

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2026 р.

**РОЗРОБКА ЕНЗИМНИХ КОМПОЗИЦІЙ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ РАН**

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Шевчук Зоряни Віталіївни

Науковий керівник від кафедри

канд. біол. наук, ст. дослідник

Галенова Т.І.

Робота виконана на базі кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом доцента кафедри біохімії, канд. біол. наук, ст. дослідника Галенової Тетяни Іванівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- EGF - epidermal growth factor (епідермальний фактор росту);
- MMP - matrix metalloproteinases (матриксні металопротеїнази);
- PDGF - platelet-derived growth factor (тромбоцитарний фактор росту);
- SDF-1 - stromal cell-derived factor 1 (стромальний клітинний фактор 1);
- TGF- α - transforming growth factor α 1 (трансформуючий фактор росту α 1);
- TGF- β - transforming growth factor β 1 (трансформуючий фактор росту β 1);
- VEGF - vascular endothelial growth factor (фактор росту ендотелію судин).

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Ензими як біологічноактивні речовини.....	6
1.1. Ензими природнього походження: джерела отримання та біологічне значення.....	6
1.2. Терапевтичний потенціал ензимів.....	15
1.3. Механізм загоєння ран та роль ензимів у процесах регенерації шкіри.....	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	25
2.1. Реактиви та матеріали.....	25
2.2. Отримання білок-вмісної сировини з гідробіонтів.....	25
2.3. Виділення та очищення протеолітичних ферментів.....	26
2.4. Дослідження протеолітичної активності ферментних фракцій методом зимографії	27
2.5. Визначення загальної колагенлітичної активності фракцій ензимів....	28
2.6. Визначення загальної протеолітичної активності та інгібіторного профілю.....	29
2.7. Визначення концентрації білка у зразках.....	30
2.8. Оцінка ранозагоювального ефекту ензимних композицій гідроіонтів на моделі гнійно-некротичної рани у щурів.....	31
2.9. Статистична обробка експериментальних даних.....	32
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	33
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ВСТУП

Лікування ран різного походження залишається актуальною проблемою сучасної медицини, особливо у випадках хронічних, інфікованих або експериментальних ран, що характеризуються порушенням нормального перебігу регенеративних процесів. Незважаючи на значний прогрес у створенні ранових покриттів і фармакологічних засобів, ефективність загоєння часто обмежується тривалим запаленням, надмірною протеолітичною активністю, бактеріальною контамінацією та недостатньою регенерацією тканин [1].

Загоєння ран є складним багатофазним біологічним процесом, який включає стадії запалення, проліферації та ремоделювання тканин. Ключову роль у регуляції цих етапів відіграють біологічно активні протеїни, зокрема ферменти, фактори росту та структурні білки позаклітинного матриксу. Порушення балансу між протеолітичними ензимами та їх інгібіторами є однією з основних причин утворення хронічних ран [2].

У зв'язку з цим значний інтерес викликає використання ензимів у складі місцевих лікарських форм, зокрема мазей, для лікування ран. Протеолітичні ензими здатні здійснювати селективний ферментативний дебридмент, видаляти некротизовані тканини, модулювати запальну відповідь та створювати сприятливі умови для проліферації клітин і формування грануляційної тканини. На відміну від механічних і хірургічних методів очищення ран, ензимна терапія характеризується меншою травматичністю та можливістю контрольованого локального впливу [3].

Особливу увагу в сучасній біотехнології привертають біоактивні протеїни природного походження. Морські організми, є унікальним джерелом протеїнів і ензимів із високою біологічною активністю. Ці організми характеризуються винятковою здатністю до регенерації тканин, що зумовлено наявністю специфічних протеїнів, залучених до контролю клітинної проліферації, ремоделювання матриксу та імунної відповіді [4].

Дослідження останніх років демонструють, що протеїни морського походження, включаючи серинові протеази, матричні металопротеїнази та антибактеріальні білки, можуть бути перспективними компонентами засобів для лікування ран. Вони поєднують протеолітичну, протизапальну та антимікробну активність, що є особливо важливим для створення ефективних ензимних композицій місцевої дії [5].

Застосування ензимних мазей природного походження відкриває нові можливості для ранової терапії. Біотехнологічні підходи до отримання та включення таких протеїнів у мазеві композиції забезпечують збереження їх активності й пролонговану дію. Водночас механізми впливу морських протеїнів на рановий процес потребують подальшого вивчення.

Метою роботи було одержання та характеристика протеолітичних ферментів, виділених із гідробіонтів (*Odontaster validus* та *Sterechnus neumayeri*), а також оцінка ефективності створених на їх основі ензимних композицій у процесі загоєння експериментальних гнійно-некротичних ран.

Завдання роботи:

1. Очистити ензимні фракції з білок-вмісного екстракту, одержаного з тканин гідробіонтів, із використанням іонообмінної хроматографії.
2. Оцінити загальну протеолітичну і колагенолітичну активність отриманих фракцій.
3. Визначити субстратну специфічність ензимних фракцій методом ензим-електрофорезу.
4. Дослідити потенційний механізм дії ферментів та встановити їх належність до серинових або металозалежних протеїназ за допомогою інгібіторного аналізу.
5. Оцінити швидкість ранозагоєння на моделі гнійнонекротичної рани у щурів на тлі застосування ензимних композицій.

РОЗДІЛ 1

ЕНЗИМИ ЯК БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ

1.1. Ензими природного походження: джерела отримання та біологічне значення

Ферменти природного походження широко застосовуються в медицині, біотехнології та фармацевтичній промисловості. Завдяки високій специфічності, каталітичній ефективності та відносній біосумісності вони розглядаються як перспективні терапевтичні агенти, зокрема у процесах регенерації та контролю запалення. Природні ензими можуть бути отримані з різних біологічних джерел, серед яких провідне місце займають мікроорганізми, рослини та тварини, що відрізняються механізмами дії, субстратною специфічністю та сферою застосування [6, 7].

Мікроорганізми

Мікроорганізми є одним із найбільш розповсюджених джерел терапевтичних ферментів завдяки високій продуктивності, можливості масштабованого біотехнологічного виробництва та широким можливостям генетичної модифікації. Бактерії, мікроскопічні гриби та актиноміцети продукують різноманітні гідролази, оксидоредуктази, ліази та ізомерази, які активно застосовуються у сучасній медицині. Особливого значення мікробні ферменти набули в онкології, тромболітичній терапії, лікуванні хронічних ран, а також у боротьбі з інфекційними ускладненнями [8].

Одним із найбільш відомих прикладів терапевтичного ферменту мікробного походження є L-аспарагіназа, яку отримують із *Escherichia coli* та *Erwinia chrysanthemi* [9]. Цей фермент каталізує гідроліз L-аспарагіну до L-аспартату та аміаку, знижуючи концентрацію аспарагіну в плазмі крові. Оскільки деякі пухлинні клітини, зокрема клітини гострої лімфобластної лейкемії, не здатні синтезувати достатню кількість аспарагіну ендогенно, виснаження цього субстрату призводить до порушення синтезу білка та

індукції апоптозу пухлинних клітин [9]. Сучасні дослідження спрямовані на зменшення імуногенності ферменту, створення пегільованих форм та розробку рекомбінантних варіантів із покращеним фармакокінетичним профілем, що демонструють знижений ризик гіперчутливості та пролонговану дію.

Важливу групу становлять фібринолітичні ферменти, зокрема стрептокіназа, що продукується β -гемолітичними стрептококами. Вона активує плазміноген з утворенням плазміну, який здатний руйнувати фібринові згустки. Завдяки цьому стрептокіназа використовується при лікуванні тромбозів та інфаркту міокарда. Попри появу рекомбінантних тканинних активаторів плазміногену, цей фермент залишається актуальним через доступність та економічну ефективність. Сучасні біоінженерні підходи дозволяють створювати модифіковані форми зі зниженою антигенністю та покращеною селективністю дії.

Суттєве значення у клінічній практиці мають колагенази мікробного походження, зокрема ферменти *Clostridium histolyticum*. Вони селективно гідролізують колаген I та III типу, що дозволяє ефективно видаляти некротичні тканини без пошкодження життєздатних структур. Колагенази застосовуються у терапії хронічних ран та для ензимного дебридменту [10]. Клінічні дослідження останніх років підтверджують їхню ефективність при лікуванні діабетичних виразок та пролежнів, що є особливо актуальним у контексті розробки ензимних композицій для ранової терапії.

Серед інших ферментів мікробного походження важливе місце займають нуклеази, зокрема дезоксирибонуклеаза (ДНКаза), яку продукують бактерії роду *Streptococcus* та *Staphylococcus*. Цей фермент каталізує гідроліз ДНК, що має важливе значення у терапії гнійних ран, оскільки в'язкість ексудату значною мірою зумовлена наявністю позаклітинної ДНК. Застосування ДНКази сприяє розрідженню гнійного вмісту, покращенню дренажу та очищенню рани [11].

Іншим перспективним ферментом є кератиназа, яку продукують бактерії родів *Bacillus* та *Streptomyces*. Вона здатна розщеплювати кератин – один із найбільш стійких білків, що входить до складу ороговілих тканин. Кератинази досліджуються як ефективні агенти для очищення ран від некротичних тканин і кірок, особливо при опіках та хронічних ушкодженнях.

Також значний інтерес становлять ліпази мікробного походження, які каталізують гідроліз ліпідів. Вони можуть впливати на ліпідний компонент клітинних мембран мікроорганізмів, що обумовлює їх потенційну антимікробну дію. Деякі ліпази також беруть участь у регуляції запальних процесів через вплив на метаболізм ліпідних медіаторів [12].

Гіалуронідази мікробного походження, зокрема ферменти *Streptococcus pyogenes*, руйнують гіалуронову кислоту позаклітинного матриксу, підвищуючи проникність тканин та покращуючи дифузію лікарських препаратів. Вони використовуються в хірургії, дерматології та як допоміжні засоби для підвищення біодоступності інших лікарських засобів. Рекомбінантні форми характеризуються контрольованою активністю та покращеним профілем безпеки [13].

Ферменти з малайзійського штаму *Geotrichum candidum*, які збагачені вільною лауриноювою кислотою, проявляють антимікробну активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій [14].

Протеази *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* та споріднених видів активно досліджуються як компоненти ранозагойних композицій [15]. Вони забезпечують очищення рани від некротичних мас, зменшення бактеріального навантаження та стимуляцію регенеративних процесів. Окремі серинові протеази проявляють здатність регулювати цитокіновий профіль та зменшувати вираженість запальної реакції, що робить їх перспективними компонентами сучасних біоактивних мазей.

У ширшому контексті мікробні ферменти знаходять застосування в медицині для лікування різноманітних патологічних станів, включаючи

генетичні та метаболічні порушення, нейродегенеративні захворювання, а також для детоксикації організму та як протизапальні й травні засоби [16].

Перевагами мікробних ферментів є висока біотехнологічна відтворюваність, можливість генної модифікації, масштабованість виробництва та контроль чистоти й стандартизації кінцевого продукту.

Морські організми

Морське середовище є унікальним джерелом об'єктів для отримання біологічно активних молекул, зокрема ферментів із високою стабільністю, специфічністю та активністю в умовах, що відрізняються від наземного середовища. Безхребетні, такі як морські зірки, їжаки, молюски, а також морські бактерії й водорості продукують ферменти, які адаптовані до високої солоності, змінного температурного режиму та окисного стресу. Ці властивості обумовлюють їх перспективність у біомедичних застосуваннях.

Особливий інтерес становлять морські протеази, які характеризуються активністю у широкому діапазоні рН, стійкістю до іонів солей та високою субстратною специфічністю. Серинові протеази, виділені з морських організмів, досліджуються як перспективні агенти для ензимного дебридменту ран. Вони здатні селективно гідролізувати денатуровані та некротичні білки, стимулювати проліферацію фібробластів та активувати ремоделювання позаклітинного матриксу [17].

Фібринолітичні ферменти морського походження, виділені як з безхребетних, так і з морських мікроорганізмів, демонструють здатність ефективно розчиняти фібринові згустки. Деякі з них проявляють підвищену селективність щодо фібрину, мінімально впливаючи на інші білки плазми, що потенційно знижує ризик геморагічних ускладнень [18].

Не менш важливими є антиоксидантні ферменти морських організмів, зокрема супероксиддисмутази, каталази та пероксидази. У процесі загоєння ран оксидативний стрес є одним із ключових чинників, що сприяє хронізації запалення. Морські антиоксидантні ферменти здатні знижувати рівень

реактивних форм кисню, обмежувати ушкодження клітинних структур та прискорювати епітелізацію [19].

