

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ЕНЗИМІВ УКРАЇНСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПЕРЕВ'ЯЗУВАЛЬНИХ МАТЕРІАЛІВ ПРОТИОПІКОВОЇ ДІЇ**

**Шестеренко Ю.А., Топтиков В.А., Шестеренко Є.А., Декіна С.С.**

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

*Люстдорфська дор., 86, Одеса, Україна, 65080*

[yushesterenko@gmail.com](mailto:yushesterenko@gmail.com)

Лікування опіків залишається однією з найскладніших та найважливіших задач сучасної медицини [1]. Це питання набуває особливої актуальності під час війни, коли опіки є одними з найпоширеніших видів травм, спричинених вибухами, вогнем та токсичними речовинами, що застосовуються у бойових діях. Значна частота таких ушкоджень і необхідність надання кваліфікованої допомоги в умовах обмежених ресурсів роблять дослідження та розробку нових методів лікування опіків надзвичайно важливими для порятунку життів та зменшення наслідків для здоров'я постраждалих.

Очищення ран є одним з ключових етапів у процесі їх загоєння, де все ширше застосовуються методи, що базуються на дії протеолітичних ензимів. Використання протеаз відкриває нові перспективи для створення ефективних протиопікових засобів, які сприяють регенерації тканин, прискоренню загоєння та запобігають утворенню рубців [2, 3].

Розробка протиопікових пов'язок з використанням ензимів саме українського виробництва має стратегічне значення для медичної галузі країни. Використання власних ензимів, зокрема продукції Ладизинського заводу мікробіологічного синтезу «Ензим», забезпечує стабільність постачання, знижує залежність від імпорту та водночас підтримує розвиток національного виробництва.

Метою цього дослідження є комплексне вивчення та порівняння властивостей препаратів «Протеази С» і «Колагенази» українського виробництва з перспективою їх використання у створенні ефективних протиопікових перев'язувальних засобів.

### Методи експерименту.

У дослідженні використовували «Протеази С» з *Acremonium chrysogenum* і «Колагеназу» з *Streptomyces lavendulae* виробництва Заводу мікробіологічного синтезу «Ензим» у місті Ладизин.

Вміст загального протеїну вивчали методом Лоурі в модифікації Хартрі [4], загальну протеолітичну активність визначали за казеїном, також досліджували специфічні види активності: желатиназну, колагенолітичну і фібринолітичну згідно [5].

Кінетичні параметри гідролізу казеїну в присутності «Протеази С» і «Колагенази» визначали за початковими швидкостями утворення продукту. Кількість ензиму становила 8,5 і 13 мкг/см<sup>3</sup> для «Колагенази» та «Протеази С», відповідно, Концентрації желатину: 0,045-0,727 г/дм<sup>3</sup>. На основі отриманих даних методом Лайнуівера-Берка знаходили максимальні швидкості реакції  $V_{\text{макс.}}$  і константи Міхаеліса  $K_m$  [6]. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи t-критерій Стюдента, результати вважали достовірними при ( $P < 0,05$ ). Для отримання стандартних похибок кінетичних констант їх визначали для коефіцієнтів лінійної регресії лінеаризованої кінетичної кривої. Потім розраховували стандартні похибки  $K_m$  і  $V_{\text{макс.}}$ , визначаючи похибки непрямих вимірювань [7].

### Результати і обговорення

Для комплексного вивчення та порівняння властивостей «Протеази С» і «Колагенази» визначали загальний вміст протеїну в досліджуваних препаратах ензимів. За результатами аналізу встановлено, що препарат «Колагеназа» містить 5,4 % протеїну, тоді як у «Протеазі С» цей показник становить 11,6 %.

Вивчення загальної протеолітичної активності показало, що «Колагеназа» проявляє вищу активність за казеїном порівняно з «Протеазі С» (табл. 1). Водночас результати дослідження

специфічних видів протеолітичної активності виявили протилежні тенденції. Зокрема за желатином, «Протеаза С» продемонструвала активність у 2,1 раза вищу за таку для «Колагенази». Крім того при близьких значеннях колагеназної активності, активність «Протеази С» за фібрином була у 3,5 рази вищою.

Наявність такого різноманіття специфічних видів протеолітичної активності є дуже важливим для подальшого використання цих ензимів для цілеспрямованого розщеплення різних компонентів опікового струпа, що відкриває перспективи їх використання у складі сучасних протиопікових препаратів.

Таблиця 1

Загальна і специфічні види протеолітичної активності досліджуваних протеаз

Субстрати	Активність / частка протеолітичної активності до специфічних субстратів в загальній активності (%)	
	«Колагеназа»	«Протеаза С»
Казеїн	288,920 ± 5,630 / 100	156,380 ± 1,570 / 100
Желатин	62,495 ± 2,855 / 22	131,898 ± 4,070 / 84
Колаген	11,036 ± 0,290 / 4	10,033 ± 0,265 / 6
Фібрин	0,006 ± 0,001 / 2	0,021 ± 0,003 / 13

Вивчення стаціонарної кінетики дії ензимів здійснюють, використовуючи рівняння Міхаеліса-Ментен, для спрощення визначення кінетичних констант застосовують різні форми його лінеаризації [6]. В ході даного дослідження проведений порівняльний аналіз кінетики гідролізу желатину в присутності «Протеази С» і «Колагенази» з використанням методу Лайнуївера-Берка (рис.).

