

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи
УДК 577.152.321

ТУКСАНОВА НИГИНА ХАКИМОВНА

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТА ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

5A522902-технология иммунобиологических и микробиологических
препаратов

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание академической степени
магистра

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Нормуродова К.Т.

ТАШКЕНТ-2013

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИ ЁЗИШ
БЎЙИЧА ТОПШИРИКЛАР

Тошкент Фармацевтика институти ректорининг 2012 й “ 15 ” февраль 20-сон буйруги билан тасдиқланган

Биотехнология

кафедраси бўйича

Технология полуценной ферменты из порце-
магистрлик диссертациясининг номи

лудной железы крупного рогатого скота

мавзудаги магистрлик диссертацияси

Илмий рахбар б. ф. н. доц. К. Ш. Нормурадова

бошчилигида

(илмий рахбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони)

Турсанова Нисина Каидаровна

томонидан

(тингловчининг исми-фамилияси)

туғалланган холда 201__ й “__” __ да

кафедрасига дастлабки химоя учун такдим этилади.

Тадқиқот ишида Характеристика ферментных комплексов порцелудной железы, технологическая ферментных препаратов

фойдаланилади

Фармацевтика соҳаси, тиббиёт соҳаси бўйича чоп этилган адабиётлардан, замонавий усул ва услублардан ва х.к.)

Ишда Технология полуценной ферменты из порцелудной железы крупного рогатого скота

берилиши кўзда тутилади

Ишда қуйидаги масалалар баён этилади:

1-боб Характеристика ферментных комплексов

(номи)

из порцелудной железы

2-боб Получение и определение активности ферментов

(номи)

3-боб Выделение ферментов и их предшественников. Технологическая схема.

(сана, ой, йил)

Илмий рахбар б. ф. н. доц. К. Ш. Нормурадова

(исми, фамилияси, илмий даражаси ва унвони)

Магистрант 201__ й “__” __ да топширикни қабул қилди.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Кафедра Промышленной фармации Магистр Н.Туксанова

Кафедра Биотехнология Научной руководитель К.Нормуродова

Учебный год 2011 – 2013гг. Специальность: Технология микробиологических и иммунологических препаратов

АННОТАЦИЯ

Актуальность проблемы. В последнее время в Узбекистане растет интерес к панкреатическим ферментам крупного рогатого скота. В Узбекистане производство, выпуск, высокоочищенных панкреатических ферментов не налажен и потребность отечественного производства в них удовлетворяется путем их импорта из зарубежных стран.

В связи с этим, одним из важнейших условий развития современной отечественной ферментной промышленности является выделение продуктивных и высокоактивных панкреатин, изучение их свойств, разработка новых путей технологий получения активных ферментных препаратов и их практическое использование.

Цель и задачи исследования. Получение и изучение активности ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Для этого необходимо выполнить следующее:

- Получение и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота.
- Определение активности ферментного комплекса.
- Изучение влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Объект и предмет исследований. Объектом исследований является Ташкентский фармацевтический институт или промышленные фармацевтические предприятия. Предметом является поджелудочная железа крупного рогатого скота.

Методы и материалы исследований. При выполнении работы были использованы классические биохимические и технологические методы выделения поджелудочной железы.

Научная новизна. Получено и изучено отделение ферментного комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Определено активности ферментного комплекса панкреатина. Изучено влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Разработан эффективный и легко-воспроизводимый метод получения панкреатина поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 66 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов. Диссертация содержит 5 таблиц и 13 рисунка, 52 источника использованной литературы.

Основные результаты работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 работ, из них 1 журнальная статья и 1 тезис докладов.

Обобщенные выводы и заключения. Полученные результаты могут быть использованы при разработке технологических регламентов получения недорогих, конкурентоспособных и импортозамещающих панкреатина поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Научный руководитель  К.Нормуродова

Магистрант  Н.Туксанова

MINISTRY OF HEALTH OF THE REPUBLIC OF UZBEKISTAN

TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE

Faculty of Industrial pharmacy

Master N.Tuksanova

Department of Biotechnology

Scientific head K.Normuradova

Academic year 2011 - 2013.

Specialty: Immunobiology and
microbiological technology of drugs

SUMMARY OF MAGISTER (MASTER) THESIS

Actually of the problem. In recent time, Uzbekistan is growing interest in pancreatic enzymes cattle. In Uzbekistan, the production, manufacture, highly purified pancreatic enzymes is not adjusted and the need of domestic production in them is satisfied by importing them from foreign countries.

In this regard, one of the most important conditions for the development of modern domestic industry enzyme is highly active and productive allocation of pancreatin, the study of their properties, the development of new ways of technology for obtaining active enzyme preparations and their practical use.

Purpose and research problems. Preparation and study of enzyme activity of the complex from the pancreas of cattle.

For this neohodimo the following:

- Preparation and separation of complex enzymes from the pancreas of cattle.
- Determination of the activity of the enzyme complex.
- Study the effect of physicochemical factors on the activity of the enzyme

Object and subject of researches. The object of research is Tashkent Pharmaceutical Institute or industrial pharmaceutical companies. The subject is the pancreas of cattle.

Ways and methods of researches. When performing work were used classical biochemical and technological methods of isolating the pancreas.

Degree of scientific novelty of results of researches. Obtained and studied branch of the enzyme complex from the pancreas of cattle. Defined activity pancreatin enzyme complex. The influence of physical and chemical factors on the activity of the enzyme.

Practical value and introduction of the research results. An efficient and easy - reproducible method of obtaining pancreatin pancreas of cattle.

Structure and contents of the work. The dissertation is presented on pages 66 and computer text consists of an introduction, literature review, describing objects and research methods, results and discussion, conclusions, conclusions. The thesis contains 5 tables and 13 figures, 52 source references

Main results of the work implemented. On dissertation materials published two works, one of them and one journal article abstracts.

Generalized findings and conclusions. The results can be used in the development of production schedules to obtain inexpensive , competitive and import- pancreatin pancreas of cattle.

Scientific head  K. Normuradova

Master  N. Tuksanova

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА I. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	
1. Характеристика ферментных комплексов поджелудочной железы.....	8
2. Использование фармацевтикой промышленности ферментных комплексов поджелудочной железы	23
3. Физико-химические свойства ферментов поджелудочной железы.....	39
ГЛАВА II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ	
1. Получение и определение активности ферментов.....	43
2. Определение некоторых физико-химических свойств ферментов.....	44
ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	
1. Выделение ферментов и их предшественников.....	45
2. Получение и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота.....	51
3. Определение активности ферментного комплекса.....	55
4. Изучение влияния рН и температуры на активности полученных комплексов	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	60
ВЫВОДЫ.....	61
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	62
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	67

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- СПЖ — поджелудочной железы
- ПС — протеолитическая активность
- Т — трипсин
- ПК — панкреатин
- АС — амилалитическая активность
- ЛА — липолитическая активность

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В последние годы ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине, фармацевтике и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства. Эти ферменты широко используются в фармацевтической, пищевой, кожевенной промышленности, в производстве гидролизатов белков [1-5]. Применение препараты ферментов, полученные из тканей, поджелудочной железы и органов животных, предназначаются в основном для пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности определяется уровнем развития современной биотехнологии. Высокоочищенные ферменты используются для лечения различных ран, ожогов, для удаления некротических тканей с поверхности гнойных ран. Готовятся различные таблетки, эмульсии, аэрозоли и рассыпчатые формы лекарственных сред на основе протеолитических ферментов. Поэтому к ним предъявляются особо жесткие требования в отделении и получении. Особенно в технологии пищевых продуктов и фармацевтических производство применяются ферментные препараты с амилалитической, протеолитической, липолитической, пектолитической, оксидазной активностью.

Для улучшения переваривания пищи у пациентов с нормальной функцией ЖКТ в случае погрешностей в питании, а также при нарушениях жевательной функции, вынужденной длительной иммобилизации, малоподвижном образе жизни. Подготовка к рентгенологическому и ультразвуковому исследованию органов брюшной полости [5, 44, 50].

Ферментные препараты позволяют увеличить выход готовой продукции и ускорить технологический процесс приготовления. Очистка же ферментов намного увеличит их стоимость, снижая тем самым экономический эффект от их применения. Кроме того, очистка ферментов часто уменьшает и эффективность препаратов [7-8].

В последнее время в Узбекистане растет интерес к панкреатическим ферментам крупного рогатого скота, что вызвано широкими возможностями их использования для решения практических задач фармацевтических производств.