У морських безхребетних також виявлено лізоцимоподібні ферменти з вираженою антимікробною активністю. Вони здатні руйнувати клітинні стінки бактерій та проявляють широкий спектр протимікробної дії. Поєднання протеолітичної та антибактеріальної активності робить ці ферменти перспективними компонентами антисептичних ранових композицій, особливо при лікуванні інфікованих ран.

Значний інтерес становлять альгінази, які продукуються морськими бактеріями та водоростями. Вони каталізують деградацію альгінатів – полісахаридів, що входять до складу клітинних стінок бурих водоростей. Альгінази досліджуються як засоби для руйнування біоплівки та покращення проникнення лікарських речовин у тканини [20].

Хітинази, що синтезуються морськими мікроорганізмами та безхребетними, здатні розщеплювати хітин – структурний компонент екзоскелетів ракоподібних та клітинних стінок грибів. Це обумовлює їх антимікробну та протигрибкову активність, що є важливим у профілактиці інфекційних ускладнень ран.

Крім того, у морських організмів виявлено тирозинази, які беруть участь у процесах біосинтезу меланіну та окисненні фенольних сполук. Вони можуть впливати на процеси пігментації та загоєння тканин, а також проявляти антиоксидантні властивості [21].

Перевагами морських ферментів є висока стабільність у біологічних середовищах, унікальна субстратна специфічність, адаптація до екстремальних умов та низька ймовірність розвитку резистентності мікроорганізмів.

Рослини

Рослини є важливим джерелом біологічно активних ферментів, що характеризуються високою протеолітичною активністю, відносною безпечністю та тривалою історією застосування у традиційній і сучасній

медицині. Особливий інтерес становлять протеази рослинного походження, які широко використовуються у терапії запальних процесів, травматичних ушкоджень, а також у складі ранозагойних і протинабрякових препаратів [22].

Одним із найбільш досліджених рослинних ферментів є папаїн, який отримують із латексу плодів *Carica papaya*. Папаїн належить до цистеїнових протеаз і здатний гідролізувати широкий спектр білкових субстратів. У медичній практиці він застосовується для ензимного дебридменту ран, оскільки селективно руйнує некротичні тканини, не пошкоджуючи життєздатні клітини. Крім того, папаїн проявляє протизапальні властивості та сприяє очищенню ранової поверхні, що створює сприятливі умови для регенерації. Сучасні дослідження підтверджують ефективність папаїну у складі гелів та мазей для лікування хронічних ран і опіків [23].

Бромелайн, комплекс протеолітичних ферментів, виділений із *Ananas comosus*, також належить до цистеїнових протеаз. Він характеризується вираженою протизапальною, фібринолітичною та протинабряковою дією. Бромелайн здатний модулювати продукцію прозапальних цитокінів, зменшувати набряк тканин та прискорювати розсмоктування гематом. У клінічній практиці його застосовують при травмах, післяопераційних ускладненнях, а також у комплексній терапії запальних захворювань [24].

Фіцин, що отримується з латексу інжиру *Ficus carica*, також є цистеїновою протеазою з широким спектром дії. Він проявляє здатність до гідролізу білків позаклітинного матриксу та може використовуватися як потенційний імуномодулюючий агент [25].

Інвертаза, що міститься у плодах та нектарі рослин, каталізує розщеплення сахарози на глюкозу та фруктозу. Цей фермент має значення у регуляції вуглеводного обміну та може використовуватися у фармацевтичних технологіях для створення лікарських форм із контрольованим вивільненням цукрів [26].

Окрему групу рослинних ферментів становлять травні протеази, які сприяють ефективному засвоєнню поживних речовин. Зокрема, фермент актинідин, що міститься у плодах ківі сорту *Hayward* та *SunGold*, відіграє важливу роль у процесах гідролізу білків у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту. Його дія сприяє покращенню перетравлення тваринних білків, що має значення для оптимізації травлення та зменшення функціонального навантаження на травну систему [27].

Ензими бобових представників родини *Fabaceae*, підродини *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* та *Faboideae/Papilionoideae* проявляють різноманітні біологічні ефекти, включаючи антибактеріальну та протигрибкову активність. Їх біологічне значення також пов'язане зі здатністю впливати на процеси запалення, коагуляції крові, тромбоутворення та клітинної проліферації [28].

Біологічно активні компоненти насіння льону звичайного (*Linum usitatissimum*) пов'язані з нормалізацією травлення, регуляцією рівня глюкози в крові та підтримкою загального метаболічного балансу. Крім того, наявність інгібіторів протеаз обумовлює потенційні протипухлинні властивості та захисний ефект щодо клітинних структур.

Член родини гарбузових, *Momordica charantia* L., використовується як традиційний засіб для лікування цукрового діабету та інших метаболічних синдромів. Метанольний екстракт *M. charantia* демонструє потужну інгібуючу активність α -глюкозидази та значно покращує рівень глюкози в крові натщесерце та інсуліну у діабетичних щурів [28].

Серед інших рослинних ферментів слід відзначити пероксидази та поліфенолоксидази, які беруть участь у регуляції окисно-відновних процесів. Деякі рослинні пероксидази проявляють антиоксидантні властивості та можуть бути використані для зниження рівня реактивних форм кисню в зоні ушкодження тканин [29].

Рослинні екстракти та їх очищені компоненти з *Nuxia oppositifolia*, є добре відомими своїми проти діабетичними та антиоксидантними властивостями [30].

Серед ферментів рослинного походження також є важливими амілази, які каталізують гідроліз крохмалю до олігосахаридів та глюкози. Вони широко представлені у зернових культурах, зокрема у *Hordeum vulgare* (ячмінь) та *Triticum aestivum* (пшениця), і використовуються як допоміжні засоби для покращення травлення. Біологічне значення цих ферментів полягає у забезпеченні енергетичного обміну та підтримці метаболічного гомеостазу [31, 32].

Перевагами рослинних ферментів є їх відносна біосумісність, доступність сировини, можливість масштабного виробництва та багатовекторна біологічна дія, що поєднує протеолітичні, протизапальні та антиоксидантні ефекти.

Тварини

Ферменти тваринного походження займають важливе місце у клінічній практиці завдяки високій специфічності та фізіологічній сумісності з організмом людини. Джерелами таких ферментів є тканини ссавців, птахів, риб, а також отрути деяких тварин. Вони застосовуються у хірургії, кардіології, гастроентерології та рановій терапії [33].

Одним із найважливіших ферментів тваринного походження є панкреатин – комплекс протеаз, амілаз і ліпаз, що отримують із підшлункової залози свиней або великої рогатої худоби. Він широко застосовується при ферментній недостатності травної системи [34].

У контексті ранової терапії особливого значення набувають трипсин та хімотрипсин – серинові протеази, що каталізують гідроліз пептидних зв'язків. Вони застосовуються для ензимного очищення ран, розщеплення некротичних тканин і зменшення запального набряку. Завдяки контрольованій протеолітичній активності ці ферменти сприяють формуванню грануляційної тканини та прискоренню епітелізації [35].

Гіалуронідаза тваринного походження використовується для підвищення проникності тканин та покращення розподілу лікарських засобів. Вона розщеплює гіалуронову кислоту позаклітинного матриксу, що забезпечує кращу дифузію активних компонентів у тканини.

Еластаза – протеолітичний фермент, який каталізує гідроліз еластину та інших білків сполучної тканини. Вона бере участь у процесах ремоделювання тканин і може використовуватися для очищення ран від пошкоджених структур, сприяючи оновленню позаклітинного матриксу [36].

Окрему групу становлять ферменти, виділені з отрут тварин, зокрема змій. Деякі фосфоліпази, протеази та гіалуронідази з отрути змій демонструють фібринолітичні та протизапальні властивості й досліджуються як потенційні джерела нових тромболітичних засобів. Такі ферменти здатні впливати на систему гемостазу, модулювати згортання крові та розчиняти фібринові згустки [37].

Крім того у тканинах тварин і отрутах змій міститься Фосфоліпаза А₂, яка каталізує гідроліз фосфоліпідів мембран. Цей фермент має складну біологічну дію, включаючи участь у запальних реакціях, а також потенційну антимікробну активність. Деякі його модифіковані форми досліджуються як протизапальні агенти.

Серед ферментів тваринного походження також важливу роль відіграє лізоцим, який міститься у сльозах, слині, молоці та яєчному білку. Він руйнує пептидоглікан клітинної стінки бактерій і має виражену антимікробну активність. У складі ранових покриттів лізоцим може забезпечувати додатковий антисептичний ефект.

Лактаза (β -галактозидаза), що продукується клітинами тонкого кишечника ссавців. Вона забезпечує гідроліз лактози до глюкози та галактози. Біологічне значення цього ферменту пов'язане з процесами травлення, однак його також використовують у фармації для створення препаратів при лактазній недостатності [38].

Перевагами ферментів тваринного походження є їх висока специфічність, фізіологічна активність та добре вивчені механізми дії. Водночас до недоліків можна віднести ризик імуногенності та складність стандартизації сировини. Ці проблеми частково вирішуються шляхом отримання рекомбінантних аналогів тваринних ферментів, що поєднують біологічну ефективність із підвищеним рівнем безпеки.

1.2. Терапевтичний потенціал ензимів

Терапевтичний потенціал ензимів є надзвичайно широким завдяки різноманіттю їхньої біологічної активності та високій специфічності дії. Ферментні біотерапії застосовуються для лікування різних патологічних станів. Вони охоплюють як замісну ферментну терапію, так і використання ферментів у процесах загоєння ран, регуляції згортання крові (як коагулянтів і антикоагулянтів), у протипухлинній терапії, для підвищення проникності тканин, детоксикації, а також як антибактеріальні, антипаразитарні та протизапальні засоби. Такий спектр застосувань зумовлений здатністю ферментів селективно впливати на конкретні субстрати, коригуючи порушені біохімічні процеси в організмі [39].

Велику частку серед схвалених терапевтичних ферментів становлять препарати, спрямовані на компенсацію дефіцитів метаболічних і травних ферментів. Більшість замісних ферментів є рекомбінантними аналогами людських білків, тому не потребують створення нової функціональної активності, а лише відновлюють відсутню або знижену ензиматичну функцію. Прикладом є ідурсульфатаза, що застосовується при порушеннях лізосомного накопичення. Після введення вона потрапляє в клітини шляхом ендоситозу, опосередкованого манозо-6-фосфатними рецепторами. Далі ендосома зливається з лізосомою, де фермент розщеплює накопичений субстрат, відновлюючи нормальний внутрішньоклітинний метаболізм. Крім

того, ризик розвитку гіперчутливості при застосуванні таких препаратів загалом нижчий, хоча ступінь імунної відповіді залежить від генетичних особливостей пацієнта. У разі повної відсутності ферменту ймовірність імунної реакції є вищою, тоді як при частковій активності або менш тяжких мутаціях переносимість терапії зазвичай краща [39].

Окрему групу становлять травні ферменти, які реалізують свою дію в просвіті шлунково-кишкового тракту. Зокрема, сакросидаза застосовується для покращення всмоктування в тонкому кишківнику. Вона гідролізує сахарозу до глюкози та фруктози, що сприяє ефективнішому всмоктуванню моносахаридів і зменшує їх бактеріальну ферментацію в кишківнику. Локальний механізм дії таких препаратів знижує ризик системної імуногенності порівняно з парентерально введеними ферментами.

Ферментні біотерапії, що застосовуються для контролю згортання крові, поділяються на коагуляційні препарати та тромболітичні засоби. Коагуляційні ферменти використовують системно для компенсації дефіциту факторів згортання при гемофілії або локально – для зупинки хірургічної кровотечі. У клінічній практиці застосовують тромбін, який активує коагуляційний каскад у місці ушкодження. Препарати тромбіну отримують із людської плазми, плазми великої рогатої худоби або шляхом рекомбінантного синтезу. Рекомбінантний тромбін людини є безпечнішим, оскільки препарати плазмового походження пов'язані з ризиком вірусної передачі, а бичачий тромбін частіше викликає утворення антитіл, що можуть перехресно реагувати з тромбіном людини та фактором V і спричинити подовження часу згортання.

