

М.А. Григор'єва, Н.В. Москаленко, Т.С. Тодосійчук

Національний технічний університет України "КПІ", Київ, Україна

## ДОСЛІДЖЕННЯ ГОТОВИХ ФОРМ ІММОБІЛІЗОВАНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ ЦИТОРЕЦИФЕН ДЛЯ МЕДИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ

*Досліджено іммобілізовані форми бактеріолітичного ферментного препарату мікробного походження циторецифен для медичного застосування як окремого, так і комбінованого з антибіотиком засобу. Визначено динаміку бактеріо- та протеолітичної активностей у гелеподібній та сухій формі іммобілізованого на аеросилі препарату, а також вплив фізіологічного розчину як розчинника, на його активність. Встановлено стабільність протимікробної активності в процесі зберігання сухої форми циторецифену (порошку), переваги іммобілізованого на аеросилі препарату порівняно з нативним та ефективність комбінованої терапії з іммобілізованим антибіотиком левоміцетином.*

*Результати дослідження дають підстави розглядати отриманий сухий іммобілізований на аеросилі препарат циторецифен як стабільну та ефективну готову лікарську форму медичного призначення.*

*Исследованы иммобилизованные формы бактериолитического ферментного препарата микробного происхождения циторецифен для медицинского применения как отдельного, так и комбинированного с антибиотиком средства. Определено динамику бактерио- и протеолитической активностей в гелеобразной и сухой форме иммобилизованного на аэросиле препарата, а также влияние физиологического раствора как растворителя, на его активность. Установлено стабильность антимикробной активности при хранении сухой формы циторецифена (порошка), преимущества иммобилизованного на аэросиле препарата по сравнению с нативным и эффективность комбинированной терапии с иммобилизованным антибиотиком левомицетином.*

*Результаты исследования дают основания рассматривать полученный сухой иммобилизованный на аэросиле препарат циторецифен как стабильную и эффективную лекарственную форму медицинского назначения.*

*The work devotes the investigation of immobilizing forms of bacteriolytic enzyme preparation by microbial origin cytocefen for the medical application as individual and combinative with antibiotic mean. It was define the dynamics of bacterio- and proteolytic activities in the gel and dry forms of immobilizing on Silics preparation, as well as the influence of the physiological solution, as the dissolver, on its activity.*

*There were established the stability of antimicrobial activity during the dry form of cytocefen (powder) storage, the advantages of immobilizing on the base of Silics preparation, comparison to the native one, as well as the efficiency of combine therapy with the immobilizing levomycitine antibiotic.*

*The results of the investigation take the foundation to consider the dry immobilizing on the base of Silics preparation cytocefen as the stabile and effective medical form for medicine.*

Загострення епідеміологічної ситуації останнім часом та проблема дезинфекції лікарняного обладнання пов'язані з мінливістю збудників інфекційних процесів під дією існуючих антисептиків. Застосування літичних ферментів як протимікробних агентів зумовлене їхньою здатністю до деградації мікробних клітин [1, 2].

Розширенню медичних сфер застосування лізоenzимів сприяє зростаюча антибіотикорезистентність патогенних мікроорганізмів. Так, дослідивши 1300 клінічних штамів *Ps. aeruginosa* встановили множинну антибіотикорезистентність у 13% штамів,  $\beta$ -лактамі та аміноглікозидні антибіотики інгібували до 11 %, а ципрофлоксацин – до 34 % штамів [3, 4].

При визначенні взаємного впливу антибіотиків та лізоenzимів доведено ефективність їх сумісного використання для лікування поверхневих ран різної етіології та внутрішніх інфекцій [5]. Причому особливу дію справляють лізоenzимні комплекси, що містять ферменти різної специфічності: глюкозамінідази та амідози мають високу антибактеріальну активність, а протеази та протеїнази очищують рани від некротизованої тканини та сприяють грануляції поверхні [1, 6].

Важливою стороною розробки лікувальних засобів є питання готової лікарської форми препарату, що часто визначає його фармакологічну активність [7]. Асортимент допоміжних речовин, які використовують у складі лікарських форм, надзвичайно широкий – похідні целюлози, полісахариди, полімерні сполуки (полівінілхлорид, аеросил, поліетиленгліколь), що зумовлює необхідність підбору оптимальної композиції наповнювачів для певного ферменту [8].