Особенно это относится к медицинской и фармацевтической промышленности, которая испытывает острую потребность в комплексных протеолитических ферментных препаратах, проявляющих максимальную активность в кислой и слабокислой зонах.

Применение препараты ферментов, полученные из тканей, поджелудочной железы и органов животных, предназначаются в основном для медицинской и фармацевтической промышленности, определяется уровнем развития современной биотехнологии. Высокоочищенные ферменты используются для лечения различных ран, ожогов, для удаления некротических тканей с поверхности гнойных ран. Готовятся различные таблетки, эмульсии, аэрозоли и рассыпчатые формы лекарственных сред на основе протеолитических ферментов. Поэтому к ним предъявляются особо жесткие требования в отделении и получении. Особенно в технологии пищевых продуктов и фармацевтических производство применяются ферментные препараты с амилалитической, протеолитической, липолитической, пектолитической, оксидазной активностью [45].

К сожалению, в Узбекистане производство, выпуск, высокоочищенных панкреатических ферментов не налажен и потребность отечественного производства в них удовлетворяется путем их импорта из зарубежных стран. В связи с этим, одним из важнейших условий развития современной отечественной ферментной промышленности является выделение

продуктивных и высокоактивных панкреатин, изучение их свойств, разработка новых путей технологий получения активных ферментных препаратов и их практическое использование.

Одним из перспективных объектов в этом отношении являются панкреатина крупного рогатого скота.

Панкреатин – средство для улучшения пищеварения. Лекарственные препараты, в состав которых входит панкреатин, являются сегодня очень востребованными, так как питание современного делового человека оставляет желать лучшего. Нарушения в питании приводят как к неправильному перевариванию пищи и неприятным ощущениям после еды, так и к формированию хронических заболеваний органов пищеварения. И в том, и в другом случае панкреатин поможет справиться с проблемами.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования служили поджелудочной железы крупного рогатого скота. Предметом исследования явились отделение ферментных комплексов панкреатина, выделение и очистка ферментов, физико-химические свойства полученных ферментных препаратов.

Цель и задачи исследования. Получение и изучение активности ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Для этого необходимо выполнить следующее:

- Получение и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота.
- Определение активности ферментного комплекса.
- Изучение влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Основные вопросы исследования и их представления. Полученные результаты могут быть использованы при разработке технологических регламентов получения недорогих, конкурентоспособных и импортозамещающих панкреатина поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Краткий литературный обзор по тематике. Характеристика ферментных комплексов поджелудочной железы, использование фармацевтикой промышленности ферментных комплексов поджелудочной железы, Физико-химические свойства ферментов поджелудочной железы

Методы исследования. При выполнении работы были использованы классические биохимические и технологические методы выделения поджелудочной железы.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Разработан эффективный и легко-воспроизводимый метод получения панкреатина поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Научная новизна. Получено и изучено отделение ферментного комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Определено активности ферментного комплекса панкреатина. Изучено влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 66 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов. Диссертация содержит 5 таблиц и 13 рисунка, 52 источника использованной литературы. По материалам диссертации опубликовано 2 работ, из них 1 журнальная статья и 1 тезис докладов.

ГЛАВА I. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

1. Характеристика ферментных комплексов

поджелудочной железы

В современной биотехнологии секрет поджелудочной железы содержит сложный набор гидролитических ферментов, действующих на различные классы веществ – белки, жиры, нуклеиновые кислоты, углеводы. Некоторые ферменты (нуклеазы, амилаза) секретируются в поджелудочный сок сразу в активном состоянии, тогда как другие ферменты – различные протеазы, фосфолипаза – синтезируются тканью железы в виде неактивных предшественников – зимогенов и превращаются в активные ферменты уже в самом поджелудочном соке [13-14].

Известно, что поджелудочная железа содержит целый ряд ферментов различной субстратной спецификации, в частности трипсин (КФ 3.4.21.4), α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1), карбоксипептидазу (КФ 3.4.16.1) липазу (КФ 3.1.1.3), амилазу (КФ 3.2.1.13), которые выделяют в виде ферментного комплекса, получившегося название «панкреатин». Этот препарат широко применяется в медицинской и пищевой промышленности благодаря его широкой субстанции специфичности и способности гидролизовать белки, жиры и полисахариды различного химического состава [16].

В настоящее время производство панкреатин составляет около 30-35% от общего числа мирового производства ферментов [15-17].

Панкреатин – средство для улучшения пищеварения. Лекарственные препараты, в состав которых входит панкреатин, являются сегодня очень востребованными, так как питание современного делового человека оставляет желать лучшего. Нарушения в питании приводят как к неправильному перевариванию пищи и неприятным ощущениям после еды, так и к формированию хронических заболеваний органов пищеварения. И в том, и в другом случае панкреатин поможет справиться с проблемами [47].

Как действует панкреатин. Панкреатин входит в состав многих популярных лекарственных препаратов (мезима, фестала, панзинорма, креона и других). Панкреатин – это экстракт поджелудочных желез свиней или крупного рогатого скота, который содержит ферменты для расщепления белков (протеазы), углеводов (амилазу) и жиров (липазу).

В тех или иных лекарственных препаратах содержится разное количество этих ферментов, что указывается в инструкции к препарату. Именно поэтому лучше, если препараты, содержащие панкреатин, назначались врачом после предварительного обследования и выявления нарушений в пищеварении. Особенностью панкреатина является то, что он не только восполняет недостающие пищеварительные ферменты, но и стимулирует секрецию собственных ферментов поджелудочной железы, желудка, кишечника и печени [45-49].

Когда можно принимать панкреатин, а когда его прием может быть очень опасным. Панкреатин применяют при снижении функции органов пищеварения. Например, при хроническом панкреатите в стадии ремиссии его назначают, так как часть поджелудочной железы после ряда обострений заменяется соединительной тканью, в связи с чем уменьшается объем выделяемого ей пищеварительного сока. Но при остром панкреатите и обострении хронического панкреатита принимать панкреатин очень опасно, так как эти состояния связаны с некрозом клеток поджелудочной железы и выделением большого количества панкреатического сока, который переваривает ткань этого органа – поступление дополнительного панкреатина утяжелит состояние больного [8].

Назначают панкреатин также при заболеваниях желудка и кишечника, которые сопровождаются снижением их секреторной функции, например, при хронических **гастритах** с пониженной секрецией. Препараты, содержащие панкреатин, назначают в таких случаях курсами – это позволяет не только улучшить состояние больных в момент приема пищи, но и стимулировать собственную секрецию желудочного сока.

При хронических гепатитах, а также при нарушениях функции желчевыводящих путей нарушается поступление в двенадцатиперстную кишку желчи, которая выполняет важную функцию в пищеварении, особенно в расщеплении жиров. Панкреатин используется в данном случае в качестве заместительной терапии [51].

Широко применяются лекарственные препараты, в состав которых входит панкреатин, в качестве заместительной терапии больным после операций на желудочно-кишечном тракте, например, после резекции желудка или кишечника. В процессе подготовки к различным дополнительным видам исследований органов брюшной полости (рентгеновским, ультразвуковым, эндоскопическим) панкреатин является незаменимым препаратом, так как способствует уменьшению газообразования. Именно газообразования часто является непреодолимым препятствием для проведения таких исследований, как рентгенография желудка и кишечника и прочее.

Здоровые люди могут принимать панкреатин при переедании, если пища была очень жирной, трудно перевариваемой. Это незаменимое средство на всякого рода застольях, фуршетах и так далее. Противопоказанием для приема панкреатина является индивидуальная непереносимость препарата и такие заболевания, как острый панкреатит, обострение хронического панкреатита, острый гепатит, непроходимость кишечника [52].

Как правильно принимать лекарственные препараты, в состав которых входит панкреатин. Любые лекарственные формы препарата, содержащего панкреатин (капсулы, таблетки, драже) принимают во время или непосредственно после еды, не разжевывая и запивая большим объемом воды или чая. Не рекомендуется использовать с этой целью щелочные растворы, например, минеральную воду. Доза препарата рассчитывается по содержанию в данном препарате фермента для расщепления жиров – липазы. В зависимости от того, насколько снижена функция поджелудочной железы,

назначается частичное или полное замещение этого фермента, то есть доза подбирается врачом индивидуально [43].

У лекарственных препаратов, содержащих панкреатин, побочные эффекты.

Такие побочные эффекты редко, но встречаются, они могут проявляться в виде тошноты, поносов или запоров, ощущении дискомфорта в желудке, аллергических реакций, появлении в крови большого количества мочевой кислоты при длительном приеме в больших дозах [44-45].

