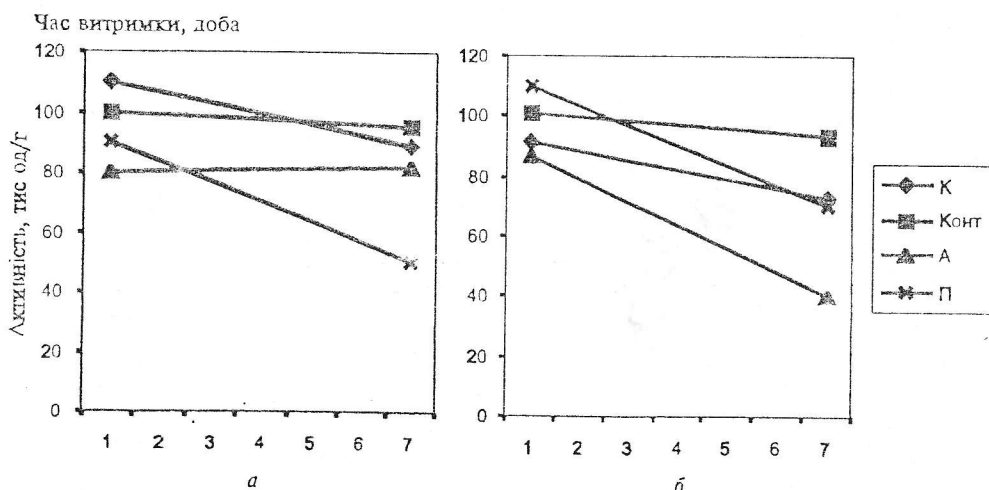


Рис. 1

відношенні 1:1, 1:2 та вмістом ферменту із розрахунку 0,1–0,4 мг/мл суспензії тест-культури (*S. aureus*) витримувались протягом 1 та 3 діб при 20° С. Бактеріологічна активність визначалась аналогічно, як і при аналізі сумішей полісахарид-фермент за ступенем деградації тест-культури (табл. 3).

Аналіз отриманих результатів підтверджує, що визначений вплив аеросилу на активність даного ферменту дозволяє застосовувати цей наповнювач для розробки лікарської форми. Причому, для препаратів тривалого зберігання доцільне використання невеликих концентрацій ферменту (0,1 мг/мл). Для лі-

Таблиця 3. Вплив аеросилу та часу попередньої витримки на процес деградації клітин тест-культур

Час витримки, год	Співвідношення ферментаеросил	Концентрація ферменту, мг/мл	Ступінь деградації клітин, %		
			30 хв	60 хв	120 хв
0	1:1	0,1	25	60	100
	1:2	0,1	10	25	90
	1:1	0,4	100	100	100
	1:2	0,2	25	50	100
	Контроль	0,1; 0,2; 0,4	100	100	100
24	1:1	0,1	20	60	85
	1:2	0,1	15	40	85
	1:1	0,4	70	100	100
	1:2	0,2	80	90	100
	Контроль	0,1; 0,2; 0,4	100	100	100
72	1:1	0,1	35	80	100
	1:2	0,1	15	25	60
	1:1	0,4	70	90	90
	1:2	0,2	80	90	100
	Контроль	0,1; 0,2; 0,4	100	100	100

Рівень деградації клітин в контролі за таких концентрацій ферменту вже через 30 хв досяг 100 %. Введення аеросилу зменшило швидкість цього процесу і такий показник активності препарату було досягнуто через 60–120 хв (залежно від концентрації ферменту в суміші). Отже, ця властивість аеросилу може бути корисною для пролонгації дії препарату при його застосуванні. Попередня витримка суміші (1–3 доби) не впливає суттєво на прояв бактеріологічної активності, але слід підкреслити, що зниження активності більш виражене у комплексі з більшою концентрацією ферменту. Так, активність суміші з концентрацією ферменту 0,4 мг/мл та співвідношення фермент-аеросил 1:1 протягом 3 діб витримки знижує свою активність через 30 хв з 100 до 70%, через 120 хв – з 100 до 90 %. Суміші з концентрацією ферменту 0,1 мг/мл зберігають активність протягом 3 діб, а в окремих випадках підвищують її. Співвідношення фермент-аеросил 1:1 зберігає більше активності, ніж співвідношення 1:2, і тому має переваги при використанні.