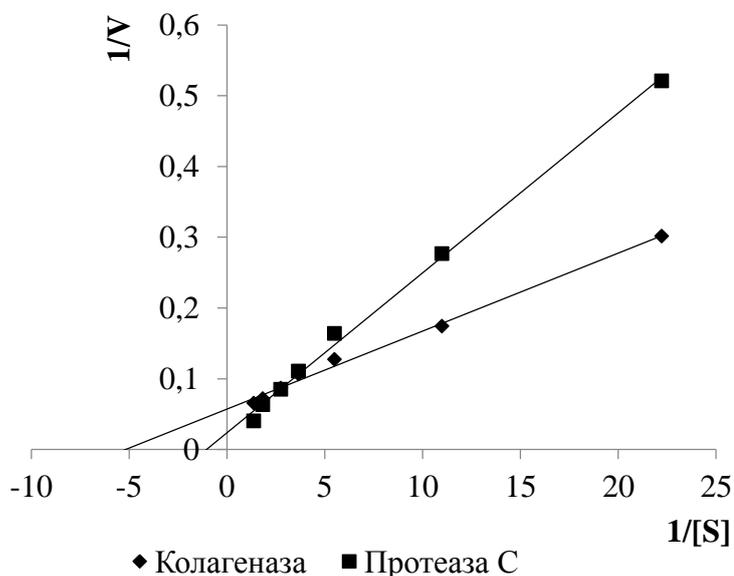


Рис. Визначення кінетичних параметрів гідролізу желатину, що каталізується пептидазою, в координатах Лайнуївера-Берка

Виявлено, що значення константи Міхаеліса для «Протеази С» у 5,2 рази вище за таке для «Колагенази», що свідчить про більшу спорідненість «Колагенази» до даного субстрату (табл. 1).

Водночас, показано, що максимальна швидкість гідролізу желатину, що каталізується «Протеазою С» значно перевищує  $V_{\text{макс}}$  в присутності «Колагенази», що узгоджується з даними вимірювання желатиназної активності.

Таблиця 2

Кінетичні параметри гідролізу желатину, що каталізується «Протеазою С» і «Колагеназою»

Ензим	Кінетичні параметри	
	$K_m$ , г/дм <sup>3</sup>	$V_{\text{макс.}}$ , мкмоль лейцину/мг протеїну за хв.
«Колагеназа»	1,81± 0,14	18,68± 0,94
«Протеаза С»	9,44± 2,41	41,79± 9,62

Таким чином, в ході дослідження і порівняння протеаз українського виробництва показано, що обидва ензими володіють комплексною протеолітичною активністю. При нижчій загальній протеолітичній активності «Протеази С», вона має значно більшу желатиназну і фібринолітичну активності при порівняній колагеназній. Вивчення кінетики гідролізу желатину показало значну відмінність у кінетичних константах.

«Протеаза С» і «Колагеназа» є перспективними об'єктами для подальшого їх використання у цілеспрямованому розщепленні опікового струпа, що відкриває широкі можливості їх включення до складу сучасних протиопікових препаратів.

**Список літератури:**

1. Yuan N., Shao K., Huang Sh., Chen Ch. Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – V. 240. – 124321.
2. Deplazes B.C., Hofmaenner D.A., Scheier T.C., Epprecht J., Mayer M., Schweizer T.A., Buehler Ph.K., Frey P.M., Brugger S.D. Enzymatic debridement with bromelain and development of bacteremia in burn injuries: A retrospective cohort study // *Burns*. – 2024. – V. 50. – P. 405–412.
3. Fairlamb D.M., Kelety B., Bachert A., Scholtissek A., Jones R.D., Davis S.C., Kirsner R.S. Preliminary evidence supporting a new enzymatic debridement product for use in chronic wounds // *International Wound Journal*. – 2023. – V. 20, I. 6. – P. 2095-2104.
4. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Analytical Biochemistry*. – 1972. – V. 48, I. 1. – P. 422-427.
5. Toptikov V.A., Romanovska I.I., Kovtun O.O. Proteolytic activity of enzymes in organs of the Black Sea mollusks // *Hydrobiol. J.* – 2024. – V. 60, I. 2. – P. 66-76.
6. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods 3<sup>rd</sup>*. Wiley-VCH, 2017, 336 p.
7. Taylor J.R. *An Introduction to Error Analysis: The Study of Uncertainties in Physical Measurements*. 2nd Edition, University Science Books.: Sausalito, 1997, 344 p.