Трипсин – один из основных ферментов пищеварения. Относится к пептид-гидролазам, катализирует гидролиз белков и пептидов. Секретируется бета-клетками поджелудочной железы в виде неактивного предшественника – трипсиногена. Появление активного трипсина в ткани поджелудочной железы является одним из главных патогенетических факторов развития острого и хронического панкреатита. Определение активности трипсина и некоторых других ферментов в содержимом двенадцатиперстной кишки используется для оценки функционального состояния поджелудочной железы и диагностики панкреатита [9, 13].

Ключевое положение трипсина – в системе пищеварительных ферментов объясняется тем, что он не только участвует в расщеплении пищевых белков, но и активирует все проферменты, образующиеся в поджелудочной железе, т.е. трипсиноген, химотрипсиногены А и В, прокарбоксипептидазы А и В, проэластазу, профосфолипазу. При попадании в кровяное русло и при недостаточности соответствующих ингибиторов Т. Может активировать фактор Хагемана, плазминоген, прекалликреин и т.д. [11, 20, 52].

Активность трипсина – угнетается большим числом природных белковых ингибиторов, называемых иногда антитрипсинами, которые предохраняют ткани от разрушения Т.

Основными ингибиторами Т. В плазме крови человека являются $\alpha 1$ -протеиназный ингибитор ($\alpha 1$ -антитрипсин), $\alpha 2$ -макроглобулин и интер- α -

ингибитор трипсина. В поджелудочной железе содержатся два ингибитора Т., один из которых секретируется в двенадцатиперстную кишку вместе с трипсиногеном и предохраняет его от преждевременной активации.

Препараты ингибиторов Т. Выделенные из поджелудочной железы или легких, контрикал, трасилол – используют в медицине. Практике в качестве лекарственных средств. Дефицит или дефект некоторых ингибиторов Т (например, (альфа 1-протеиназного ингибитора) служат причиной развития патологии, состояний.

Трипсин образуется в кишечнике из трипсиногена после его частичного протеолиза ферментом энтерокиназой. Ионы Ca_2^+ способствуют активации трипсиногена и стабилизируют Т., предохраняя его от аутолиза. При остром и хроническом панкреатите в результате задержки выделения сока поджелудочной железы происходит внутриорганный активация панкреатических ферментов и в первую очередь трипсина, который активирован затем другие проферменты, это в конечном счете приводит к аутолизу паренхимы железы [13, 48].

Для определения активности Т широкое распространение получили метод Кунитца, основанный на расщеплении трипсином казеина с последующим определением в безбелковом фильтрате содержания тирозина, и метод Эрлангера, в основе которого лежит расщепление Т. Синтетического субстрата п-нитроанилида N-бензоил-D, L-аргинина (БАПН). Часто для определения активности Т используют контролируемый спектрофотометрический гидролиз эфиров N-замещенного L-аргинина.

Активность Т., определенная этим методом в дуоденальном содержимом человека, полученном с помощью тонкого зонда натошак без применения специальных раздражителей, в норме составляет 100-150 миллиединиц (за единицу активности принимают активность такого количества фермента, которое вызывает расщепление 1 мкмоль субстрата за 1 мин) [6].

Применение препарата трипсина в качестве лекарственного средства основано на его способности избирательно разрушать некротизированные

ткани, разжижать мокроту и другие вязкие секреты, экссудат, сгустки крови, а также на его противовоспалительном и противоотечном действии и на способности этого фермента снижать резистентность гноеродной микрофлоры к антибиотикам и ускорять процесс регенерации гнойных ран. При патологии снижении Внешнесекреторной функции поджелудочной железы Т (в составе панкреатина) используют для заместительной энзимотерапии. В медицинской практике применяют кристаллический Т., получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Кроме того, Т. вместе с химотрипсином входит в состав препаратов панкреатина и химопсина.

Трипсин кристаллический (*Trypsinum crystallisatum*) – белый или желтоватый порошок без запаха, легко растворим в воде и изотоническом растворе натрия хлорида, в нейтральных и щелочных растворах препарат быстро разрушается. Используется для лечения гнойных и длительно незаживающих ран, остеомиелита, трофических язв, пролежней и ожогов, иногда – в комплексной терапии тромбофлебитов. Препарат применяют местно и внутримышечно, его нельзя вводить внутривенно и наносить на изъязвленные поверхности злокачественных опухолей. Местно его используют в виде 1-2, 5% растворов в изотоническом растворе натрия хлорида для смачивания марлевых тампонов, вводимых в рану. При наличии жидкого гнойного отделяемого препарат можно вносить в рану в виде порошка (от 0,03 до 0,2 г). Внутримышечно препарат вводят взрослым по 0,005-0,01 г 1-2 раза в день, детям по 0,0025 г 1 раз в день. Непосредственно перед введением препарат растворяют в 1-2 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида или 0,5- 2% р-ра новокаина. Растворы препарата необходимо вводить глубоко в верхний наружный квадрант ягодицы. При гнойных заболеваниях легких растворы Т. назначают в виде ингаляций (0,005-0,01 г препарата в 2-3 мл изотонического раствора натрия хлорида) или вводят внутримышечно, а при необходимости – путем эндотрахеального вливания (0,025-0,05 г препарата в 2-5 мл изотонического раствора натрия

хлорида). Т. Как отхаркивающее средство прямого типа действия назначают (обычно в виде ингаляций и иногда внутримышечно) при бронхитах, пневмониях и других заболеваниях легких, сопровождающихся образованием вязкой, трудно отделяющейся мокроты. При плевритах и эмпиеме плевры интраплеврально 1 раз в сутки вводят по 0,01-0,02 г препарата, растворенного в 20-50 мл изотонического раствора натрия хлорида. При пародонтите в дополнение к внутримышечным инъекциям препарат вводят поднадкостнично (в область поражения). В офтальмологии кристаллический Т. назначают внутримышечно и местно (закапывание глазных капель и ванночки) при иридоциклитах, кровоизлиянии в переднюю камеру глаза, посттравматическом и послеоперационном отеке окологлазных тканей. Для ванночек используют 0,2% растворы препарата, а в качестве глазных капель – 0,25-1% растворы, которые назначают по 3-4 раза в день в течение 2-3 дней [6, 11, 12, 18, 19, 47].

Побочное действие Т. проявляется неодинаково в зависимости от путей введения. После внутримышечного введения он может вызывать местную болезненность и гиперемию. После ингаляций Т. возможно появление признаков раздражения верхних дыхательных путей (осиплость голоса и др.). При парентеральном применении Т. может вызывать аллергические реакции, тахикардию и лихорадку. Препарат противопоказан при сердечной недостаточности, декомпенсированных формах туберкулеза легких, эмфиземе легких с дыхательной недостаточностью, циррозе печени, вирусном гепатите, панкреатите, заболеваниях почек и геморрагических диатезах.

Форма выпуска: ампулы или флаконы, содержащие по 0,005 и 0,01 г трипсина кристаллического. **Хранение:** в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 10 °С.

Панкреатит (pancreatitis- греч. Pankreasitis - поджелудочная железа) – воспаление поджелудочной железы. Различают острый и хронический панкреатит.

Острый панкреатит – острое воспалительно-некротическое поражение поджелудочной железы. Обычно развивается быстро и протекает тяжело. Наиболее частыми причинами острого П. являются, прием большого количества жирной острой пищи, особенно в сочетании с алкогольными напитками, острый холецистит или приступ желчнокаменной болезни, травма живота, тромбоз или эмболия сосудов поджелудочной железы, некоторые острые интоксикации, острое нарушение оттока панкреатического сока вследствие закупорки устья фатерова соска (напр., желчным камнем, опухолью), некоторые острые инф. Болезни (напр., эпидемический паротит). Реже имеется наследственная предрасположенность (муковисцидоз, дивертикулы двенадцатиперстной кишки, осложненные дивертикулитом). Возникновение острого П. связано с активацией протеолитических ферментов панкреатического сока – трипсина и некоторых других, происходящей обычно вследствие заброса в панкреатические протоки из двенадцатиперстной кишки фермента энтерокиназы, в результате чего происходит самопереваривание ткани железы. Возможно непосредственное повреждающее действие на паренхиму поджелудочной железы бактерий, вирусов и их токсинов, а также алкоголя. В зависимости от остроты и тяжести воспалительного процесса острый П. может протекать с отеком, некрозом, нагноением и геморрагическим пропитыванием тканей поджелудочной железы. Заболевание обычно начинается внезапно и быстро прогрессирует. Наблюдаются симптомы острого живота: резкие боли в верхней половине живота, иногда опоясывающие, повторная рвота, задержка стула, вздутие живота, высокая лихорадка. В тяжелых случаях появляются синюшные пятна и петехии на отдельных участках кожи живота. Возможен коллапс. Диагноз основывается на характерной клин. Картина и результатах лабораторных и инструментальных исследований. В крови отмечается нейтрофильный лейкоцитоз, увеличение СОЭ, гипокальциемия, резкое повышение содержания панкреатических ферментов (гиперамилаземия), в моче – гиперамилазурия. При панкреонекрозе гиперамилаземия и

гиперамилазурия могут быть менее выраженными, возможны гипергликемия и глюкозурия вследствие поражения островкового аппарата поджелудочной железы и недостаточной выработки инсулина [44-50]. Ультразвуковое исследование и компьютерная томография выявляют увеличение размеров поджелудочной железы, неравномерность ее структуры (участки некроза, нагноения).