карських форм, що готуються екстемпорально, необхідне збільшення його концентрації.

Сполучення ферментного препарату з ПВП показало принципову можливість використання цього допоміжного матеріалу. Залишкова активність ферменту по відношенню до нативного становить 80% (по *S. aureus*) та 60% (по *Ps. fluorescens*). Плівка з ферментом зон лізису не давала, але росту під плівкою також не було. Можливо, це пояснюється недостатньою концентрацією ферменту в гелі.

Отже, результатом проведеної роботи є встановлення принципової можливості застосування ряду наповнювачів для створення готових лікарських форм ферментного препарату, що синтезується мутантним штамом *S. resifensis* v. *lyticus* 2435/М, а також визначення оптимальних їх співвідношень, а саме:

– серед досліджених мікробних полісахаридів більш доцільне використання ксантану в концентрації 7,5–10,0 мг/мл завдяки його більш стабілізуючій дії порівняно з іншими та збереженню достатнього рівня активності ферменту;

мак
кон
кон
коре

1. Д
л
в.
д
м
2. Н
ст
ве
ва
3. П
М
4. А
с

Ре
те

– комплекс аеросил-фермент проявляє максимальну активність у співвідношенні 1:1 у консистенції рідкої мазі (60 мг/мл). Змінюючи концентрацію ферменту у комплексі можна корегувати дію лікарської форми, пролонго-

вувати або скорочувати ефективний час дії;
– взаємодія ферменту з ПВП зберігає до 80% активності, завдяки чому він може використовуватися для створення бактерицидних плівки і гелі.

Т.С. Тодосійчук, Л.Г. Жолнер, Л.Н. Шинкаренко, В.А. Касперський

T.S. Todosijchuk, L.G. Zholner, L.M. Shinkarenko, V.O. Kaspersky

ВЛИЯНИЕ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* V. *LYTICUS* 2435/M

THE INFLUENCE OF AUXILIARY SUBSTANCES OF THE MEDICINE DOSAGES ON THE BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF THE ENZYME COMPLEX FROM *STREPTOMYCES RECIFENSIS* V. *LYTICUS* 2435/M

Исследована возможность создания готовых лекарственных форм на основе ферментного препарата широкого спектра бактериолитического действия, синтезируемого мутантным штаммом *Streptomyces recifensis* v. *lyticus* 2435/M. Показана принципиальная совместимость с использованными наполнителями и вспомогательными веществами. Определены оптимальные условия создания комплекса фермент-наполнитель, установлено эффективное время его действия.

The possibility of creation of medical dosages on the basis of enzyme preparation with the wide action spectrum produced by mutant *Streptomyces recifensis* v. *lyticus* 2435/M was investigated. The combination of major enzyme preparation with the some auxiliary substances was demonstrated. The optimal conditions of creation enzyme-auxiliary substance complex and the effective time of action are determined.

1. *Гниломедова Л.Е.* Биологические свойства препарата литических ферментов из *Actinomyces recifensis* v. *lyticus* 2435 и аспекты его применения: Автореф. дисс. канд. биол. наук: 03.00.07/ МГУ им. М.В. Ломоносова. – М., 1986. – 22 с.
2. *Новые лекарственные формы направленного действия с регулируемым высвобождением лекарственных веществ: Обзор / К.В. Алексеев, М.В. Гогова, А.Е. Добротворский и др. – М.; 1987. – 62 с.*
3. *Полимеры в фармации / Под ред. А.И. Тенцовой, М.Т. Альошина. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.*
4. *Актуальные проблемы создания лекарственных форм с заданными биофармацевтическими свойствами //*

Тез. докл. Всесоюз. н.-т. конфер., окт., 1989. – Харьков: 1989. – 220 с.

5. *Заикина Н.А., Елинов Н.П., Шатаева Л.К., Доморад А.А.* Активация и стабилизация протеолитических ферментов микробными полисахаридами // *Вопр. мед. Химии. – 1970 № 1. – С. 14.*
6. *Sandford P.A., Cottrell I.W., Pettitt D.T.* Microbial polysaccharides: new products and their commercial application // *Pure and Appl. Chem. – 1984. – №7. – P. 879–892.*
7. *Мальцев П.М., Емельянова Н.А.* Основы научных исследований. – Киев: Вища шк., 1982. – С. 192.

Рекомендована Радою хіміко-технологічного факультету НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
18 грудня 1997 року