Окремі допоміжні речовини у складі лікарської форми ензимних препаратів не лише стабілізують та пролонгують їх

дію, а й знижують вірулентність мікробних патогенів, впливаючи на гідрофобність та адгезивність клітин. [9] Так, бактеріальна протеаза, іммобілізована на аміноетилцелюлозі ("Профезим") значно прискорює загоювання гнійних ран порівняно з нативним ферментом, а іммобілізація на колагені дає змогу вводити препарат у внутрішні порожнини, оскільки сам носій з часом розсмоктується [2].

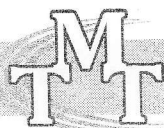
Аналіз літературних повідомлень дає підстави розглядати медицину як одну з найважливіших галузей застосування лізоenzимних препаратів різної специфічності. Ширшому впровадженню їх у практику, очевидно, сприятиме дослідження оптимальних умов виявлення дії препаратів та розробка їх ефективних готових форм.

## Матеріали і методи досліджень

Використовували ферментний препарат циторецифен та його експериментальні іммобілізовані форми, отримані шляхом адсорбційної іммобілізації на аеросилі марки Силікс А-300.

Циторецифен є ферментним комплексом, що синтезується мікробним штамом-продуцентом *Streptomyces recifensis var. lyticus* ІМВ Ас-5001 та містить глікозидази, мурамідози, протеїнази, протеази та інші ензими [10]. Препаратом порівняння та можливої комбінованої терапії слугував іммобілізований на аеросилі левоміцетин, наданий Інститутом хімії поверхні НАН України.

Для визначення літичної активності (ЛА) ферментних препаратів використовували мікробні тест-культури *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* як моделі грампозитивних та грамнегативних патогенів. Культури вирощували на м'ясо-пептонному агарі (МПА) або м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) упродовж 2 діб при температурі 37<sup>0</sup> С.



Літичну активність ферментного препарату визначали за здатністю до лізису суспензії тест-культур та виражали в одиницях на мілілітр (Од/мл). За одиницю ЛА приймали кількість ферменту, яка знижує густину суспензії тест-культури на 0,001 оптичної одиниці.

Визначення проводили турбідиметричним методом [11] у такій модифікації: до 4 мл суспензії тест-культури (з оптичною густиною 0,7 – 0,8 ОД при  $\lambda = 540$  нм) додавали 0,1 – 0,3 мл розчину ферменту та інкубували впродовж 10 хв при  $50^{\circ}\text{C}$ . Розчини препаратів готували у дистильованій воді у концентрації 40 мг/мл.

У контроль додавали 0,1 – 0,3 мл дистильованої води та інкубували у таких самих умовах. За різницею оптичної густини суспензії до (ОД<sub>вих</sub>) та після (ОД<sub>кін</sub>) інкубації визначали рівень ЛА. Оптичну густину вимірювали на фотометрі КФК-3 при  $\lambda = 540$  нм у кюветі 0,5 см на фоні дистильованої води. Літичну активність визначали за формулою:

$$LA = \frac{(OD_{в} - OD_{к} \times C) \times N}{0,001 \times t}, \text{ Од/мл,}$$

де, С – коефіцієнт автолізу (відношення ОД<sub>в</sub>/ОД<sub>к</sub> контролю); N – розведення проби в реакційній суміші, раз; t – час інкубації, хв; 0,001 – коефіцієнт перерахунку на одиницю активності.

Протеолітичну активність (ПА) визначали за азоказеїном [12]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням комп'ютерних програм Statgraphics, Harvard Chart XL 2.0, Exel Microsoft Office XP.

## Результати та їх обговорення

Специфічність дії та характеристики лізоензимного препарату циторецифен дають підстави розглядати його як ефективну протимікробну субстанцію для поверхневого застосування [8, 9, 15].

Проаналізувавши можливі лікарські форми даного препарату та допоміжні речовини, які використовують в аналогічних розробках, ми створили іммобілізовані на аеросилі гелеподібну та порошкоподібну (присипка) форми циторецифену.