Больного острым П. Необходимо срочно госпитализировать в хирургический стационар. Назначают голод на 1-4 дня, холод (резиновый пузырь со льдом) на верхнюю половину живота и левое подреберье, спазмолитические и холинолитические препараты (атропина сульфат, но-шпа и др.), внутривенно вводят трасилол или контрикал, гордокс, антибиотики. При отсутствии эффекта от консервативного лечения, а также при гнойном и геморрагическом П. Показано оперативное лечение. Прогноз при остром П., протекающем с отеком, благоприятный; при П., сопровождающемся геморрагическим пропитыванием и некрозом, - серьезный (летальность до 50-60%). Профилактика заключается в соблюдении рационального режима питания, борьбе с пьянством, в своевременном лечении заболеваний пищеварительной системы. Хронический панкреатит – хроническое воспалительное поражение поджелудочной железы. Различают первичный хронический П., при котором воспалительный процесс с самого начала развивается в поджелудочной железе, и вторичный, или сопутствующий П., при котором поджелудочная железа вовлекается вторично на фоне других заболеваний органов пищеварения (напр., холецистита, язвенной болезни). Причины и механизм развития хронического П. те же, что и при остром панкреатите. В хроническому форму может перейти тяжело протекающий или затянувшийся острый панкреатит. Клиническая картина характеризуется болями в верхней половине живота, диспептическими явлениями (подташнивание, ощущение урчания и переливания в животе, вздутие живота, неприятный вкус во рту, отвращение к жирной пище и др.). В более тяжелых случаях отмечаются

панкреатогенные поносы (обильные, с неприятным запахом и жирным блеском испражнения), похудание. Боли, нередко опоясывающего характера, локализуются в подложечной области и левом подреберье, могут усиливаться в положении больного лежа на спине и ослабевать в положении сидя с небольшим наклоном туловища вперед. Боли могут быть постоянными или появляются вскоре после приема пищи, особенно жирной и острой, алкоголя. Диспептические явления вначале наблюдаются только при обострении заболевания, а затем постоянно. При прогрессировании заболевания появляется слабость, снижается работоспособность, в тяжелых случаях возможны психические расстройства. Вследствие вовлечения в процесс островкового аппарата поджелудочной железы может развиваться сахарный диабет, в результате воспалительно-склеротических изменений поджелудочной железы возможно возникновение механической подпеченочной желтухи. Течение заболевания затяжное, без лечения обычно прогрессирующее. По характеру течения различают рецидивирующую, болевую, псевдоопухолевую, диспептическую и латентную бессимптомную формы хронического П. Наиболее частые осложнения – развитие абсцессов, кист, кальцификатов поджелудочной железы, вторичного сахарного диабета. Диагноз устанавливают на основании анамнеза, клин. Картины. Из лабораторных методов имеет значение исследование кала: определяется большое количество непереваренных пищевых остатков – капли жира (стеаторея), мышечные волокна (креаторея), в меньшей степени – крахмальные зерна (амилорея). Используют также дуоденографию (см. Дуоденография релаксационная), эхографию (Ультразвуковая диагностика), компьютерную томографию (Томография компьютерная), эндоскопическую ретроградную панкреатохолангиографию, ангиографию. При обострении хронического П. Активность панкреатических ферментов в крови и особенно в моче повышается. При выраженном обострении хронического панкреатинбольных госпитализируют, и лечение проводят, как при остром П. При слабо выраженном обострении – лечение амбулаторное. Назначают

частое (до 5-6 раз) дробное питание с повышенным содержанием белков. При развитии сахарного диабета ограничивают количество углеводов (сахар, варенье, мед, конфеты и др.) и назначают необходимое лечение. Показаны антиферментные препараты (гордокс, контрикал), спазмолитики, анальгетики (платифиллин, но-шпа, баралгин). При сильных болях показаны паранефральная или паравертебральная новокаиновая блокада, в особо тяжелых случаях – наркотические анальгетики в сочетании с холинолитиками и спазмолитиками. При выраженных диспептических явлениях и поносах назначают ферментные препараты панкреатин, фестал, панзинорм, витогепат, дигестал, солизим и др. Показаны препараты анаболического действия (пентоксил, метилурацил), антибиотики широкого спектра действия. После снятия острых явлений рекомендуется курортное лечение (Боржоми, Ессентуки, Железноводск, местные санатории гастроэнтерол, профиля). При тяжелом течении хронического П. Больных направляют на ВТЭК. Профилактика хронического П. Заключается в соблюдении рационального режима питания, здорового образа жизни, своевременном лечении заболеваний пищеварительной системы, в т. Ч. Острого панкреатита. Больные хроническим панкреатин должны находиться под диспансерным наблюдением [21, 23, 24, 27].

Воспаление поджелудочной железы лечится так. Перетереть в муку высушенные ядра 100 грецких орехов, смешать ее в равных по объему частях с майским медом, сложить в банку и поставить на хранение в холодное место. Каждое утро натощак съедать по 1 ч.л. смеси. И так до ее окончания. Через месяц повторить.

Панкреатит лечим травяным сбором. Панкреатит народные целители традиционно лечат травами. Такое лечение очень эффективно и в наши дни. Курс лечения по этому рецепту- 1,5 месяца. Но сначала нужно приготовить смесь из 6 ложек цветов бессмертника, 3 ложек зверобоя, 3 ложек пустырника. Эти травы продаются в аптеках и на рынках, если вы сами не засушили их летом. Сбора заливают стаканом кипятка и укутывают

на полчаса. Процеженный настой доливают кипяченой водой до полного стакана и делят его на 3 приема. Пьют за полчаса до еды 3 раза в день 1,5 месяца. При поносе попробуйте принять 5-6 капель йода в половине стакана теплой воды. Средство очень сильное, и бывает достаточно одного приема [25-26, 50].

Обострение хронического панкреатита. Облегчит состояние при обострении хронического панкреатита принятие смеси свежеприготовленных соков картофеля и моркови. Отожмите сок из 2-3 больших картофелин разовых или красных сортов, а также 2 морковок так, чтобы вышло 200 г смеси соков. Выпить ее утром натощак, затем обязательно полежать полчаса. Через час можно завтракать. Пить соки в течение 7 дней. После недельного перерыва повторить курс. И так 3 раза. Очень хорошее лекарство от панкреатита - дынные семечки. Их надо шелкать сырым - чем больше, тем лучше.

Воспаление поджелудочной железы (панкреатит). Довольно неприятное заболевание хронический панкреатит (воспаление поджелудочной железы), но и с ним можно справиться средствами народной медицины. Итак, пропустите через мясорубку 1 кг лимонов вместе с кожурой, но без косточек, по 300 г петрушки и чеснока, перемешайте, уложите все в эмалированную кастрюлю и оставьте на 2 недели. Готовое снадобье принимайте по 1 чайную ложку 3 раза в день за 15 минут до еды. Запивайте 1/3 стакана травяного настоя. Чтобы его приготовить, измельчите, а затем смешайте в равных по весу частях листья черники, брусники и земляники, стручки фасоли и кукурузные рыльца, а потом 1 столовая ложка смеси залейте в термосе стаканом кипятка и оставьте на ночь, утром процедите и настой готов.

В рационе больного хроническим панкреатитом обязательно должна присутствовать морская капуста, так как в ней много кобальта и никеля, а недостаток этих минералов вызывает нарушения в работе поджелудочной железы [29, 46].