Терапія ферментами згортання крові базується на чітких біохімічних механізмах. Ферменти згортання можуть безпосередньо каталізувати утворення тромбу, як у випадку тромбіну, який перетворює розчинний фібриноген на нерозчинний фібрин, що полімеризується з формуванням каркасу навколо еритроцитів. Тромбін також активує зимогенні протеази, зокрема фактор XIII; активований фактор XIIIa стабілізує фібринову мережу

шляхом поперечного зшивання волокон, що забезпечує формування стійкого згустка [39].

Тромболітичні ферментні терапії застосовують для розчинення тромбів при інфаркті міокарда, тромбоемболії та ішемічному інсульті. Ключову роль відіграє активатор тканинного плазміногену, який перетворює плазміноген на плазмін. Плазмін протеолізує фібрин до продуктів деградації, що призводить до руйнування тромбу (тромболізу). Серед ферментів, що застосовувалися клінічно, – стрептокіназа, стафілокіназа, урокіназа та активатор тканинного плазміногену, однак саме останній та його модифіковані форми мають регуляторне схвалення [40].

Антинеопластичні ферменти застосовуються для цілеспрямованого впливу на метаболізм пухлинних клітин і їх мікрооточення. Найвідомішим прикладом є L-аспарагіназа, яка гідролізує циркулюючий аспарагін, позбавляючи ауксотрофні пухлини (зокрема при гострому лімфобластному лейкозі) необхідного субстрату. Дефіцит аспарагіну пригнічує сигнальний шлях mTORC1, знижує синтез білка та індукує аутофагію. ПЕГільовані форми підвищують ефективність і тривалість дії, однак мікробне походження препарату зумовлює ризик імуногенності. Аналогічні стратегії розробляються для виснаження аргініну, метіоніну та інших амінокислот із використанням як мікробних, так і інженерованих людських ферментів із покращеними кінетичними характеристиками [6, 39].

Іншим підходом є антитіло-орієнтована ферментна промедикаментозна терапія, за якої фермент, кон'югований із пухлиноспецифічним антитілом, локалізується в пухлині та перетворює введений пропрепарат на цитотоксичну сполуку безпосередньо в осередку новоутворення. Це підвищує селективність і зменшує системну токсичність, хоча обмежується імуногенністю бактеріальних ферментів та необхідністю оптимізації їх афінності.

Крім того, ферменти, такі як гіалуронідаза, руйнують надлишковий гіалуронан у позаклітинному матриксі пухлин, знижують інтерстиціальний тиск і покращують проникнення хіміотерапевтичних препаратів [41].

Ферментні біотерапії демонструють значний потенціал як антибактеріальні та антипаразитичні засоби, хоча наразі більшість із них перебувають на доклінічних або ранніх клінічних етапах (винятком є дезоксирибонуклеаза як антибактеріальний ад'ювант). В умовах зростання антибіотикорезистентності ферменти розглядаються як перспективна альтернатива традиційним антимікробним препаратам завдяки високій специфічності та новим механізмам дії [42].

Одним із підходів є деполімеризація капсульних компонентів бактерій, які забезпечують захист від імунної відповіді. Капсульні деполімерази розщеплюють полісахаридні структури, підвищуючи чутливість патогенів до фагоцитозу. Зокрема, фермент капсульна деполімераза гідролізує γ -глутамілові зв'язки в капсулі *Bacillus anthracis*, що сприяє зниженню вірулентності та підвищенню виживаності інфікованих [39].

Іншим перспективним напрямом є використання бактеріофагових ендолізинів, які гідролізують пептидоглікан клітинної стінки бактерій і викликають швидкий бактеріальний лізис. Ендолізени поєднують каталізаторний домен і домен зв'язування клітинної стінки, що забезпечує високу специфічність і швидкість дії. Водночас їх обмеженнями залишаються вузький спектр активності, недостатня проникність через зовнішню мембрану грамнегативних бактерій та короткий період напіврозпаду. Для подолання цих проблем застосовують білкову інженерію, зокрема створення химерних ферментів, злиття з мембранопроникними пептидами або Fc-фрагментами для підвищення стабільності.

Антипаразитичні властивості притаманні також рослинним протеазам, таким як папаїн, фіцін, бромелаїн і хімопапаїн. Вони проявляють активність проти нематод і здатні зберігати функціональність в умовах шлункової кислотності.

Ензими як терапевтичні молекули мають потенціал діяти на ключові ланки запального процесу, пропонуючи механізми, відмінні від традиційних нестероїдних протизапальних препаратів та стероїдів. На відміну від цих класичних засобів, ензими можуть безпосередньо впливати на сигнальні шляхи, каталізувати розщеплення медіаторів запалення та сприяти очищенню вогнищ запалення, при цьому не завжди супроводжуючись характерними для нестероїдних протизапальних препаратів побічними ефектами [43].

До природних протизапальних ензимів належать різні протеолітичні ферменти, такі як папаїн і серратіопептидаза. Папаїн, рослинний фермент, здатний розщеплювати білкові компоненти запального вогнища та модулювати активність цитокінових сигнальних шляхів, що може зменшувати вираженість запальної реакції [23]. Серратіопептидаза, фермент бактеріального походження, продемонструвала здатність впливати на активність циклооксигенази та інші запальні механізми, сприяючи зниженню утворення прозапальних медіаторів і підтримці нормального функціонального стану тканин. Інші ферменти, такі як колагеназа, можуть бути корисними для розщеплення компонентів екстрацелюлярного матриксу в ділянках хронічного запалення, що сприяє ремодельованню тканин [39, 43].

Молекулярні механізми протизапальної дії ензимів різноманітні: вони можуть впливати на транскрипційні фактори, що регулюють синтез прозапальних білків, сприяти гідролізу активних форм кисню, а також модулювати поведінку клітин імунної системи. Завдяки високій специфічності ферменти здатні здійснювати цілеспрямовану дію без широкого спектра неспецифічних ефектів, характерних для деяких синтетичних препаратів. Інженерні та біофармацевтичні підходи до розробки нових форм ензимів, включно з підвищенням їх стабільності і зниженням імуногенності, розширюють можливості їхнього застосування в лікуванні запальних захворювань.

Ензимні протизапальні засоби також розглядаються як перспективні компоненти комбінованих терапій, де вони можуть доповнювати традиційні препарати, посилюючи їх ефективність та зменшуючи потребу в високих дозах стероїдів або нестероїдних засобів, що часто асоціюються з побічними явищами. Такий підхід відкриває шлях для розвитку більш безпечних і ефективних стратегій лікування гострих і хронічних запальних станів, особливо у пацієнтів із високим ризиком побічних реакцій на стандартні протизапальні ліки.

1.3. Механізм загоєння ран та роль ензимів у процесах регенерації шкіри

Загоєння ран – це складний біологічний процес, який передбачає взаємодію різних клітин, факторів росту та ферментів для відновлення пошкодженої тканини. Процес загоєння шкірної рани є послідовним і динамічним та включає чотири взаємопов'язані фази (рис. 1.1). Кожна з цих фаз характеризується специфічними клітинними та молекулярними механізмами, що забезпечують очищення рани, формування нової тканини та її подальше ремоделювання. Важливу роль у цих процесах відіграють сигнальні молекули, зокрема цитокіни та фактори росту, які регулюють проліферацію, міграцію та диференціацію клітин. Крім того, ефективність загоєння залежить від загального стану організму, наявності інфекції та умов мікросередовища рани, що може значно впливати на швидкість і якість регенерації тканин.

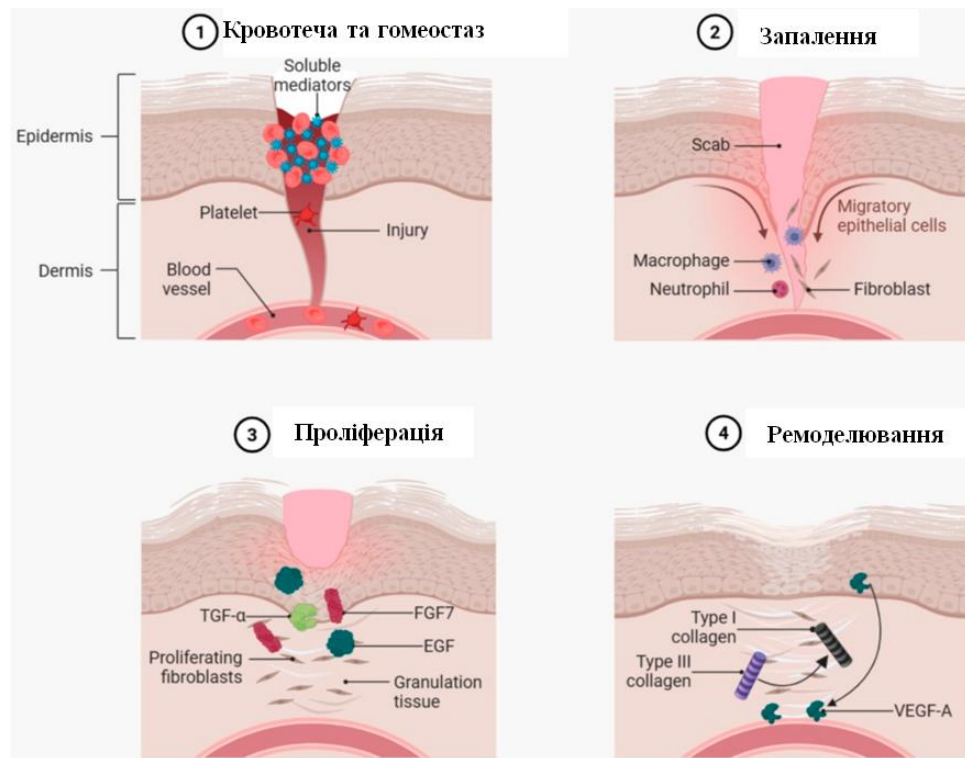


Рис. 1.1. Схематичне зображення етапів загоєння рани [44]

Першою є фаза гемостазу або утворення згустку, яка ініціюється одразу після ушкодження тканини. Активація тромбоцитів призводить до формування фібринового згустку, що не лише зупиняє кровотечу, а й створює тимчасову матрицю для клітинної міграції. У цей період вивільняються біологічно активні медіатори, зокрема трансформуючий фактор росту β (TGF- β), фактор росту тромбоцитарного походження (PDGF), стромальний клітинний фактор 1 (SDF-1/CXCL12) та судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), які координують подальші етапи регенерації [44].

Другою фазою є запалення. Пошкодження тканин супроводжується вивільненням молекулярних патернів, асоційованих із патогенами, та молекулярних сигналів ушкодження, таких як HMGB1, гіалуронова кислота та АТФ. Ці молекули активують рецептори розпізнавання образів (PRR), включаючи Toll-подібні рецептори, RIG-I-подібні рецептори та цитоплазматичні ДНК-сенсори. Активація PRR запускає внутрішньоклітинні

сигнальні каскади, що призводять до продукції прозапальних цитокінів і рекрутування нейтрофілів та макрофагів, які забезпечують очищення рани від патогенів і клітинного детриту [44,45].

Третя фаза – проліферація – характеризується активною клітинною міграцією та утворенням нової тканини. Фактори росту, зокрема FGF, епідермальний фактор росту (EGF) та TGF- α , що секретуються фібробластами, тромбоцитами та інфільтруючими макрофагами, стимулюють проліферацію кератиноцитів, фібробластів і ендотеліальних клітин. У цей період формується грануляційна тканина, синтезуються компоненти позаклітинного матриксу та відбувається реепітелізація поверхні рани.

Завершальною є фаза ремоделювання та ангиогенезу. У ній відбувається перебудова новоутвореного матриксу, заміна колагену III типу на більш міцний колаген I типу та підвищення механічної міцності тканини. VEGF-A, який секретується епітеліальними клітинами краю рани та макрофагами, стимулює утворення нових кровоносних судин, забезпечуючи адекватне кровопостачання та киснєве живлення регенеруючої тканини. Узгоджена взаємодія клітинних і молекулярних механізмів на всіх етапах визначає ефективність загоєння та відновлення функціональної цілісності шкіри.

В сучасних дослідженнях значну увагу приділяють протеолітичним ферментам, здатним контролювано деградувати компоненти позаклітинного матриксу, активувати фактори росту та модулювати запальні реакції. Ключову регуляторну роль у цьому процесі відіграють матриксні металопротейнази (ММР) – цинк-залежні ендопептидази, що здійснюють контрольовану деградацію матриксу та регулюють клітинну міграцію, проліферацію і тканинну перебудову.