Вибір аеросилу (марки Силікс А – 300) як носія для адсорбційної іммобілізації обумовлений його високою сорбційною здатністю, завдяки чому його застосовують для виведення з організму бактеріальних токсинів, продуктів часткового розкладу білків (у тому числі некротизованих тканин) та інших речовин. Здатність аеросилу зв'язувати мікроорганізми пов'язана зі спорідненістю частинок кремнезему до глікопротеїдних та фосфоліпідних структур мембран мікробних клітин. Така взаємодія приводить до аглютинації клітин та підвищення їх чутливості до протимікробних препаратів.

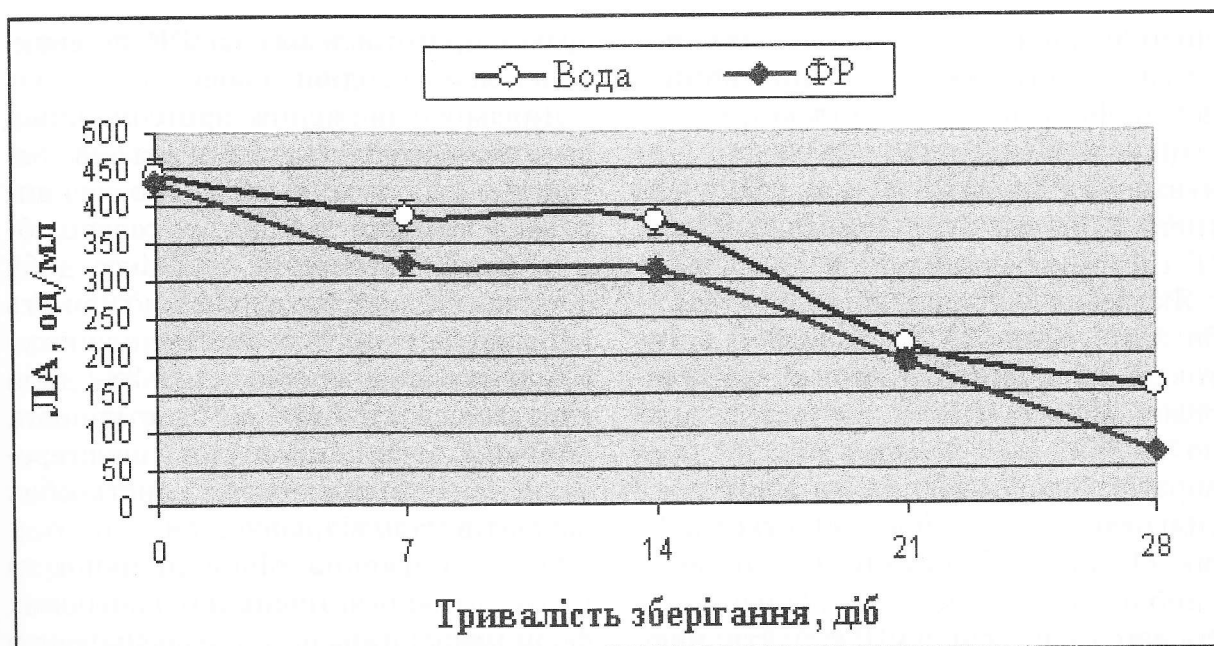
Для встановлення готової лікарської форми ферментного препарату, яка є доцільнішою для медичного застосування з точки зору стабільності та активності, досліджували динаміку втрати рівня активності отриманих експериментальних зразків під час зберігання, а також рівень протимікробної активності препаратів.

Визначали рівень літичної та протеолітичної активності гелеподібних форм циторецифену, що були приготовані на основі дистильованої води та фізіологічного розчину (ФР) та зберігалися впродовж 28 діб при температурі  $4^{\circ}\text{C}$ .