Панкреатит и болезни желудочно-кишечного тракта. Измельчить пару листьев Золотого уса длиной 10-15 см и один длиной 20-25 см, залить 700 мл кипящей воды и кипятить на слабом огне 10-15 минут. Настоять 10-12 часов, предварительно укутав посуду полотенцем. Отвар долго хранится даже при комнатной температуре, не перекисает. Дозу подбирают индивидуально, ориентировочно она составляет 50-70 мл на 1 раз. Отвар принимать подогрет на водяной бане за 40 минут до еды 3-4 раза в день. Можно использовать для лечения настоек Золотого уса. В стеклянной посуде измельчить лист растения длиной не менее 20 см и залить 1 л кипятка. Настаивать сутки, укутав посуду полотенцем. Настой должен приобрести малиново-фиолетовый оттенок. Принимать его 3-4 раза в день за 40 минут до еды в теплом виде. Каждый подбирает индивидуально дозу приема за раз. Настой и отвар Золотого уса нельзя запивать и заедать. На первом этапе могут быть обострения. Надо перетерпеть [48].

Панкреатит- это воспалительное заболевание железы. Он бывает острым и хроническим. Причинами острого панкреатита считаются аллергия, сосудистые расстройства, острые интоксикации, нарушение оттока панкреатического секрета, рефлекс желчи и дуоденального содержимого. Наблюдается связь острого панкреатита с употреблением жирной пищи и приемом алкоголя, желчнокаменной болезнью, воспалением в желчном пузыре и желчных протоках. В основе патогенеза заболевания лежит «самопереваривание» ткани железы ее же ферментами. Изменения при болезни выражаются отеком, панкреонекрозом и расплавлением ткани железы (гнойная форма). Воспалительный процесс, если его не лечить, завершается образованием фиброзной ткани и ложных кист с обызвествлением поджелудочной железы.

Панкреатит хронический характеризуется постепенным развитием в ткани железы дегенеративных и склеротических изменений и постепенным нарушением ее функции. Причины хронического панкреатита: неизлечимый острый панкреатит, гепатит, энтероколит, желчнокаменная болезнь,

хронический алкоголизм, холецистит, атрофический гастрит, язвенная болезнь, атеросклероз, особенно жирной и острой пищи, ожирение. Осложнения хронического панкреатита: киста, абсцесс, рак поджелудочной железы, желудочно-кишечное кровотечение, сахарный диабет.

При лечении панкреатита народная медицина рекомендует полностью исключить из рациона поваренную соль и молоко, употреблять продукты, обладающие противовоспалительными свойствами. К ним относятся айва, арбуз, барбарис, виноград, ежевика, инжир, калина, капуста, картофель, лимон, малина, морковь, облепиха, огурец, орех грецкий, петрушка, репа, рябина, свекла, сельдерей, смородина черная и красная, тыква, чеснок, шелковица, шпинат, щавель и ячмень. Следует полностью отказаться от кофе, чая, какао, шоколада, газированных напитков, употребления алкоголя и курения. Следует использовать в лечении по очереди землянику лесную, чернику и черную бузину [49-51].

Панкреатин. Лекарственная форма: таблетки покрытые кишечнорастворимой оболочкой.

Состав: 1 таблетка содержит – панкреатина 0,1г (протеолитическая активность не менее-25 Ед, липолитическая активность не менее – 140 Ед, амилолитическая активность не менее – 1500 Ед). Вспомогательные вещества: лактоза (сахар молочный), метилцеллюлоза МЦ-16, кальция стеарат, целлацефат, кислотный красный 2С, титана диоксид, полисорбат- 80.

Описание. Таблетки, покрытые оболочкой, розового или темно-розового цвета, круглые, двояковыпуклые, со специфическим запахом. На поперечном разрезе ядра таблетки допускается наличие вкраплений.

Фармакотерапевтическая группа: пищеварительное ферментное средство.

Фармакологические свойства. Восполнение дефицита ферментов поджелудочной железы. Содержит экскреторные панкреатические ферменты: липазу, α -амилазу, трипсин, химотрипсин, способствует расщеплению белков (до аминокислот), жиров (до глицерина и жирных кислот) и крахмала (до

декстринов и моносахаридов), нормализует процессы пищеварения. Ферменты, входящие в состав панкреатина, высвобождаются в щелочной среде тонкого кишечника, т.к. защищены от действия желудочного сока оболочкой. Трипсин в верхнем участке тонкого кишечника ингибирует стимулированную секрецию поджелудочной железы, обуславливая обезболивающий эффект панкреатина.

Показания к применению. Применяют при ахилии, хронических панкреатитах с недостаточной функцией поджелудочной железы, при расстройствах пищеварения, связанных с заболеваниями печени и поджелудочной железы, анацидном и гипацидном гастрите, хронических энтероколитах.

Противопоказания. Гиперчувствительность (в течение непереносимости свинины), острый панкреатит, обострение хронического панкреатита.

Способ применения и дозы. Таблетки принимают во время еды или сразу же после нее, не раскусывая. Для взрослых разовая доза панкреатина составляет 0,5-1,0 г, суточная – 4 г. Препарат в таблетках назначают детям в следующих дозах: в возрасте 6-7 лет 1 таблетку, 8-9 лет 1-2 таблетки, 10-14 лет 2 таблетки. Курс лечения составляет от 4-6 недель до 2-3 месяцев и более.

Побочное действие. Симптомы кишечной непроходимости и аллергические реакции немедленного типа (при муковисцидозе, особенно у детей).

Форма выпуска. Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой 25 Ед. По 10 таблеток в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой. По 60 таблеток в банке оранжевого стекла, укупоренную натягиваемой пластмассовой крышкой или в банке из полимерных материалов с навинчиваемой крышкой. Свободное пространство в банке заполняют ватой медицинской или уплотнителем из полиэтилена. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной или писчей, или самоклеящуюся. 6 контурных ячейковых упаковок или банку с

инструкцией по применению помещают в пачку из картона коробочного [30, 32, 51].

2. Использование фармацевтикой промышленности ферментных комплексов поджелудочной железы

Панкреатин (Pancreatinum) — это препарат поджелудочной железы животных [13, 49]. Он содержит в активной форме главные ферменты, выделяемые железой, вместе с поджелудочным соком, например:

1. Протеолитический фермент трипсин, расщепляющий белки в слабощелочной среде до стадии низших пептидов и свободных аминокислот;
2. Амилолитический фермент амилазу (диастазу), расщепляющий крахмал до мальтозы;
3. Третий, фермент поджелудочного сока — липаза, (стеапсин) — в продажных препаратах содержится обычно в ничтожных количествах, потому что он разрушается в процессе производства.

Сырьем для получения панкреатина служат свежие и замороженные поджелудочные железы рогатого скота или свиней (последние дают препарат лучшего качества и с большим выходом).

Для получения препарата железы измельчают и прессуют или предварительно подкисляют до pH 4.6, смешивают с песком и затем прессуют. Полученный сок осаждают 96 % спиртом, осадок промывают сначала крепким спиртом, затем эфиром, сушат и растирают в порошок. Этот порошок имеет коричневатый или серый цвет. В воде он очень маловато растворим, а в органических растворителях совершенно не растворим, негигроскопичен. Водные растворы имеют слабокислую реакцию, в них при комнатной температуре панкреатин быстро теряет активность, при кипячении же потеря активности происходит почти мгновенно. Сухие препараты выдерживают кратковременное нагревание до 100°C с незначительной потерей активности.

Степень активности препарата определяется по расщеплению белка казеина в слабощелочной среде и крахмального клейстера.

Хранение. Хранят препарат в плотно закрытых банках в прохладном месте, защищенном от действия света. Срок хранения — два года. Внешние признаки негодности — гнилостный запах и появление плесени.

Имеются и другие методы изготовления панкреатина, например:

1. Извлечение желез водой, подкисленной уксусной кислотой, с последующей сушкой извлечения в распылительной сушилке и обеззараживанием полученного остатка (башенный панкреатин);
2. Непосредственная сушка ткани поджелудочной железы.

Состав: 1 таблетка содержит панкреатина — 0,240 г с минимальной ферментной активностью: липазы — 8 000 ME FTP; амилазы — 5600 ME FIP; протеазы — 370 ME FIP; вспомогательные вещества.