У геномі людини описано 25 ММР, з яких щонайменше 11 беруть участь у ремоделюванні шкіри. Колагенази (ММР-1, ММР-8, ММР-13) розщеплюють нативний колаген I-III типів і сприяють реепітелізації. Гелатинази ММР-2 і ММР-9 деградують колаген IV типу та ламінін, полегшуючи міграцію кератиноцитів і регулюючи ангиогенез. Стромелізини

активують про-MMP і беруть участь у скороченні рани, а мембранозв'язана MMP-14 активує про-MMP-2 та підтримує проліферацію епітеліальних клітин. Водночас надмірна активність MMP призводить до деградації новоутвореного матриксу та формування хронічних ран [39].

Також значний вплив на процеси регенерації мають серинові протеази, зокрема плазмін. Плазмін утворюється з плазміногену під дією активаторів плазміногену і бере участь у деградації фібринового згустку, що є необхідним для переходу від фази гемостазу до проліферації. Крім того, плазмін здатний активувати деякі про-MMP, тим самим опосередковано регулюючи ремоделювання матриксу. Надмірна або недостатня активність цієї системи може негативно впливати на швидкість загоєння та якість відновленої тканини [46].

Важливим терапевтичним підходом є ензимний дебридмент – ферментативне видалення некротичної тканини з ложа рани. Бактеріальні колагенази, серинові та цистеїнові протеази селективно розщеплюють денатурований колаген, що перешкоджає міграції клітин і сприяє бактеріальній колонізації. Такий дебридмент не лише відновлює матриксний каркас для реепітелізації, але й знижує рівень прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β) та підвищує продукцію протизапальних медіаторів (IL-10, TGF- β), сприяючи переходу до проліферативної фази.

Дезоксирибонуклеаза додатково зменшує в'язкість ранового ексудату шляхом деградації позаклітинної ДНК, що покращує проникнення антибіотиків і знижує бактеріальне навантаження. У сукупності ензимні підходи забезпечують контрольоване ремоделювання тканин і створюють сприятливі умови для повноцінної регенерації шкіри.

Суттєве значення у процесах регенерації мають також антиоксидантні ферменти, такі як супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза. У зоні ушкодження тканин відбувається інтенсивне утворення реактивних форм кисню, які, з одного боку, виконують сигнальну та антимікробну функцію, а з іншого — при надлишку спричиняють ушкодження клітинних

мембран, білків та ДНК. Антиоксидантні ферменти забезпечують нейтралізацію надлишкових вільних радикалів, тим самим зменшуючи оксидативний стрес і сприяючи збереженню функціональної активності клітин, що беруть участь у загоєнні.

Окремої уваги заслуговує роль ферментів у регуляції клітинної міграції та ангиогенезу. Протеолітичні ферменти забезпечують деградацію базальної мембрани та міжклітинного матриксу, що створює умови для міграції кератиноцитів і ендотеліальних клітин у зону ушкодження. Одночасно відбувається активація факторів росту, зв'язаних із матриксом, що додатково стимулює проліферацію клітин та утворення нових кровоносних судин. Ці процеси є ключовими для формування повноцінної грануляційної тканини та відновлення трофіки ушкодженої ділянки [47].

У сучасній біомедицині значну увагу приділяють розробці ферментних композицій із контрольованою дією, які поєднують декілька механізмів впливу на рановий процес. Поєднання протеаз із антиоксидантними ферментами або ферментами, що руйнують біоплівки, дозволяє одночасно здійснювати очищення рани, зменшення мікробного навантаження та стимуляцію регенерації. Використання таких мультикомпонентних систем є перспективним напрямом у лікуванні хронічних і складних ран, оскільки дозволяє впливати на різні патогенетичні ланки ранового процесу.

Таким чином, ферменти відіграють ключову роль на всіх етапах загоєння ран — від початкового очищення ушкодженої ділянки до формування зрілої тканини. Їх здатність регулювати запальні реакції, ремоделювання матриксу та клітинну проліферацію визначає перспективність використання ензимних композицій як ефективних засобів сучасної ранової терапії [47].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви та матеріали

У роботі було використано наступні реактиви: цитрат натрію; трис (гідроксиметил) амінометан (трис); трітон X-100; маркери молекулярної маси білків для електрофорезу (Fermentas, Литва); Q-сефароза (Amersham Biosciences, Швеція). Казеїн, інгібітор трипсину сої, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), колаген типу I, нінгідрин та реагенти для електрофорезу (поліакриламід, додецилсульфат натрію, кумасі, колаген, фібриноген, желатин) були придбані у Sigma-Aldrich (США). Всі інші реактивів: NaCl, етанол, оцтова кислота, CaCl₂ та трихлороцтова кислота були вітчизняного виробництва та кваліфікації не нижче ч.д.а. та х.ч.

2.2. Отримання білок-вмісної сировини з гідробіонтів

У ході дослідження як джерело біологічно активних сполук використовували представників морської фауни антарктичного походження — морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морську зірку *Odontaster validus*. Біоматеріал був отриманий від Національного антарктичного наукового центру України.

Для збереження біохімічних властивостей тканини зберігали у замороженому стані до моменту проведення експериментів. Перед екстракцією білкових компонентів зразки піддавали механічній деструкції до пастоподібної консистенції із використанням електричного подрібнювального обладнання. До одержаної маси вносили буферний розчин, об'єм якої відповідав кількості вихідної сировини. Буфер складався з

0,05 М трис-НСl (рН 7,4), 0,13 М NaCl та 0,5 % тритон Х-100, що забезпечувало ефективну солюбілізацію мембранних і цитозольних білків.

Суміш витримували при низькій температурі (+4°C) протягом однієї години з постійним перемішуванням, що дозволяло максимально перевести білкові молекули у розчин. Після цього проводили очищення шляхом фільтрації для видалення нерозчинних залишків тканин.

Подальше розділення екстракту здійснювали центрифугуванням у два етапи. Спочатку використовували відносно низьке прискорення (100 g, 30 хв), що дозволяло осадити великі частинки. Надалі надосадову рідину піддавали високошвидкісному центрифугуванню (10000 g, 30 хв), у результаті чого отримували освітлений супернатант, збагачений розчинними білками. Саме ця фракція використовувалася як вихідна сировина отримання ензимів. До моменту її використання, вона зберігалася при -20°C.

2.3. Виділення та очищення протеолітичних ферментів

Для отримання активних ферментів використовували білоквмісний екстракт, отриманий як описано в розділі 2.2. Перед початком хроматографічного розділення зразки поступово розморожували при +4 °С та додатково очищали шляхом центрифугування (10000 g, 15 хв), що дозволяло усунути залишкові домішки.

Очищений супернатант піддавали мембранній фільтрації через фільтри з діаметром пор 0,45 мкм з метою видалення мікрочастинок, які могли б впливати на ефективність подальшого розділення.

Для попередньої підготовки білкового матеріалу застосовували гель-фільтрацію, яка забезпечує розділення компонентів за молекулярною масою. Використання носія типу Sephadex G-25 дозволило усунути низькомолекулярні сполуки, включаючи солі та інші супутні речовини, що могли б вплинути на хроматографічні процеси.

Ключовим етапом виділення ферментних компонентів була іонообмінна хроматографія. Для цього застосовували аніонообмінний сорбент Q-сефарозу, яка забезпечує розділення білків залежно від їх заряду. Підготовлені зразки наносили на колонку, попередньо врівноважену буферним розчином (0,01 М трис-НСІ, рН 9,0).

Після завантаження проби проводили відмивання незв'язаних білків тим самим буфером. Фракції, що взаємодіяли з носієм, елюювали шляхом підвищення концентрації хлориду натрію (до 0,5–1,0 М), що дозволяло поступово елюювати білки залежно від сили їх електростатичної взаємодії з матрицею.

Усі етапи хроматографії здійснювали при постійній швидкості потоку 2 мл/хв. Отримані елюати збирали послідовно, після чого проводили контроль наявності білка шляхом вимірювання оптичної густини при 280 нм. Фракції, що містили білкові компоненти, використовували для подальшого аналізу протеолітичної активності та зберігали у замороженому стані.

2.4. Дослідження протеолітичної активності ферментних фракцій методом зимографії

Оцінку наявності активних протеїназ у складі елюйованих фракцій здійснювали методом зимографії у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію. Особливістю підходу було включення білкового субстрату безпосередньо до матриці гелю, що давало змогу виявляти ферментативну активність після електрофоретичного розділення.

Як субстратні компоненти використовували желатин, колаген або фібриноген у концентрації 2 мг/мл. Вміст акриламід у розділяючому гелі варіювали залежно від типу білка-субстрату: для желатину та фібриногену застосовували 12 % гель, тоді як для колагену – 15 %, що забезпечувало

оптимальне розділення та обмежувало дифузію субстрату в полімерній матриці.

Електрофоретичне розділення проводили у стандартній трис-гліциновій буферній системі (рН 8,3). Для різних зон гелю встановлювали окремі режими: 19 мА – для концентруючого гелю та 36 мА – для розділяючого. Після завершення електрофорезу гелі піддавали обробці розчином трітон Х-100 (2,5 %), що дозволяло видалити залишки додецилсульфату натрію та відновити нативну структуру ферментів.

Подальшу інкубацію проводили у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4) із додаванням 130 мМ NaCl протягом 12 год при температурі +37 °С. За цих умов відбувалося локальне розщеплення субстрату в ділянках, де були присутні активні ферменти.

Для проявлення зон протеолізу використовували фарбування барвником Кумасі (2,5 % розчин у суміші етанолу та оцтової кислоти). Після знебарвлення на темному фоні чітко ідентифікували світлі ділянки, що відповідали зонам гідролізу білка-субстрата. Як орієнтири для оцінки молекулярної маси застосовували трипсин та плазмін разом із його фрагментами. Кількісну та напівкількісну обробку отриманих електрофореграм виконували із використанням програмного забезпечення TotalLab.

2.5. Визначення загальної колагенолітичної активності фракцій ензимів

Здатність ферментних фракцій до деградації колагену визначали за інтенсивністю утворення продуктів гідролізу, що містять вільні аміногрупи. Реакцію проводили у буферній системі (0,05 М трис-НСІ, рН 7,8) у присутності іонів кальцію (2 мМ CaCl₂), які стабілізують активність ряду протеїназ.

До реакційної суміші вносили 0,1 % колаген і певний об'єм досліджуваного білка (еквівалент 50 мкг). Інкубацію здійснювали при +37 °С протягом 5 год, що забезпечувало достатній ступінь гідролізу субстрату.

Після завершення реакції її зупиняли термічним способом (нагрівання до +95 °С протягом 5-7 хв), після чого проводили центрифугування для відділення нерозчинних компонентів. Надосадову рідину використовували для подальшого аналізу.

Вміст продуктів гідролізу (вільних амінокислот та пептидів) оцінювали за допомогою нінгідринового реагенту. Для цього до проб додавали 4 % розчин нінгідрину в цитратному буфері (рН 5,0) та проводили нагрівання на водяній бані до формування інтенсивного фіолетового забарвлення. Після охолодження вимірювали оптичну густину при 570 нм. Розрахунок активності здійснювали з використанням калібрувальної кривої, побудованої з використанням лейцину.

2.6. Визначення загальної протеолітичної активності та інгібіторного профілю

Для оцінки сумарної активності протеїназ використовували казеїн як універсальний субстрат. Реакційну суміш готували на основі 1 % розчину казеїну у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4) та інкубували з досліджуваними фракціями при +37 °С протягом 30 хв.

Ферментативний процес припиняли додаванням трихлороцтової кислоти до кінцевої концентрації 15 %, що призводило до осадження білка. Після центрифугування (10000 g, 30 хв) вимірювали оптичну густину супернатанту при 280 та 320 нм. Різниця між цими значеннями використовувалася для розрахунку активності.

Активність виражали за формулою:

$$\text{К. од.} \times \text{мг}_{\text{білка}}^{-1} = E \times \frac{a}{b}, \quad (2.1)$$

де E – різниця оптичної густини ($E_{280} - E_{320}$);

a – коефіцієнт 1,3;

b – вміст білка у пробі, мг.

Для встановлення природи ферментів застосовували селективні інгібітори. Соєвий інгібітор трипсину (1 мг/мл) використовували для блокування серинових протеїназ, тоді як ЕДТА (10 мМ) – для інактивації металозалежних ферментів шляхом зв'язування іонів металів. Результати виражали у відсотках пригнічення активності відносно контролю.