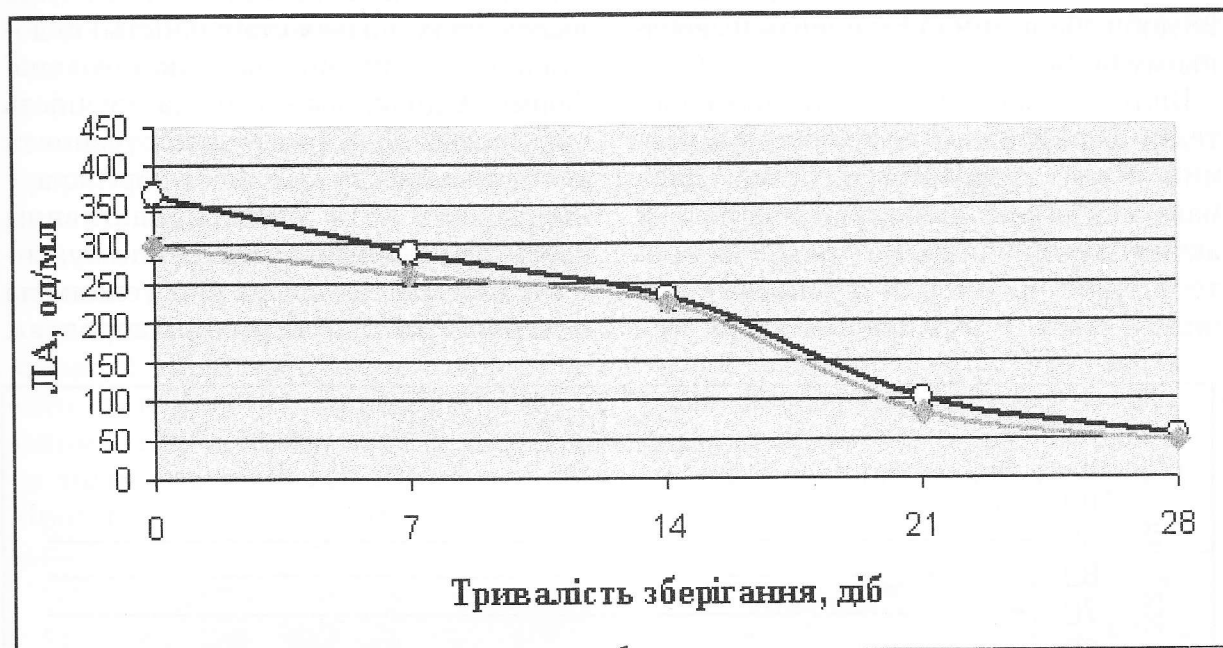
Як засвідчують наведені дані на (рис.1, а), вихідна стафілолітична активність ферментних препаратів, приготованих з використанням дистильованої води та ФР, має близькі значення. Однак упродовж зберігання така закономірність змінюється і на 28-му добу зразок препарату на основі ФР має майже на 60% нижчий рівень стафілолітичної активності. Це може пояснюватися



## НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ У МЕДИЦИНІ ТА БІОЛОГІЇ



а



б

Рис. 1.

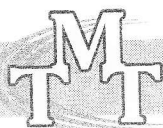
Динаміка літичної активності гелеподібної форми іммобілізованого циторецифену стосовно тест-культури: **а** - *St. aureus*; **б** - *E. coli*

впливом іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Cl}^-$ , які входять до складу ФР і є інгібіторами таких літичних ферментів, як N – ацетилглюкозамінідаза, N-ацетилмурамідідаза.

Аналогічний інгібуючий вплив на активність поліферментного препарату, хоч і не такий значний, іони ФР справляють

і на грамнегативні тест-культури *E. coli* (рис.1, б). Наявність іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Cl}^-$  виявляється у зниженні ЛА на 10 – 16% лише у перші доби зберігання, а надалі активність обох досліджуваних зразків є однаковою. Вірогідно, така відмінність впливу ФР на активність препаратів





щодо використаних тест-культур пов'язана з інгібуванням різних компонентів ферментного комплексу, що відіграють визначальну роль у руйнуванні клітинних структур грампозитивних (*St. aureus*) та грамнегативних (*E. coli*) мікроорганізмів.

Як засвідчують дані рис.1, до 14-ї доби зберігання ЛА препаратів, приготовлених з використанням дистильованої води та ФР, змінюється незначно. Найбільш різке зниження ЛА препаратів, приготовлених на основі дистильованої води, спостерігається з 14 по 21 добу зберігання і становить приблизно 40%. Для іммобілізованих препаратів на основі ФР найактивніше літична активність знижується з 21 до 28 доби зберігання і становить у середньому 60 %.