Фармакологические свойства. Входящие в состав препарата панкреатические ферменты (липаза, амилаза и протеаза) облегчают переваривание жиров, углеводов и белков, что способствует их полному всасыванию в тонком кишечнике. При заболеваниях поджелудочной железы препарат компенсирует недостаточность ее внешнесекреторной функции и способствует улучшению процесса пищеварения. Таблетки имеют защитную оболочку, нерастворимую в кислом содержимом желудка, которая предохраняет пищеварительные ферменты от разрушения под действием pH желудочного сока [24].

Фармакокинетика. Исследования фармакокинетики препарата не проводились.

Показания к применению. Недостаточность внешнесекреторной функции поджелудочной железы (хронический панкреатит, муковисцидоз и др.). Хронические воспалительно-дистрофические заболевания желудка, кишечника, печени, желчного пузыря, состояния после резекции или облучения этих органов, сопровождающиеся нарушениями переваривания пищи, метеоризмом, диареей (в составе комбинированной терапии). Для

улучшения переваривания пищи у пациентов с нормальной функцией ЖКТ в случае погрешностей в питании, а также при нарушениях жевательной функции, вынужденной длительной иммобилизации, малоподвижном образе жизни. Подготовка к рентгенологическому и ультразвуковому исследованию органов брюшной полости.

Способ применения и дозы. Доза подбирается индивидуально, в зависимости от степени недостаточности функции поджелудочной железы. Обычно препарат назначают в дозе 1 – 4 таблетки (что соответствует 8 000 – 32 000 Ед FIP по липазе) при каждом приеме пищи. Назначают таблетки внутрь, перед или во время еды, не разжевывая, запивая большим количеством жидкости, желательно не щелочной: вода, фруктовые соки. Суточная доза для взрослых составляет 48 000 – 150 000 Ед FIP (6 – 18 таблеток) При полной недостаточности внешне-секреторной функции поджелудочной железы (например, кистозном фиброзе) доза должна быть увеличена до 400 000 Ед FIP в сутки, что соответствует суточной потребности взрослого человека в липазе. Курс лечения может продолжаться от нескольких дней (при нарушении процесса пищеварения вследствие погрешностей в диете) до нескольких месяцев и даже лет (при необходимости постоянной заместительной терапии) [50-52].

Побочное действие. При длительном применении очень редко возможны реакции повышенной чувствительности. При длительном применении высоких доз препарата возможно развитие гиперурикозурии. Острый панкреатит, обострение хронического панкреатита, повышенная чувствительность к компонентам препарата. Взаимодействие с другими лекарственными средствами. Снижает всасывание железа, особенно при длительном применении.

Панкреатин не содержит компонентов, вызывающих отравления. В случае возникновения аллергии следует проводить обычные антиаллергические меры (отмена препарата, симптоматическая терапия).

При муковисцидозе доза препарата должна быть адекватна количеству ферментов, которое необходимо для всасывания жиров с учетом качества и количества потребляемой пищи.

Условия и сроки хранения. Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 15 °С.

Торговое название: Панкреатин. Международное непатентованное название(МНН) или группированное название: Панкреатин.

Лекарственная форма: таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой.

Состав: 1 таблетка содержит – панкреатина 0,1г (протеолитическая активность не менее-25 Ед, липолитическая активность не менее – 140 Ед, амилалитическая активность не менее – 1500 Ед).

Вспомогательные вещества: лактоза (сахар молочный), метилцеллюлоза МЦ-16, кальция стеарат, целлацефат, кислотный красный 2С, титана диоксид, полисорбат- 80.

Описание. Таблетки, покрытые оболочкой, розового или темно-розового цвета, круглые, двояковыпуклые, со специфическим запахом. На поперечном разрезе ядра таблетки допускается наличие вкраплений.

Фармакотерапевтическая группа: пищеварительное ферментное средство. Код АТХ: [А09АА02].

Фармакологические свойства. Восполнение дефицита ферментов поджелудочной железы. Содержит экскреторные панкреатические ферменты: липазу, альфа-амилазу, трипсин, химотрипсин, способствует расщеплению белков (до аминокислот), жиров (до глицерина и жирных кислот) и крахмала (до декстринов и моносахаридов), нормализует процессы пищеварения. Ферменты, входящие в состав панкреатина, высвобождаются в щелочной среде тонкого кишечника, т.к. защищены от действия желудочного сока оболочкой. Трипсин в верхнем участке тонкого кишечника ингибирует стимулированную секрецию поджелудочной железы, обуславливая обезболивающий эффект панкреатина.

Показания к применению. Применяют при ахилии, хронических панкреатитах с недостаточной функцией поджелудочной железы, при расстройствах пищеварения, связанных с заболеваниями печени и поджелудочной железы, анацидном и гипацидным гастрите, хронических энтероколитах.

Противопоказания. Гиперчувствительность (в т.ч. непереносимость свинины), острый панкреатит, обострение хронического панкреатита.

Способ применения и дозы. Таблетки принимают во время еды или сразу же после нее, не раскусывая. Для взрослых разовая доза панкреатина составляет 0,5-1,0 г, суточная – 4 г.

Препарат в таблетках назначают детям в следующих дозах: в возрасте 6-7 лет 1 таблетку, 8-9 лет 1-2 таблетки, 10-14 лет 2 таблетки. Курс лечения составляет от 4-6 недель до 2-3 месяцев и более.

Взаимодействие с другими лекарственными средствами. Снижает всасывание железа особенно при длительном применении [13, 31, 33-36, 44].

Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой 25 Ед. По 10 таблеток в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой. По 60 таблеток в банке оранжевого стекла, укупоренную натягиваемой пластмассовой крышкой или в банке из полимерных материалов с навинчиваемой крышкой. Свободное пространство в банке заполняют ватой медицинской или уплотнителем из полиэтилена. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной или писчей, или самоклеящуюся. 6 контурных ячейковых упаковок или банку с инструкцией по применению помещают в пачку из картона коробочного (рис. 1.).



Рис.1. Технология производства препарата.

Условия хранения. В сухом месте, при температуре от 12 до 20 0С.

Срок годности 2 года. По истечении срока годности препарат не применять. Условия отпуска из аптек и без рецепта.

Далее, выделение таких препаратов из поджелудочной железы животных называется Креон® [46-48]. Он содержит в активной форме главные ферменты, выделяемые железой, вместе с поджелудочным соком.

Креон®- выпускается в разных дозировках, для разных возрастных групп с целью эффективного лечения симптомов экзокринной недостаточности поджелудочной железы различной степени тяжести. Стандартное содержание ферментов. Креон®/Креон® 10 000. Панкреатин 150 мг (что соответствует: липазы – 10000 М.Ед., амилазы – 8000 М.Ед., протеаз – 600 М.Ед.). Капсулы в блистерах. Высокое содержание ферментов (для взрослых, страдающих муковисцидозом и после гастроэктомии, панкреатоэктомии). Креон®/Креон® 25 000. Панкреатин 300 мг (что соответствует: липазы – 25000 М.Ед., амилазы – 18000 М.Ед., протеаз – 1000 М.Ед.). Капсулы в блистерах. Методы определения содержания и стандартизации ферментов (рис. 2).



Рис.2. Лекарственная форма препарата Креон®

Качество и состав препарата должны отвечать требованиям, изложенным в соответствующей фармакопее. Для ферментных препаратов поджелудочной железы существуют различные фармакопеи и методы измерения (табл. 1).

Таблица 1

Креон® 10 000 активность фермента в соответствии с выбранной фармакопеей.

Креон® 10 000.	Липаза	Амилаза	Протеаза
Единицы Ph. Eur.	10,000	8,000	600
Единицы F. I. P.	10,000	8,000	600
Американская фармакопея	10,000	33,200	37,500

Ферменты – это чувствительные белки, теряющие со временем свою активность. Измеряемая ферментативная активность чаще всего превышает декларируемая. Это обеспечивает наличие минимальной необходимой активности к истечению срока годности препарата. По Европейской Фармакопее (European Pharmacopoeia, Third Edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997) один миллиграмм панкреатина содержит не менее одной европейской фармакопейной единицы общей протеолитической активности, 15 единиц липолитической активности и 12 единиц амилолитической

активности. Единицы активности протеазы, липазы и амилазы по Европейской Фармакопее эквивалентны фармакопейным единицам Франции (F.I.P.) и Великобритании (B.P.). Британский метод измерения «Панкреатина» учитывает наличие только свободной активности протеазы, так как стадия энтерокиназной активации, необходимая для высвобождения зимогенсвязанной протеазы, при этом методе отсутствует. Тем не менее, общая активность протеазы для «Экстракта поджелудочной железы» измеряется Европейской Фармакопеей как свободная, так и зимогенсвязанная формы протеазы, т.е. общая протеазная активность. Фармакопея США U.S.P. отличается от Европейской в определении единиц измерения амилазы и протеазы. Европейская единица активности липазы приблизительно соответствует фармакопейной единице США.