2.7. Визначення концентрації білка у зразках

Кількісну оцінку білкових компонентів у досліджуваних зразках проводили із застосуванням колориметричного підходу, що ґрунтується на взаємодії барвника Кумасі з білковими молекулами. Метод базується на зміні спектральних характеристик барвника при його зв'язуванні з білками: максимум поглинання зміщується з області 465 нм у бік 595 нм, що дозволяє реєструвати утворений комплекс спектрофотометрично.

Для аналізу до 10 мкл досліджуваного зразка додавали 190 мкл реактиву Бредфорда, після чого суміш ретельно перемішували. У якості контрольної проби використовували дистильовану воду, яку вносили замість біологічного матеріалу в аналогічному об'ємі.

Через короткий проміжок часу (2–5 хв), необхідний для стабілізації кольорової реакції, проводили вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 595 нм. Концентрацію білка визначали шляхом порівняння отриманих

значень із калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів бичачого сироваткового альбуміну, і виражали у мг/мл.

2.8. Оцінка ранозагоювального ефекту ензимних композицій гідробіонтів на моделі гнійно-некротичної рани у щурів

Експериментальна частина роботи, виконувалася з дотриманням міжнародних і національних норм біоетики, що регламентують використання лабораторних тварин у наукових дослідженнях. Усі процедури відповідали положенням європейських нормативних документів і були погоджені з профільною комісією з біоетики.

Дослідження проводили на статевозрілих білих щурах-самцях нелінійної популяції масою 200–250 г. Перед початком експерименту тварини проходили період адаптації в стандартних умовах віварію, після чого оцінювали їхній фізіологічний стан та проводили контрольне зважування.

Інвазивні маніпуляції здійснювали із застосуванням загального знеболення – ксилазин гідрохлорид вводили внутрішньоочеревинно з розрахунку 20 мг/кг маси тіла. Упродовж експерименту тварини утримувалися в контрольованих умовах із вільним доступом до води та корму.

Модель ураження формували шляхом локального введення 0,1 мл 10 % розчину хлориду кальцію у ділянку спини. Це спричиняло розвиток некротичного процесу, подібного за морфологічними ознаками до гнійно-некротичних ран. Для забезпечення відтворюваності експерименту площу ураження обмежували значенням до 400 мм².

Через 4–5 діб після індукції патологічного процесу проводили видалення некротизованих тканин, після чого розпочинали лікувальний етап.

Тварин розподіляли на експериментальні групи. У дослідних групах застосовували місцеве лікування за допомогою спеціально підготовлених

ферментних композицій, тоді як контрольні тварини не отримували терапії (Контроль).

Для створення лікарської форми використовували гелеву основу на базі 0,6 % карбополу, до якої додавали очищені ферментні фракції, отримані з тканин морського їжака *Sterechinus neumayeri* (Композиція №1) та морської зірки *Odontaster validus* (Композиція №2). Препарат наносили на ранову поверхню щоденно протягом усього періоду спостереження.

Ефективність лікування оцінювали за динамікою зменшення площі рани. Вимірювання проводили через визначені часові інтервали за допомогою прозорого шаблону з міліметровою розміткою. Спостереження тривали до повного відновлення тканин і завершення процесу епітелізації.

З метою аналізу морфофункціональних змін тварин виводили з експерименту на різних етапах перебігу ранового процесу.

2.9. Статистична обробка експериментальних даних

Отримані у процесі дослідження результати піддавали статистичному аналізу з використанням сучасних програмних засобів обробки даних. Для цього застосовували пакет Statistica 10, що дозволяло виконувати як базову варіаційну обробку, так і більш поглиблений аналіз. Для кожного набору даних розраховували середні значення показників (M) та величину похибки середнього (m). З метою визначення характеру розподілу вибірок використовували критерій Шапіро–Уїлка. Подальший вибір статистичного методу залежав від відповідності даних нормальному розподілу. У випадках, коли розподіл показників відповідав нормальному, застосовували параметричний t-критерій Стюдента для оцінки достовірності відмінностей між групами. Якщо ж розподіл відрізнявся від нормального, використовували непараметричний критерій Манна–Уїтні. Статистично значущими вважали відмінності при рівні ймовірності помилки менше 5% ($p < 0,05$).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У сучасній медицині проблема лікування ранових ушкоджень залишається однією з найбільш складних і багатогранних, оскільки поєднує клінічні, фармакологічні та біотехнологічні аспекти. Порушення цілісності шкірних покривів, незалежно від їх походження – травматичного, хірургічного, інфекційного чи метаболічного – часто супроводжуються розвитком вираженої запальної реакції, пригніченням репаративних процесів і ризиком ускладнень. Особливої уваги потребують ураження, що характеризуються наявністю некротичних тканин та мікробної контамінації, оскільки саме вони найбільш часто переходять у хронічну форму та потребують тривалого і комплексного лікування [48].

Незважаючи на значний прогрес у створенні лікарських засобів, ефективність традиційних підходів до місцевої терапії ран залишається обмеженою. Багато препаратів спрямовані лише на окремі ланки ранового процесу – боротьбу з інфекцією, зменшення запалення або видалення ексудату – і не забезпечують комплексного впливу на всі етапи загоєння. Додатковою проблемою є розвиток антибіотикорезистентності, а також ризик побічних реакцій, що знижує ефективність лікування, особливо у складних клінічних випадках. Це обумовлює необхідність пошуку нових підходів, здатних поєднувати багатовекторну дію з високою біосумісністю [49].

Окреме місце серед патологічних станів займають хронічні рани, поширеність яких має тенденцію до зростання. Їх тривалий перебіг, схильність до рецидивування та часті ускладнення значно погіршують якість життя пацієнтів і створюють суттєве навантаження на систему охорони здоров'я. Важливим фактором, що ускладнює лікування таких уражень, є порушення природної динаміки ранового процесу, зокрема затримка переходу від запальної фази до стадії регенерації. В умовах сучасних

викликів, зокрема зростання кількості травматичних ушкоджень, проблема ефективної терапії інфікованих і глибоких ран набуває ще більшої актуальності [50].

Ключовою умовою успішного загоєння є своєчасне та повноцінне очищення рани від некротичних тканин. Їх наявність не лише підтримує запальний процес, а й створює сприятливе середовище для розвитку мікроорганізмів, що додатково гальмує регенерацію. Традиційні методи дебридменту, такі як хірургічне або механічне видалення нежиттєздатних тканин, хоча і широко застосовуються, мають низку недоліків – травматичність, болісність та ризик неповного очищення ранової поверхні. У зв'язку з цим зростає інтерес до альтернативних, менш інвазивних підходів.

Одним із перспективних напрямів є використання ензимної терапії, яка ґрунтується на застосуванні протеолітичних ферментів для селективного розщеплення некротичних структур. Такий підхід дозволяє більш фізіологічно впливати на тканини, сприяючи очищенню рани без додаткового механічного ушкодження. Крім того, ферменти здатні зменшувати мікробне навантаження та створювати сприятливі умови для переходу до проліферативної фази загоєння.

Серед протеолітичних ферментів особливу увагу привертають колагенолітичні ензими, які беруть участь у деградації колагену – основного структурного компонента позаклітинного матриксу. Контрольоване руйнування колагенових волокон є необхідною умовою ремоделювання тканин, оскільки забезпечує можливість клітинної міграції, формування нових судин і утворення грануляційної тканини. Водночас вивільнення біологічно активних молекул у процесі гідролізу матриксу стимулює проліферацію клітин та активує репаративні процеси [51].

Важливим аспектом є також підтримання оптимального рівня протеолітичної активності у рані. Дисбаланс між протеїназами та їх інгібіторами може призводити як до затримки загоєння, так і до формування патологічних рубців. У таких умовах застосування екзогенних ферментів

розглядається як ефективний спосіб регуляції локальних біохімічних процесів.

Разом із тим, отримання ферментів для медичного використання пов'язане з певними труднощами. Традиційні джерела, зокрема мікроорганізми або тканини наземних тварин, мають обмеження, що стосуються стабільності, безпечності та економічної доцільності. Це стимулює пошук альтернативних джерел біологічно активних сполук, серед яких значний інтерес становлять морські організми [8].

Гідробіонти, особливо ті, що мешкають у екстремальних умовах, характеризуються унікальними адаптаційними механізмами, які відображаються у властивостях їхніх ферментів. Такі ензими здатні зберігати активність у широкому діапазоні фізико-хімічних параметрів, що робить їх перспективними для застосування у біомедицині. Додатковою перевагою є можливість використання вторинної сировини морського походження, що відповідає сучасним принципам раціонального природокористування [52].

У зв'язку з цим особливу увагу було приділено дослідженню ферментних систем морських безхребетних антарктичного регіону, які потенційно можуть бути джерелом колагенолітичних ензимів із високою біологічною активністю. Вибір об'єктів дослідження був зумовлений їх адаптацією до специфічних умов існування, що може визначати унікальні властивості білкових молекул.

На початковому етапі роботи було проведено скринінг біологічного матеріалу з метою оцінки протеолітичної активності та визначення доцільності подальшого дослідження. Отримані результати дозволили обґрунтувати вибір перспективних об'єктів для виділення ферментних фракцій і подальшого їх аналізу.

З огляду на поставлену мету – отримання не індивідуального ферменту, а активної ензимної фракції – було обрано оптимізований підхід до очищення, що дозволяє мінімізувати втрати матеріалу та зберегти функціональні властивості ензимів. Саме тому було обрано скорочену

стратегію очищення, що передбачала використання лише одного ключового етапу – іонообмінної хроматографії.

Для реалізації цього підходу застосовано носій Q-сефарозу, який належить до сильних аніонообмінників. Його використання дозволяє ефективно розділяти білкові компоненти за величиною негативного заряду при фізіологічних значеннях рН, що є особливо важливим для збереження нативної структури та ферментативної активності білків морського походження. Обраний підхід спирався на попередні експериментальні напрацювання щодо оптимізації умов очищення ферментів із нетрадиційних морських джерел, що дало змогу мінімізувати втрати білка та зберегти функціональну активність ферментних комплексів.

Хроматографічний аналіз гомогенатів тканин *Odontaster validus* та *Sterechinus neumayeri* продемонстрував подібну загальну структуру елюційних профілів (рис. 3.1, 3.2).

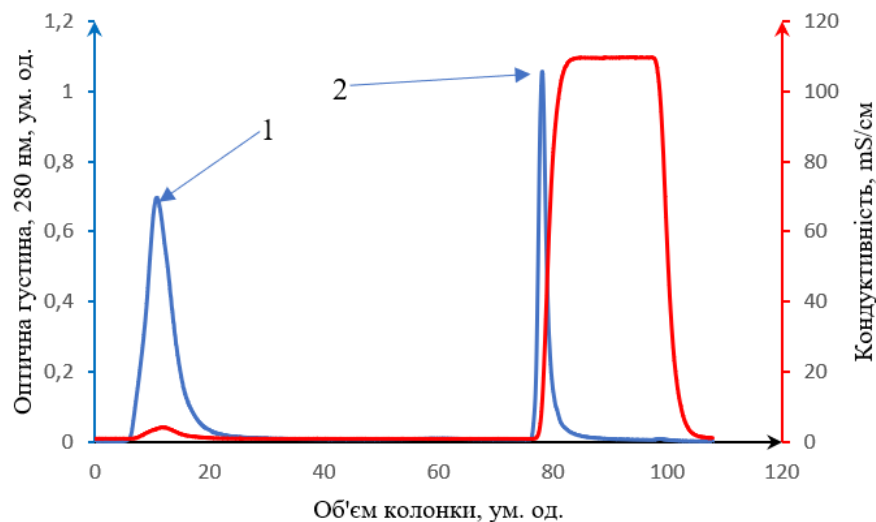


Рис. 3.1. Хроматограма розділення білок-вмісного екстракту тканин гідробіонту *O. validus* на колонці з Q-сефарозою в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 9,0; елюцію здійснювали з використанням лінійного градієнту NaCl: 1 – фракція незв'язаних білків; 2 – фракція, що ймовірно містила протеолітичні ферменти

В обох випадках спостерігалось формування двох основних піків: перший відповідав білкам, які не зв'язувалися з іонообмінним носієм, тоді як другий пік відображав фракцію зв'язаних білків, що елюювалися зі зростанням іонної сили елюенту. Саме ця фракція розглядалася як така, що містить основний пул протеолітичних ензимів.