Вплив іонів ФР на протеїнази та протеази ферментного комплексу циторецифен має зворотний характер. Дані, наведені на рис. 2, вказують на високу активуючу дію іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Cl}^-$  на протеолітичні ферменти препарату, що виявляється у підвищеній вдвічі ПА

зразка, приготовленого на ФР, порівняно з гелем на водній основі.

Динаміка зниження протеолітичної активності досліджуваних зразків загалом має таку саму тенденцію, як і динаміка літичної активності гелеподібних форм препаратів: на 14-ту добу зберігання протеолітична активність обох варіантів препарату різко знижується, більше ніж удвічі, а до 28-ї доби втрачається до 60 – 80% активності. Причому наприкінці періоду спостереження протеолітична активність обох варіантів мало відрізняється.

Отже, зниження рівня літичної та протеолітичної активності гелеподібних форм іммобілізованого циторецифену в середньому за місяць становить 75%, що вказує на їх низьку стабільність і недоцільність виробництва такої готової форми. Однак, зважаючи на зручність цієї лікарської форми у застосуванні та достатньо високу активність препарату впродовж 7 – 14 діб, альтернативним варіантом може бути його приготування безпосередньо перед нанесенням на поверхню рани та зберігання впродовж

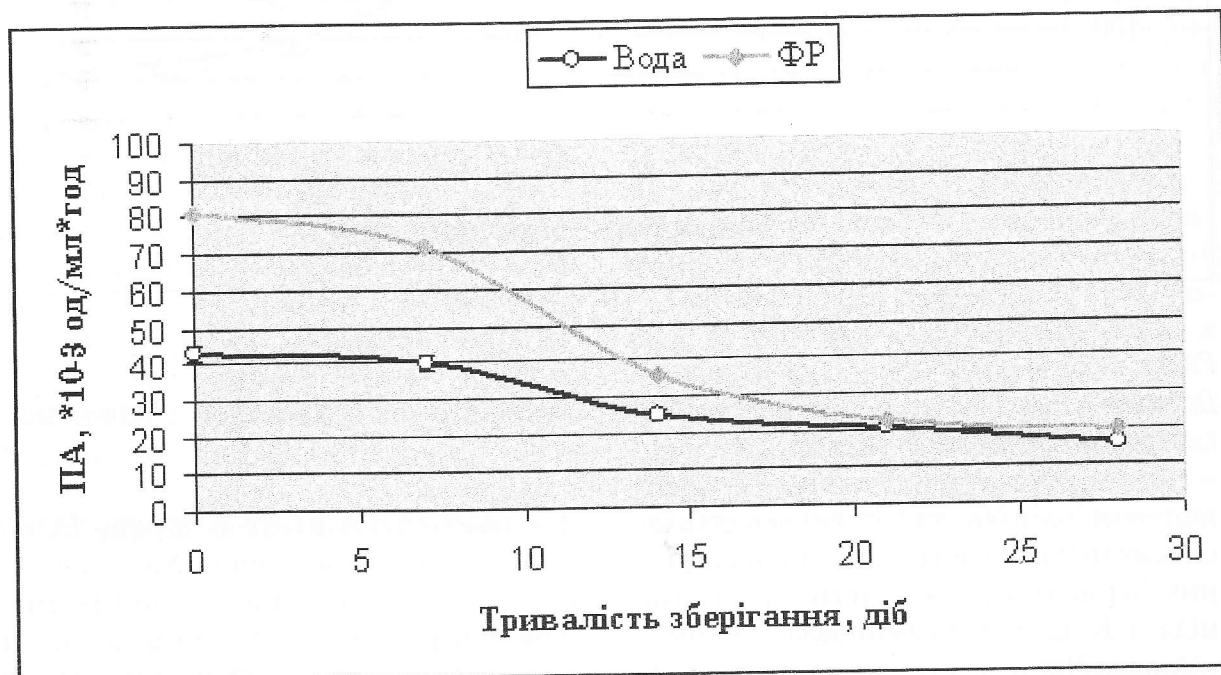


Рис. 2. Динаміка протеолітичної активності гелеподібної форми іммобілізованого циторецифену

## НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ У МЕДИЦИНІ ТА БІОЛОГІЇ

курсу лікування при 4<sup>0</sup> С. Враховуючи експериментальні дані, як розчинник доцільно використовувати фізіологічний розчин, який вдвічі активує протеїнази та незначно знижує ЛА препарату, а також є прийнятнішим для організму людини.