Полученные данные показывают способ перевода единиц различных фармакопеей. Тем не менее, процесс изготовления и следовательно состав фермента, одинаков для каждого препарата, хотя официально обозначенная активность ферментов зависит от соответствующей фармакопеей (British Pharmacopoeia 1993, vol. 1. London: HMSO, Martindale: The Extra Pharmacopoeia, Thirty-first Edition, London, Royal Pharmaceutical Society 1996).



Рис.2. Основные стадии процесса производства препарата Креон®

Сырье, измельчение и производство суспензии, активным веществом Креона® является «Панкреатин F», производимый в соответствии с недавно разработанной технологией. Современная технология производства позволяет получить более высокую ферментативную активность в меньшем количестве панкреатина по сравнению с предыдущим «Панкреатином T» с помощью преципитации.

После ветеринарной инспекции на мясоперерабатывающих предприятиях у здоровых свиней изымаются поджелудочные железы и хранятся при температуре -20°C . Впоследствии сырье доставляется на фармацевтические предприятия и хранится там, в холодильных камерах. Замороженные железы измельчаются и суспензируются в растворе бикарбоната натрия с изопропиловым спиртом для предотвращения потери ферментативной активности.

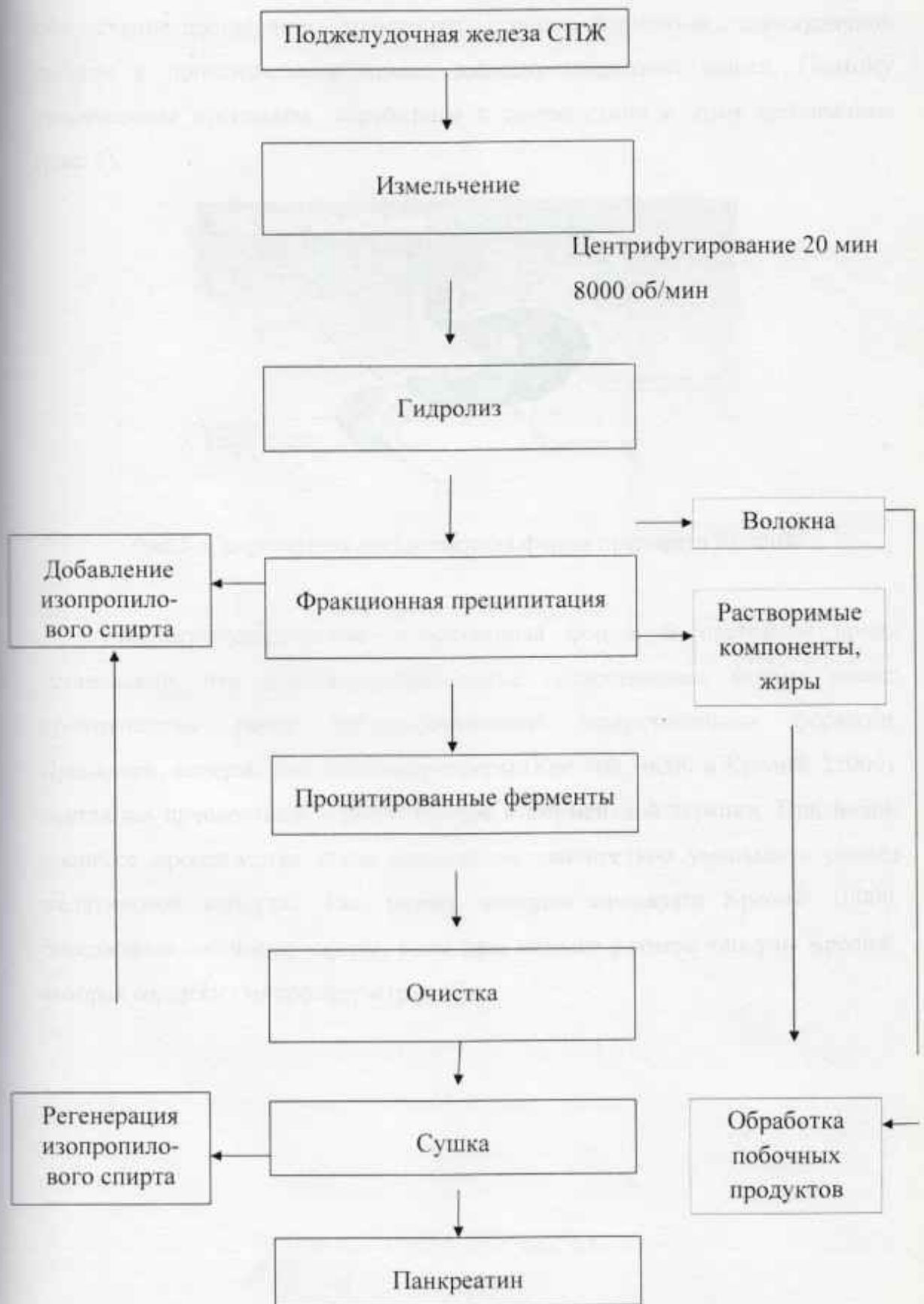
Гидролиз. Далее суспензия перемещается в гидролизные камеры, где в течение нескольких часов перемешивается. После завершения гидролиза, концентрация изопропилового спирта возрастает, а температура снижается

для прекращения процесса гидролиза. Полученная суспензия перемешивается для лучшего удаления волокон и нерастворимых компонентов. Впоследствии волокна отделяются из суспензии с помощью фильтрации. Полученная суспензия помещается в камеру для перемешивания, увеличивается концентрация изопропилового спирта для преципитации ферментов, которые отделяются от жидкой фазы. Твердая фаза обрабатывается чистым изопропиловым спиртом для удаления остатков и уменьшения содержания воды (Peschke, G.Solvay Pharmaceuticals GmbH, Dataonfile 2000).

Финальная стадия процесса, панкреатин высушивается в вакуумной сушке для удаления остаточной жидкости (изопропилового спирта и воды). Сухой продукт помещается в контейнеры из нержавеющей стали (рис. 4).

Характеристики современного ферментного препарата поджелудочной железы. Общими требованиями к любому современному препарату являются качество, безопасность и соотношение «стоимость/эффективность». Качество ферментного препарата определяется содержанием ферментов и стабильностью их активности, что необходимо для адекватной терапии экзокринной недостаточности поджелудочной железы. Аспект безопасности особенно важен, учитывая назначение ферментных препаратов новорожденным, детям и пожилым людям. Препараты ферментов поджелудочной железы признаны нетоксичными и безопасными, с очень малым количеством незначительных побочных явлений, которые даже не всегда связаны с приемом препарата, а часто являются симптомами основного заболевания: диарея, дискомфорт в животе или гиперурикозурия. Адекватная терапия ферментными препаратами экзокринной недостаточности поджелудочной железы требует современных препаратов, обладающих высокой эффективностью и приемлемой стоимостью[50].

Рис.4. Схема выделения препаратов панкреатина из поджелудочной железы СПЖ в процессах производстве.



Основной целью заместительной ферментной терапии является обеспечение достаточного количества активных ферментов поджелудочной железы в проксимальном отделе двенадцатиперстной кишки. Поэтому современные препараты разработаны в соответствии с этим требованием (рис. 5).

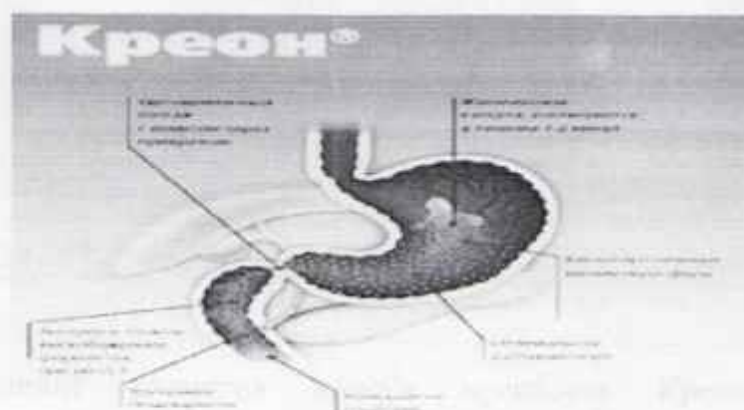


Рис.5. Современная лекарственная форма препарата Креон®

Микрогранулированная лекарственная форма. В настоящее время установлено, что микрогранулированные лекарственные формы имеют преимущество перед таблетированными лекарственными формами. Препараты, содержащие минимикросферы (Креон® 10000 и Креон® 25000), считаются препаратами первого выбора в ферментной терапии. При новом процессе производства стало возможным значительно уменьшить размер желатиновой капсулы. Так, размер капсулы препарата Креон® 10000, содержащей минимикросферы, в два раза меньше размера капсулы Креон®, которая содержит микросферы (рис. 6).