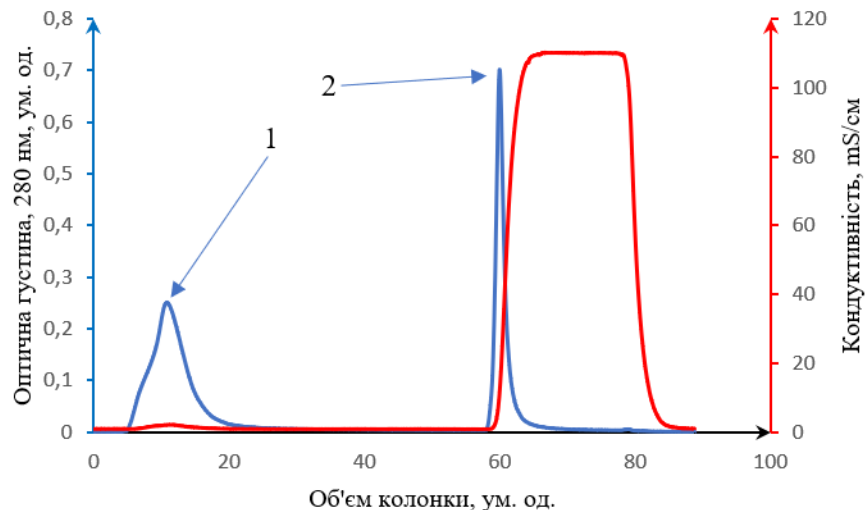


Рис. 3.2. Хроматограма розділення білок-вмісного екстракту тканин гідробіонту *S. neumayeri* на колонці з Q-сефарозою в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 9,0; елюцію здійснювали з використанням лінійного градієнту NaCl: 1 – фракція незв'язаних білків; 2 – фракція, що ймовірно містила протеолітичні ферменти

Порівняння інтенсивності елюційних піків свідчило про істотні міжвидові відмінності у вмісті білка. Для фракцій, отриманих із тканин *Odontaster validus*, було зафіксовано значно більшу оптичну щільність елюційного максимуму – 1,1 умовних одиниць (рис. 3.1), ніж у випадку *Sterechinus neumayeri* – 0,7 умовних одиниць (рис. 3.2).

Результати кількісного визначення білка методом Бредфорда підтвердили ці спостереження. Концентрація білка у фракції *Odontaster validus* становила 1,25 мг/мл, тоді як у фракції *Sterechinus neumayeri* – 0,75 мг/мл. Отже, морська зірка виявилася більш насиченим джерелом білкових

компонентів, що вже на цьому етапі вказувало на її значний біотехнологічний потенціал.

Подальша оцінка функціональних властивостей отриманих фракцій показала суттєві відмінності їх ферментативної активності (табл. 3.1). Загальна протеолітична активність, визначена за здатністю гідролізувати казеїн, була максимальною у фракції *Odontaster validus* і становила $12,50 \pm 0,52$ К.од./мг білка. У фракції *Sterechinus neumayeri* цей показник був нижчим і дорівнював $4,32 \pm 0,20$ К.од./мг білка. Водночас при оцінюванні колагенолітичної активності було встановлено, що обидві фракції характеризуються близькими значеннями, що свідчить про наявність у них ефективних ферментів, здатних руйнувати колагенові структури.

Таблиця 3.1

Показники загальної протеолітичної та колагенолітичної активності ферментних фракцій, отриманих із гідробіонтів ($M \pm m$, $n=6$)

Джерело ензимів	Загальна протеолітична активність, К.од./мг білка	Колагенолітична активність, Ум.од./мг білка
<i>Odontaster validus</i>	$12,50 \pm 0,52$	$14,2 \pm 0,65$
<i>Sterechinus neumayeri</i>	$4,32 \pm 0,20^*$	$14,6 \pm 0,57$

* $p \leq 0,05$ порівняно з показниками ензимної фракції, одержаної з *O. validus*

Співставлення кількісних та функціональних показників дозволило зробити висновок, що обидва досліджувані гідробіонти можуть розглядатися як перспективні джерела колагенолітичних ензимів, що особливо важливо для подальших біомедичних досліджень.

Продовжуючи характеристику отриманих ферментних фракцій та переходячи від загальної оцінки протеолітичної активності до аналізу їх функціональної спрямованості, наступним етапом дослідження стало встановлення здатності виявлених ензимів взаємодіяти з ключовими білковими компонентами позаклітинного матриксу. Для вирішення цього завдання було використано ензим-електрофоретичний підхід, який дозволяє одночасно визначати як молекулярні маси білків, так і їхню каталітичну активність щодо конкретних субстратів без необхідності їх повної ізоляції.

У якості модельних субстратів застосовували білки, що відображають різні структурно-функціональні стани позаклітинного матриксу – колаген, желатин та фібриноген. Такий підбір дозволив оцінити не лише загальну протеолітичну активність, але й ступінь спеціалізації ферментів щодо нативних і частково деградованих білкових структур, а також компонентів, що формуються на ранніх етапах репарації.

Аналіз отриманих електрофоретичних профілів показав, що у фракції, ізольованій з тканин *Odontaster validus*, присутній комплекс протеолітичних ензимів із вираженою активністю щодо всіх досліджуваних субстратів (рис. 3.3).

При цьому встановлено, що основна частина активних білків має молекулярну масу понад 30 кДа. Максимально інтенсивні зони гідролізу спостерігалися при використанні колагену як субстрату, що свідчить про переважання колагенолітичної активності у складі досліджуваної фракції. Водночас відсутність повного збігу зон гідролізу для колагену, желатину та фібриногену вказує на наявність декількох ферментів, які відрізняються як молекулярною масою, так і субстратною специфічністю.

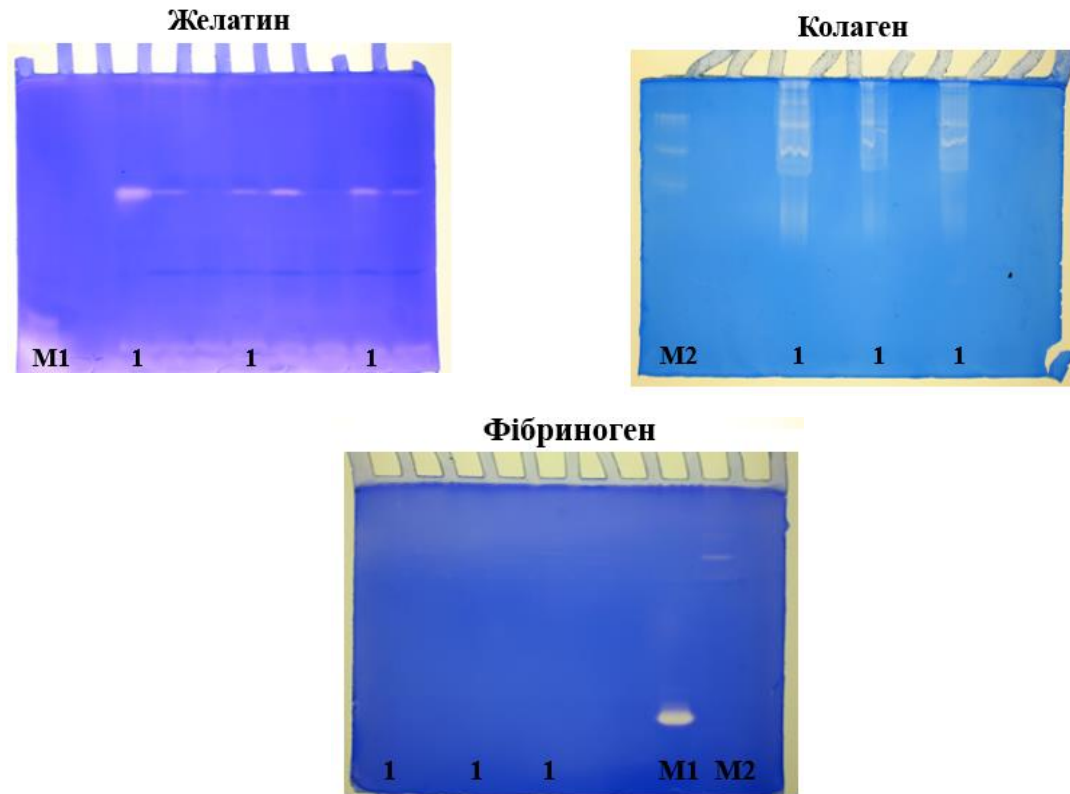


Рис. 3.3. Ензим-електрофореграми фракції, одержаної з гідробіонту *O. validus* за використання різних білкових субстратів (желатину, колагену та фібриногену): 1 – досліджувана фракція; M1 – трипсин (23 кДа); M2 – плазмін та його деградовані форми (84 кДа, 44 кДа, 36 кДа)

У фракціях, отриманих з тканин *Sterechinus neumayeri*, також було зафіксовано здатність до гідролізу всіх трьох субстратів (рис. 3.4), проте інтенсивність відповідних зон була нижчою у порівнянні з *O. validus*. Характерною особливістю цієї фракції є значно ширший діапазон молекулярних мас активних компонентів: на електрофореграмах ідентифіковано білки з молекулярною масою приблизно 20–25 кДа, а також високомолекулярні форми, що перевищують 80 кДа. Подібна варіабельність свідчить про складну багатоконпонентну організацію ферментної системи.

Важливо відзначити, що зони протеолітичної активності, виявлені при використанні різних субстратів, не співпадали між собою, що підтверджує наявність ферментів із диференційованою специфічністю. Зокрема, окремі білкові компоненти демонстрували активність переважно щодо колагену або

желатину, тоді як інші — щодо фібриногену, що вказує на функціональне розмежування ферментів у межах однієї фракції.

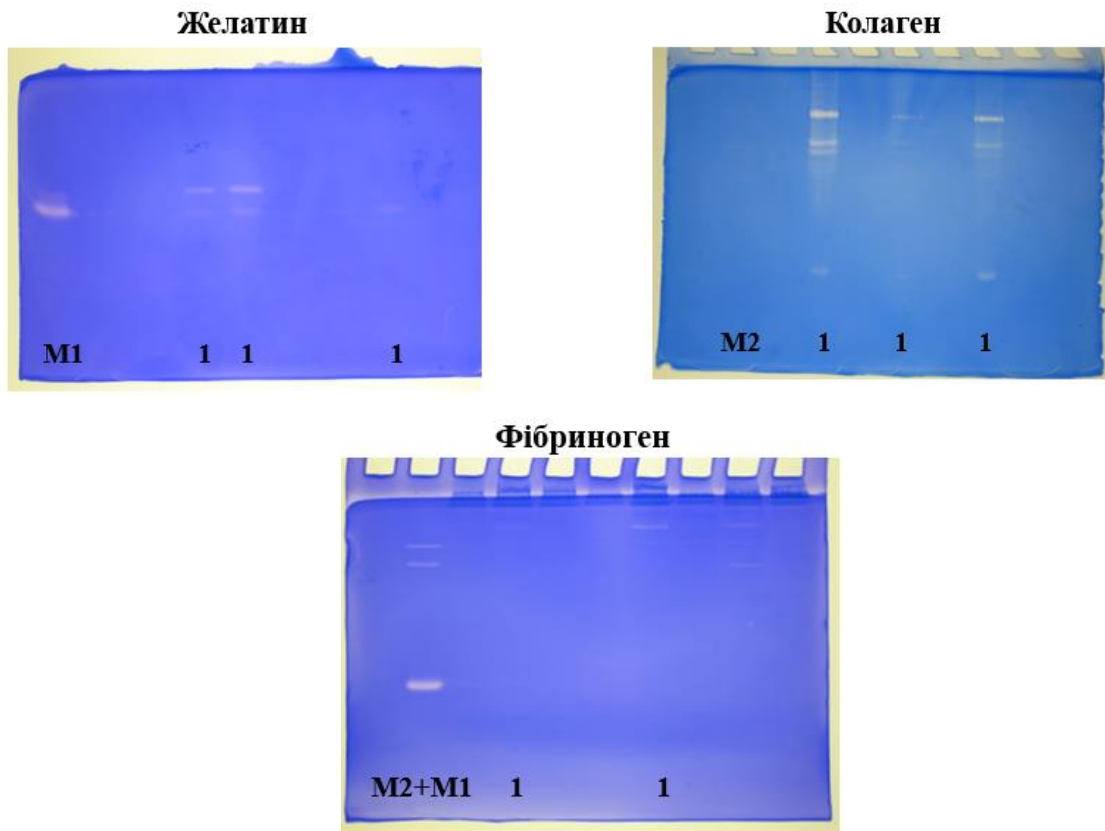


Рис. 3.4. Ензим-електрофореграми фракції, одержаної з гідробіонту *S. neitaueri* за використанням різних білкових субстратів (желатину, колагену та фібриногену): 1 – досліджувана фракція; M1 – трипсин (23 кДа); M2 – плазмін та його деградовані форми (84 кДа, 44 кДа, 36 кДа)

Важливо відзначити, що зони протеолітичної активності, виявлені при використанні різних субстратів, не співпадали між собою, що підтверджує наявність ферментів із диференційованою специфічністю. Зокрема, окремі білкові компоненти демонстрували активність переважно щодо колагену або желатину, тоді як інші – щодо фібриногену, що вказує на функціональне розмежування ферментів у межах однієї фракції.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що ферментні системи обох досліджуваних гідробіонтів характеризуються широким

спектром протеолітичної активності, однак відрізняються за рівнем її вираженості та структурною організацією. Фракція з тканин *O. validus* проявляє більш виражену колагенолітичну активність, що підтверджується інтенсивністю зон гідролізу колагену, тоді як для фракції з *S. neumayeri* характерна більша різноманітність ферментів за молекулярною масою.