За необхідності диференційованої терапії на першому етапі лікування можна використовувати гель на водній основі з вищою літичною активністю, що забезпечить максимальну протимікробну дію щодо збудників інфекційного процесу, а на другому етапі – препарат на основі ФР з підвищеною протеолітичною активністю для очищення рани від некротизованої тканини та прискорення процесу грануляції.

Проблема стабільності готової лікарської форми іммобілізованого циторецифену теоретично має бути менш суттєвою у разі варіанта сухого препарату – присипки. Тому надалі досліджували динаміку літичної та протеолітичної активності сухого, іммобілізованого у водному розчині, циторецифену.

Як видно з результатів, представлених на рис. 3, стафілолітична активність сухого препарату під час зберігання протягом 4 тиж майже не втрачається – вона коливається в межах похибки (5%). Протеолітичні ферменти комплексу

виявилися менш стійкими і загальне зниження рівня ПА на 28-му добу зберігання становило близько 15%. Однак слід зазначити, що найсуттєвіше зниження ПА відбувається у перші 7 – 14 діб, а надалі динаміка втрати активності знижується.

Наведені дані засвідчують про високу стабільність сухої форми іммобілізованого на аеросилі циторецифену насамперед як протимікробного препарату (з провідною літичною активністю) та вказують на доцільність створення готової лікарської форми у вигляді порошку. Динаміка втрати активності сухого препарату дає підстави прогнозувати його ефективність упродовж як мінімум року за умов зберігання у сухому прохолодному місці, що є прийнятним терміном для аналогічних препаратів.

Іммобілізований на аеросилі циторецифен має переваги перед нативним ферментним препаратом як адсорбент патогенної мікрофлори та некротизованих тканин при рановому процесі, а також має знижену гігроскопічність в результаті зв'язування ОН-груп при утворенні водневих зв'язків між носієм та ферментом.

Сухий іммобілізований циторецифен використовували для визначення його

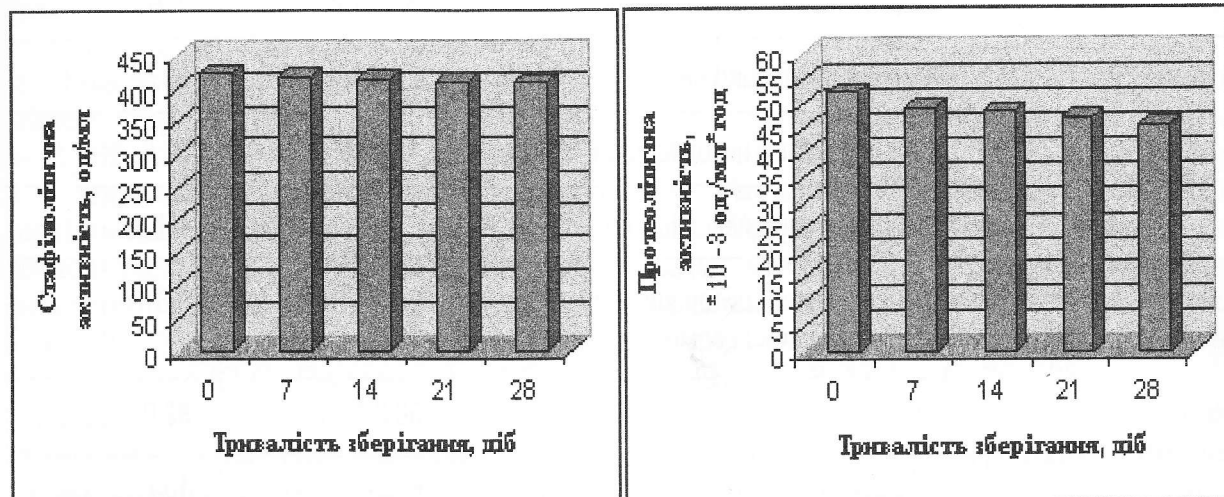


Рис. 3.

Динаміка стафілолітичної **a** та протеолітичної **b** активності сухого іммобілізованого циторецифену



протимікробної та бактеріостатичної дії *in vitro*. Препаратом порівняння та препаратом комбінованої терапії служував антибіотик левоміцетин, іммобілізований на аеросилі.