Продовження дослідження протеолітичних властивостей отриманих ферментних фракцій вимагало переходу від оцінки їх субстратної специфічності до більш детального аналізу механізмів каталізу.

Ферменти, здатні до деградації колагену, належать до групи протеїназ і характеризуються складною системою біосинтезу та активації. На відміну від багатьох інших біологічно активних молекул, вони не функціонують одразу після синтезу. Первинно формуються неактивні попередники, які проходять послідовні стадії перетворень, перш ніж набувають каталітичної активності. Така організація є біологічно доцільною, оскільки дозволяє уникнути передчасного ушкодження власних тканин і забезпечує просторово-часовий контроль протеолітичних процесів.

З точки зору механізму дії, колагенолітичні ферменти не є однорідною групою. Вони відрізняються за природою активного центру, що безпосередньо визначає їх каталітичні властивості. Найбільш поширеним є поділ на серинові протеїнази та ферменти, активність яких залежить від іонів металів. У першому випадку ключову роль відіграє сериновий залишок, який ініціює розрив пептидного зв'язку. У другому – гідроліз здійснюється за участю металу, зазвичай цинку, який входить до складу активного центру та бере участь у активації молекули води.

Відмінності між цими двома типами ферментів проявляються не лише у механізмі каталізу, але й у їх біологічній ролі, походженні та регуляції активності, що узагальнено наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

**Порівняльна характеристика серинових та металозалежних
колагенолітичних ферментів за основними біохімічними параметрами
[53, 54]**

Параметр	Серинові ферменти	Металозалежні ферменти
Ключовий елемент активного центру	Сериновий залишок	Іони Zn^{2+}
Джерело походження	Переважно бактеріальні системи	Організми тварин, людини та мікроорганізми
Основна функція	Деструкція тканин при патологічних процесах	Контрольоване оновлення матриксу
Регуляція активності	Відсутність специфічних тканинних інгібіторів	Інгібування тканинними інгібіторами (TIMP)
Практичне використання	Очищення ран, ензимотерапія	Біомедичні дослідження, регенеративні технології

Для встановлення природи протеолітичної активності у досліджуваних зразках було проведено інгібіторний аналіз, який дозволяє диференціювати ферменти за механізмом дії (рис. 3.5). У досліді використовували два типи інгібіторів: соєвий інгібітор трипсину, що блокує серинові протеїнази, та ЕДТА, яка зв'язує іони металів і пригнічує активність металозалежних ферментів. Як субстрат обрано казеїн, що забезпечує оцінку сумарної протеолітичної активності.

Отримані експериментальні дані виявили суттєві відмінності між досліджуваними об'єктами. У фракції, виділеній з *Odontaster validus*,

домінуючим компонентом виявилися металозалежні ферменти. Це підтверджується значним зниженням активності – на 67% – після додавання ЕДТА. Водночас застосування інгібітора серинових протеїназ призводило до менш вираженого ефекту – близько 30% зниження активності, що свідчить про другорядну, але наявну роль цього класу ферментів.

Інша картина спостерігалася у фракції, отриманій з *Stereochinus neumayeri*. У цьому випадку пригнічення активності під дією соєвого інгібітора досягало 44%, що вказує на суттєвий внесок серинових протеїназ. Водночас ЕДТА знижувала активність лише на 34%, що свідчить про відсутність явного домінування одного типу ферментів і вказує на більш рівномірний розподіл між ними.

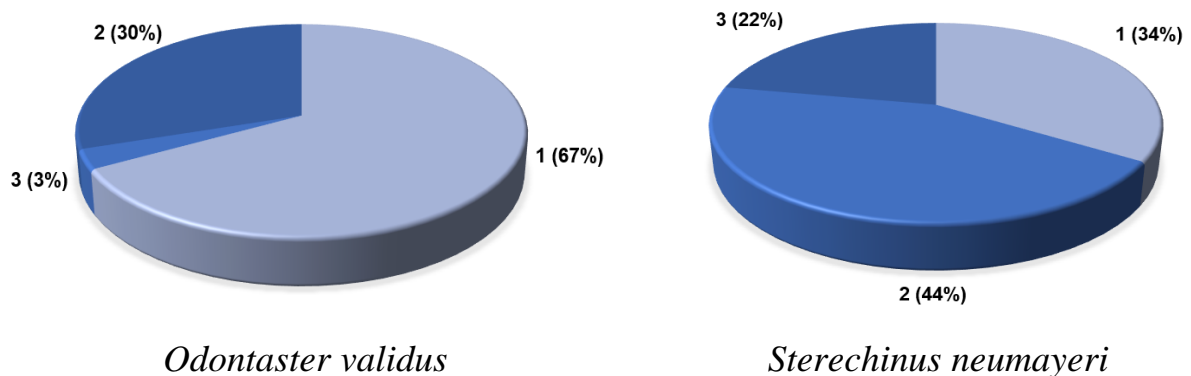


Рис. 3.5. Внесок ферментів з різною будовою активного центру у загальну протеолітичну активність: 1 – металозалежні ферменти; 2 – серинові протеїнази; 3 – аспартильні та серинові протеїнази

Таким чином, результати дослідження демонструють принципово різну організацію протеолітичних систем у досліджуваних гідробіонтів. Для *Odontaster validus* характерна орієнтація на металозалежний механізм каталізу, тоді як *Stereochinus neumayeri* формує змішаний ферментний комплекс.

З практичної точки зору це має суттєве значення. Металопроteaseи, незважаючи на високу ефективність у деградації компонентів позаклітинного

матриксу, у біологічних умовах підлягають жорсткому контролю з боку тканинних інгібіторів, що може обмежувати їх активність. Натомість серинові протеїнази менш залежні від таких механізмів регуляції, що потенційно робить їх більш ефективними у процесах швидкого очищення тканин від некротичних мас.

Отже, виявлена комбінація різних типів ферментів, особливо у випадку *Sterechninus neumayeri*, може розглядатися як сприятливий фактор для створення багатокомпонентних ензимних препаратів. Поєднання різних механізмів каталізу здатне забезпечити більш повне та ефективне розщеплення білкових структур у рановому мікрооточенні, що є важливим для розробки сучасних засобів ензимотерапії.

Отримані на попередніх етапах дані щодо ферментативної активності, субстратної специфічності та інгібіторного профілю очищених фракцій створили передумови для перевірки їх прикладного потенціалу *in vivo*. Наступним логічним кроком стало дослідження впливу створених ферментних композицій на перебіг репаративних процесів у моделі гнійно-некротичних ран у лабораторних тварин. Такий підхід дозволяє перейти від біохімічної характеристики ферментів до оцінки їх реальної терапевтичної ефективності в умовах живого організму.

Основним критерієм ефективності було обрано швидкість скорочення площі ранової поверхні. Для підвищення об'єктивності оцінювання використовували подвійний підхід: регулярне планіметричне вимірювання площі ушкодження та фотодокументацію динаміки загоєння протягом усього експериментального періоду. Поєднання кількісних і візуальних методів спостереження дало змогу більш повно охарактеризувати перебіг усіх фаз ранового процесу – від очищення до остаточного ремоделювання тканин.

Аналіз динаміки скорочення площі ран свідчить про чіткий позитивний вплив досліджуваних композицій на перебіг репаративного процесу. Уже на третю добу після початку лікування у тварин дослідних груп спостерігалось помітніше зменшення площі ураження, що вказує на швидший початок

очищення рани та зниження інтенсивності запальної реакції. Подальші терміни спостереження продемонстрували поступове наростання відмінностей між контрольними та експериментальними групами, які набули статистично значущого характеру.

Таблиця 3.3

Площі (мм²) гнійно-некротичних ран у динаміці загоєння гнійно-некротичної рани, відтвореної у щурів та на тлі застосуванні ферментних композицій (M ± SD, n = 5)

Доба	Контроль	Композиція №1 (<i>Stereichinus neumayeri</i>)	Композиція №2 (<i>Odontaster validus</i>)
0	137,4±11,43	117,0±10,21	138,8±12,56
3	120,8±12,96	90,6±11,52	104,0±12,8
6	92,6±4,13	72,8±3,47*	58,0±2,22*
9	62,6±3,76	44,0±2,34*	31,2±1,46*
14	38,8±1,62	15,6±1,34*	13,6±0,86*
21	5,4±0,68	4,4±0,42	0,6±0,05*
24	0,6±0,05	0,4±0,05*	0,2±0,01*

* $p \leq 0,05$ – різниця статистично значуща, порівняно з контрольною групою на відповідному часовому терміні

Аналіз динаміки скорочення площі ран свідчить про чіткий позитивний вплив досліджуваних композицій на перебіг репаративного процесу. Уже на третю добу після початку лікування у тварин дослідних груп спостерігалось помітніше зменшення площі ураження, що вказує на швидший початок очищення рани та зниження інтенсивності запальної реакції. Подальші терміни спостереження продемонстрували поступове наростання

відмінностей між контрольними та експериментальними групами, які набули статистично значущого характеру.

На шосту добу площа ушкодження у контрольних тварин залишалася значно більшою, тоді як у групах лікування вона суттєво зменшувалася, особливо при застосуванні композиції №2. Це свідчить про прискорений перехід ранового процесу до проліферативної фази, що супроводжується активним формуванням грануляційної тканини та зменшенням кількості некротичних мас. У наступні дні ця тенденція зберігалася і ставала ще більш вираженою, що відображало стабільну стимуляцію регенеративних механізмів.

Особливо показовими є результати, отримані на чотирнадцяту добу, яка відповідає періоду активної грануляції та епітелізації. У цей час площа рани у тварин, що отримували ферментні композиції, була у декілька разів меншою за контрольні показники, причому друга композиція демонструвала найбільш виражений ефект. Така різниця свідчить про більш інтенсивне формування нової тканини та швидший перебіг процесів закриття ранового дефекту.

На завершальному етапі експерименту відмінності між групами зберігалися. До двадцять четвертої доби у тварин, що отримували ферментні препарати, відзначалося практично повне відновлення тканин, тоді як у контрольній групі ще залишалися незначні ділянки ушкодження. Отримані результати підтверджують здатність ферментних композицій значно скорочувати терміни загоєння та підвищувати ефективність репаративних процесів.

Результати планіметричних вимірювань узгоджуються з даними фотоспостереження за перебігом загоєння ран (рис. 3.6), що дозволяє комплексно оцінити морфологічні зміни ранової поверхні.