Тест-культури вирощували на МПБ за наявності нативного та іммобілізованого циторецифену, іммобілізованого левоміцетину та суміші цих іммобілізованих препаратів у концентраціях 50 мг/мл. Після інкубації зразки у відповідному розведенні висівали на чашки Петрі з

МПА та підраховували кількість життєздатних клітин.

Під час вирощування тест-культур з додаванням нативного циторецифену кількість мікроорганізмів знижувалась до 37 та 40 %, а при використанні його іммобілізованої форми – до 13 та 19% відповідно для *E.coli* та *St.aureus* стосовно контролю (табл. 1). У разі інкубації тест-культур з додаванням іммобілізованого левоміцетину виживало в середньому 1,5% клітин.

Таблиця 1.

Протимікробна активність циторецифену та комбінованого препарату

Тест-культура	Зразок	Концентрація клітин після інкубації з препаратами	
		кл/мл	%
E.coli	Нативний циторецифен	$11,3 \cdot 10^7$	36,5
	Іммобілізований циторецифен	$4 \cdot 10^7$	12,9
	Іммобілізований левоміцетин	$6 \cdot 10^6$	1,9
	Іммобілізований циторецифен + Іммобілізований левоміцетин	$5 \cdot 10^6$	1,6
	Аеросил	$30,1 \cdot 10^7$	97,1
	Контроль*	$31,1 \cdot 10^7$	100
St.aureus	Нативний циторецифен	$24,2 \cdot 10^7$	39,5
	Іммобілізований циторецифен	$11,4 \cdot 10^7$	18,6
	Іммобілізований левоміцетин	$7 \cdot 10^6$	1,1
	Іммобілізований циторецифен + Іммобілізований левоміцетин	$5 \cdot 10^6$	0,8
	Аеросил	$50,2 \cdot 10^7$	82,0
	Контроль*	$61,2 \cdot 10^7$	100

\*Контроль – культури, вирощені на МПБ без додавання препаратів.



У досліді з додаванням аеросилу встановлено зниження кількості живих клітин до 97 та 82 %, відповідно для *E.coli* та *St.aureus*, що може бути пов'язане з адсорбцією мікроорганізмів. При внесенні суміші іммобілізованих біопрепаратів кількість життєздатних клітин коливалася в межах 1 – 2% і була меншою, ніж при внесенні іммобілізованих препаратів окремо.

Таким чином, отримані дані вказують на підвищену вдвічі протимікробну активність досліджуваного іммобілізованого препарату циторецифен порівняно з нативними, а також на перспективність

комбінованих іммобілізованих препаратів бактеріостатичної дії. Висока протимікробна активність левоміцетину, очевидно, визначає його як ефективний антисептичний засіб, однак антибіотикорезистентність мікробних патогенів значно обмежує тривалість його застосування одним пацієнтом. Останній недолік, що відсутній у ферментних препаратах такого спрямування, поряд із високою протимікробною активністю вказує на перспективність медичного використання запропонованої сухої готової форми іммобілізованого препарату циторецифен.

1. Шинкаренко Л.Н., Манова В.А., Жовба В.И. Литические ферменты микроорганизмов как основа создания перспективных лекарственных средств // Актуальные проблемы создания лекарственных форм с заданными биофармацевтическими свойствами : Тез. докл. Всесоюзнауч.-тех. конф., окт. 1989. – Харьков, 1989. – С. 206.

2. Земцева Л.В., Старостина В.К., Булдаева Д.Ц. Имобилизация протосубтилина на полимерных носителях и исследование свойств иммобилизованного фермента // Иммобилизованные ферменты в лечении гнойно-некротических процессов. – Новосибирск, 1981. – С. 9 – 23.

3. *Jacoby G. A.* Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s // *Annu. Rev. Med.: Select. Top. Clin. Sci.* – 1996. – Vol. 47. – P. 169 – 179.

4. *Duran M. T., Molina F.* Susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias aisladas en un año (1993) // *Enferm. infec. microbiol. clin.* – 1996. – Vol. 14, – №6. – P. 370 – 376.

5. *Бабенко Ю.С., Гниломедова Л.Е., Кукушкина Н.В.* Изучение действия литических ферментов на стафилококк и возможность сочетанного применения с антибиотиками // Антибиотики и химиотерапия. – 1988. – Т. 33, № 2.

– С. 115 – 121.

6. *Кабачний П.І., Гребеньков В.І., Чорнобай В.Т.* Ферментні препарати медичного призначення // *Фармацевт. журн.* – 1989. – №1. – С. 25 – 33.

7. *Бащура Г.С., Кошелев Ю.А.* К вопросу об ассортименте вспомогательных веществ для технологии лекарств // Актуальные проблемы создания лекарственных форм с заданными биофармацевтическими свойствами : Тез. докл. Всесоюзнауч.-техн. конф., окт. 1989. Харьков, 1989. – С. 10.

8. *Наумчик Г.Н., Чижиков Д.В.* Особенности технологии лекарственных форм препаратов микробного происхождения // *Химия, технология производства и медико-биологического исследования ферментных препаратов медицинского назначения.* – Л.: Б.И., 1983. – С. 51 – 61.

9. *Наумкина Е.В., Обгольц А.А., Рейс Б.А., Чернышов А.К.* Влияние сорбирующих материалов на гидрофобность и адгезивность грамотрицательных микроорганизмов // *Эфферент. терапия.* – 1997. – Т. 3, № 1. – С. 26 – 28.

10. *Тодосійчук Т.С.* Розробка технології гідролітичного ферментного препарату циторецифен : Автореф. дис... канд. техн. наук. – К, – 2000. – 25 с.

11. *Павлова И.Н., Жолнер Л.Г.,*



Захарова И.Я. и др. Сериновая протеиназа с литическими свойствами // Микробиология. – 1988. – Т. 57. – № 3. – С. 398 – 404.

12. Петрова И.С., Винцюнайте М.Н.

Определение литической и протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиология. – 1966. – № 2. – С. 322 – 327.

## Про авторів

**ГРИГОР'ЄВА Марина Анатоліївна** — аспірантка кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України "КПІ". 03056, м. Київ, пр-т Перемоги, 37. Факультет біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України "КПІ".

Тел.: 241 -76 -13 (сл.).

E-mail: [alina@fbt.ntu-kpi.kiev.ua](mailto:alina@fbt.ntu-kpi.kiev.ua)

**МОСКАЛЕНКО Наталія Вікторівна** — магістр кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України "КПІ".

**ТОДОСІЙЧУК Тетяна Сергіївна** — науковий керівник, канд.т.н., доцент кафедри промислової біотехнології Факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України "КПІ".

Тел.: 454 -98 -51 (сл.), 8 -067 -401 -66 -55 (моб.).

E-mail: [totania@mail.ru](mailto:totania@mail.ru)

## А ЗНАЕТЕ ЛИ ВЫ...

Если разбился градусник нужно немедленно открыть окна в зараженном помещении; выключить искусственную вентиляцию; удалить из помещения детей и домашних животных.

Категорически запрещается:

1. Использовать пылесос. Если вы пытаетесь собрать ртуть с помощью пылесоса, это приведет к еще большему распространению паров ртути. Помните, что если пылесос все же был использован – его придется немедленно выбросить (особенно если он не имеет одноразовых мешков для сбора пыли).

2. Использовать метлу или швабру. В этом случае, шарики ртути будут разбиты на еще более мелкие частицы, которые невероятно трудно собрать.

3. Выбрасывать ртуть в унитаз. Она может осесть в канализационных трубах и продолжит оказывать негативное

влияние на здоровье людей. Извлечь ртуть из канализации невероятно сложно.

4. Стирать одежду или предметы, контактировавшие с ртутью в стиральной машине или использовать для очистки посуды посудомоечную машину. Мало того, одежду и обувь, контактировавших с ртутью, рекомендуется немедленно выбросить.

Если ртуть попала на ковер или ковровое покрытие, этот участок необходимо вырезать, тщательно упаковать и выбросить.

Для удаления ртути можно использовать: полиэтиленовые пакеты, плотные мешки для мусора, бумажные полотенца или салфетки, скребок с резиновым кончиком, клейкую ленту, крем для бритья. Делать это можно только в резиновых перчатках.