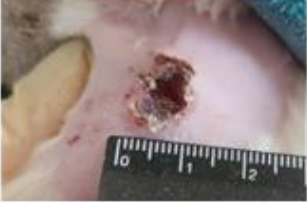
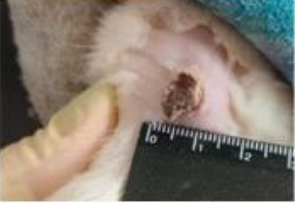









Доба	Контроль	Композиція №1	Композиція №2
0			
3			
6			
9			
14			
Повне загоєння			

Рис. 3.6. Візуальна оцінка процесу загоєння гнійно-некротичних ран у динаміці при застосуванні ферментних композицій

Візуальний аналіз показав швидке підсихання рани вже на ранніх етапах експерименту, подальше активне формування грануляційної тканини та інтенсивну епітелізацію країв дефекту. На завершальних стадіях спостерігалось повне закриття ранової поверхні без формування грубих рубців, що вказує на фізіологічний характер ремоделювання дерми та функціонально повноцінне відновлення тканин. Ця особливість є надзвичайно важливою, оскільки свідчить про перспективність застосування досліджуваних ферментних композицій не лише в медицині, але й у дерматології та косметології, де ключове значення має поєднання швидкого загоєння з високою якістю сформованої тканини

ВИСНОВКИ

Отже, у результаті виконання роботи було одержано та охарактеризовано протеолітичні ферменти, виділені із гідробіонтів *Odontaster validus* та *Stereochinus neumayeri*, а також експериментально обґрунтовано ефективність їх застосування у процесі загоєння гнійно-некротичних ран.

1. Фракції протеолітичних ензимів одержано з білок-вмісних екстрактів тканин *O. validus* та *S. neumayeri* методом іонообмінної хроматографії.

2. Встановлено, що фракції, одержані з *O. validus*, характеризуються вищою загальною протеолітичною активністю порівняно зі *S. neumayeri*, тоді як колагенолітична активність ферментів з обох джерел є співставною.

3. Показано, що ензимні фракції характеризуються різною субстратною специфічністю щодо колагену, желатину та фібриногену. При цьому для *S. neumayeri* характерна більша різноманітність ферментів за молекулярною масою.

4. За результатами інгібіторного аналізу встановлено, що у складі ферментних фракцій *O. validus* переважають металозалежні протеїнази, тоді як для *S. neumayeri* характерне більш рівномірне поєднання різних класів протеїназ.

5. Доведено, що застосування ензимних композицій прискорює процес загоєння гнійно-некротичних ран, що проявляється зменшенням їх площі та скороченням термінів регенерації; найбільш виражений ефект продемонструвала композиція на основі *Odontaster validus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Patry, J. and Blanchette, V. (2017). Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *International Wound Journal*, 14(6), pp. 1055-1065.
2. Воловар, О.С., Астапенко, О.О., Литовченко, Н.М. та Паливода, Р.С. (2023). Загоєння ран та регенерація м'яких тканин: літературний огляд. *Буковинський медичний вісник*, 27(3(107)).
3. Ramundo, J. and Gray, M. (2008). Enzymatic wound debridement. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, 35(3), pp. 273–280.
4. Ghattavi, S. and Homaei, A. (2023). Marine enzymes: classification and application in various industries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 230, pp. 123-136.
5. Avila-Rodríguez, M.I., Meléndez-Martínez, D., Licona-Cassani, C., Aguilar-Yañez, J.M., Benavides, J. and Sánchez, M.L. (2020). Practical context of enzymatic treatment for wound healing: a secreted protease approach (review). *Biomedical Reports*, 13(1), pp. 3-14.
6. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 329121.
7. Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Cihan, A.C. and Chaulagain, B.P. (2013). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. *BioMed Research International*, 2013, 204014.
8. Streimikyte, P., Viskelis, P. and Viskelis, J. (2022). Enzymes-assisted extraction of plants for sustainable and functional applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2359.
9. Tong, W.H. and Rizzari, C. (2023). Back to the future: the amazing journey of the therapeutic anti-leukemia enzyme asparaginase *Erwinia chrysanthemi*. *Haematologica*, 108(10), pp. 2606–2615.

10. Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S. and Dinparast Djadid, N. (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), pp. 975–981.
11. Rostami, N., Shields, R.C., Serrage, H.J., Lawler, C., Brittan, J.L., Yassin, S., Ahmed, H., Treumann, A., Thompson, P., Waldron, K.J., Nobbs, A.H. and Jakubovics, N.S. (2022). Interspecies competition in oral biofilms mediated by *Streptococcus gordonii* extracellular deoxyribonuclease SsnA. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 8, 96.
12. Dmitrieva, A., Alexeyenko, A., Belova, D., Piskaeva, N. and Tereshchuk, L. (2020). *Streptomyces* and *Bacillus* keratinases: properties and uses. *Food Processing Techniques and Technology*, 50(4), pp. 602–615.
13. Mirjamali, N.A.-S., Soufian, S., Molaei, N., Sadoogh Abbasian, S. and Abtahi, H. (2014). Cloning and expression of the enzymatic region of streptococcal hyaluronidase. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(9), pp. 667–672.
14. Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Cihan, A.C. and Chaulagain, B.P. (2013). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. *BioMed Research International*, 2013, 204014.
15. Zhou, C., Kong, Y., Zhang, N., Zhang, X., Qin, W., Zhang, L., Zhang, H., Yang, G. and Lu, F. (2025). Transcriptomic analysis of *Bacillus licheniformis* 2709 reveals the molecular mechanism of alkaline protease biosynthesis regulated by the DegS/DegU two-component system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 306(1), 140868.
16. *Applications of enzymes in medicine and industry* (no date). *Agriculture Institute*. Available at: <https://agriculture.institute/meat-science-fundamentals/applications-of-enzymes-in-medicine-industry/> (Accessed: 08 April 2026).
17. Balakrishnan, A., Hisana, S., Amrutha Priya, R., Nambiar, A.R., Manoj, R. and Nevin, K.G. (2025). Unveiling the biotechnological potential of *Streptomyces coelicoflavus* from South Indian marine sediments: a focus on

antimicrobial, enzyme secretion, and azo dye bioremediation properties. *The Microbe*, 8, 100498.

18. *Marine microbial enzymes* (no date). *Biotechnology - Vol. IX. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Available at: <https://www.eolss.net/sample-chapters/c17/E6-58-08-02.pdf> (Accessed: 07 February 2026).

19. Lauritano, C., Montuori, E., De Falco, G. and Carrella, S. (2023). *In silico* methodologies to improve antioxidants' characterization from marine organisms. *Antioxidants*, 12, 710.

20. Barzkar, N., Sheng, R., Sohail, M., Jahromi, S.T., Babich, O., Sukhikh, S. and Nahavandi, R. (2022). Alginate lyases from marine bacteria: an enzyme ocean for sustainable future. *Molecules*, 27(11), 3375.

21. He, Y., Suyama, T.L., Kim, H., Glukhov, E. and Gerwick, W.H. (2022). Discovery of novel tyrosinase inhibitors from marine cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 912621.

22. Rauf, A. and Jehan, N. (2017). Natural products as a potential enzyme inhibitors from medicinal plants. In: M. Senturk, ed. *Enzyme Inhibitors and Activators*.

23. Amri, E. and Mamboya, F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), pp. 99 – 104.

24. Varilla, C., Marcone, M., Paiva, L. and Baptista, J. (2021). Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects: a summary. *Foods*, 10(10), 2249.

25. Morellon-Sterling, R., El-Siar, H., Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, Á. and Fernández-Lafuente, R. (2020). Ficin: a protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, pp. 394-404.

26. Manoochehri, H., Hosseini, N.F., Saidijam, M., Taheri, M., Rezaee, H. and Nouri, F. (2020). A review on invertase: its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101599.

27. Kaur, L., Mao, B., Bailly, J., Oladeji, O., Blatchford, P. and McNabb, W.C. (2022). Actinidin in green and SunGold kiwifruit improves digestion of alternative proteins – an in vitro investigation. *Foods*, 11(18), 2739.
28. Del Prete, S. and Pagano, M. (2024). Enzyme inhibitors as multifaceted tools in medicine and agriculture. *Molecules*, 29(18), 4314.
29. Dkhar, D.S., Swain, R.P., Dubey, R., Patel, G.K. and Chandra, P. (2025). Plant-derived enzymes as sustainable biocatalysts for biosensing and industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 233, 121336.
30. Paoli, P. (2021). Enzymatic inhibitors from natural sources: a huge collection of new potential drugs. *Biomolecules*, 11(2), 133.
31. Singh, K. and Kayastha, A.M. (2014). α -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: its purification, biochemical attributes and active site studies. *Food Chemistry*, 162, pp. 1–9.
32. He, Y., Suyama, T.L., Kim, H., Glukhov, E. and Gerwick, W.H. (2022). Discovery of novel tyrosinase inhibitors from marine cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 912621.
33. Avila-Rodríguez, M.I., Meléndez-Martínez, D., Licon-Cassani, C., Aguilar-Yañez, J.M., Benavides, J. and Sánchez, M.L. (2020). Practical context of enzymatic treatment for wound healing: a secreted protease approach (review). *Biomedical Reports*, 13(1), pp. 3–14.
34. Abdel-baky, A., Abo Hashima, A., Ashraf, E., Hamdy, M. and Wardani, A.H.A. (2020). Pharmaceutical uses of animal byproducts. [online]. Available at: https://www.researchgate.net/publication/343473916_Pharmaceutical_uses_of_animal_byproducts [Accessed: 08 April 2026].
35. Ma, W., Tang, C. and Lai, L. (2005). Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. *Biophysical Journal*, 89(2), pp. 1183–1193.
36. (2020). Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 55(3), pp. 1–22.

37. The role of animal-derived enzymes in wound healing (2024). *Biolaxi Enzymes Team*. Available at: <https://www.biolaxienzymes.com/the-role-of-animal-derived-enzymes-in-wound-healing/> (Accessed: 10 February 2026).
38. Király, M., Barna, Á.T., Kállai-Szabó, N., Kiss, B.D., Antal, I. and Ludányi, K. (2025). Advances in β -galactosidase research: a systematic review from molecular mechanisms to enzyme delivery systems. *Pharmaceutics*, 17(12), 1538.
39. Hennigan, J.N. and Lynch, M.D. (2021). The past, present, and future of enzyme-based therapies. *Drug Discovery Today*, 27(1), pp. 117–133.
41. Walie, B.E., Hagemeyer, C.E., Xu, R. and Niego, B. (2026). Thrombolytic drugs for ischemic stroke: historical perspective, state of play, and future developments. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 24(1), pp. 26–46.
42. Simpson, M.A. and Lokeshwar, V.B. (2008). Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. *Frontiers in Bioscience*, 13, pp. 5664-5680.
43. Efremenko, E., Stepanov, N., Aslanli, A., Lyagin, I., Senko, O. and Maslova, O. (2023). Combination of enzymes with materials to give them antimicrobial features: modern trends and perspectives. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(2), 64.
44. Narayanan, K.B. (2025). Enzyme-based anti-inflammatory therapeutics for inflammatory diseases. *Pharmaceutics*, 17(5), 606.
45. Boleti, A.P.A., Jacobowski, A.C., Frihling, B.E.F., Cruz, M.V., Santos, K.F.D.P., Migliolo, L., Andrade, L.R.M. and Macedo, M.L.R. (2025). Wound healing: molecular mechanisms, antimicrobial peptides, and emerging technologies in regenerative medicine. *Pharmaceutics*, 18(10), 1525.
46. Wallace, H.A., Basehore, B.M. and Zito, P.M. (2023). Wound healing phases. *StatPearls* [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/> (Accessed: 10 February 2026).
47. Adibhatla, R.M. and Hatcher, J.F. (2008). Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke:

therapeutic strategies. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(3), pp. 243–253.

48. Jomova, K., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K. and Valko, M. (2024). Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of Toxicology*, 98(5), pp. 1323–1367.

49. Secco, J., Spinazzola, E., Pittarello, M., Ricci, E. and Pareschi, F. (2024). Clinically validated classification of chronic wounds method with memristor-based cellular neural network. *Scientific Reports*, 14, 30839.

50. Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., Car, J. and Järbrink, K. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of Epidemiology*, 29, pp. 8–15.

51. Mathioudaki, E., Vitsos, A. and Rallis, M.C. (2024). Proteolytic enzymes and wound debridement: a literature review. *Wounds*, 36(11), pp. 357–365.

52. Barzkar, N., Babich, O., Sukhikh, S., Venmathi Maran, B.A., Tamadoni Jahromi, S., Luwor, R.B., Sorsa, T. and Das, R. (2024). Exploring the sources and potential applications of marine collagenases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, 103150.

53. Wang, Z.-Z., Wang, K., Xu, L.-F., Su, C., Gong, J.-S., Shi, J.-S., Ma, X.-D., Xie, N. and Qian, J.-Y. (2024). Unlocking the potential of collagenases: structures, functions, and emerging therapeutic horizons. *Biodesign Research*, 6, 0050.

54. Patel, S. (2017). A critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. *Allergologia et Immunopathologia*, 45(6), pp. 579–591.