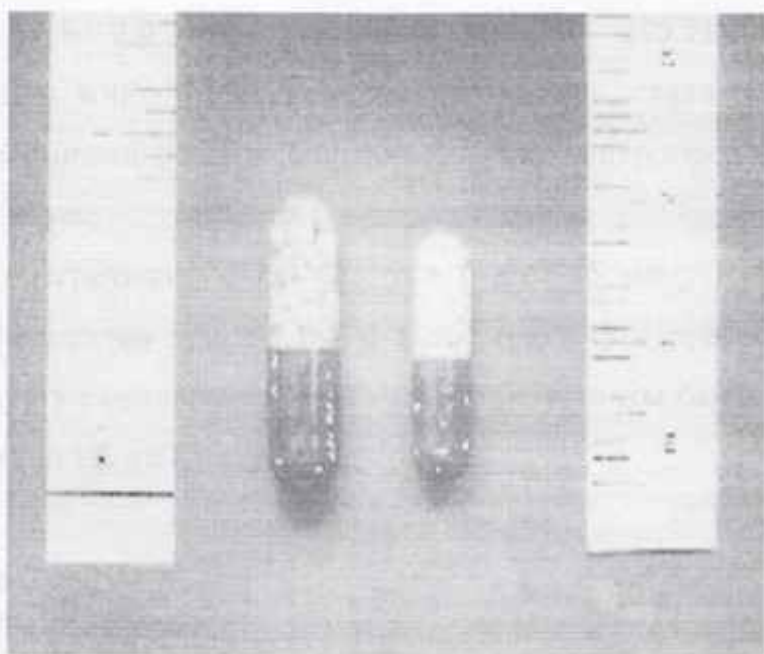


Рис.6. Сравнение размеров капсул препарата Креон® 10 000 Минимикросферы ТМ (капсула меньшего размера) и стандартного препарата Креон® (увеличение 2х).

После высвобождения из желатиновой капсулы (которая растворяется через 1-2 минуты), множество минимикросфер равномерно распределяется в желудке и, смешиваясь с химусом, увеличивает пищеварительный потенциал за счет большей поверхности соприкосновения с химусом.

Размер микросфер и минимикросфер. В ряде научных работ была доказана важность размера микросфер для достижения высокой доступности фермента во время фазы пищеварения в двенадцатиперстной кишке. Для прохождения из желудка через привратника вместе с твердой пищей частицы должны иметь диаметр 1.4 ± 0.3 мм. При применении препаратов, содержащих частицы диаметром 1.8 – 2.2 мм, например, мини таблеток со стандартным размером 2.0 мм, начало липолитической активности задерживается во времени по сравнению с микросферами диаметром 1.0 – 1.2 мм (>120 мин; дыхательный тест с холестерол-14С-октаноатом). Эффективность минимикросфер, по сравнению с микросферами большего

диаметра (1.8 – 2.0 мм), увеличена на 25% (10,11). Эти данные, подтвержденные дополнительными исследованиями, стали основанием для производства минимикросфер. Большинство минимикросфер имеет диаметр между 1.0 и 1.2 мм.

Креон обеспечивает очень быстрое (через 45 минут) высвобождение более 90% ферментов при pH 5.5 и выше (рис. 7) и превосходит в этом отношении другие препараты. Аналогичные результаты были получены и в исследованиях *in vitro* с Креон 25 000 (рис. 8).

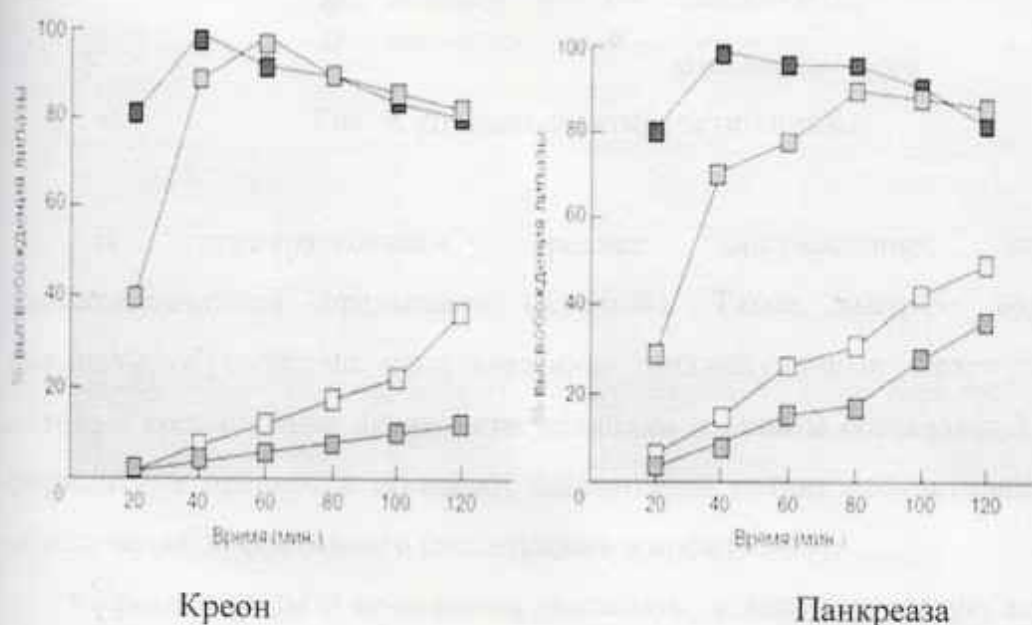


Рис. 7-8. Характеристики растворимости, выраженные как процент высвобождения липазы при pH от 4.5 до 6.0.

Для расщепления жиров оптимальным является соотношение колипазы к липазе минимум 1.0. Соотношение ниже 1.0, или дефицит колипазы (Huweletal. 1996), снижает активность липазы (рис.9.).

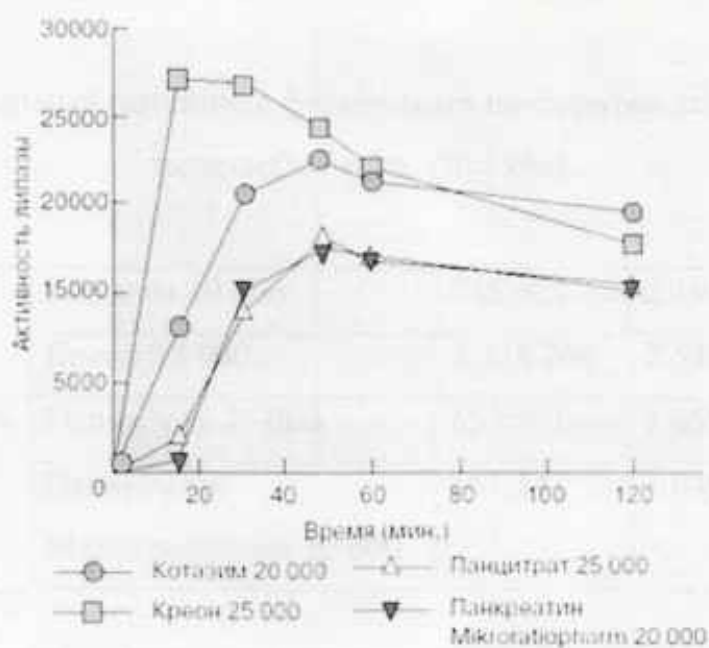


Рис. 9. Динамика активности липазы.

В препарат котазим среднее соотношение активности «колипаза/липаза» превышало (Креон®). Такое высокое содержание колипазы обусловлено использованием поджелудочных желез свиней, у которых соотношение активности колипазы и липазы составляет 2-4. Такие ферментные препараты обладают достаточной колипазной активностью для обеспечения эффективного расщепления жиров [43-49].

Кроме липазы и ее кофактора колипазы, в липолитическую активность поджелудочной железы вносит свой вклад карбоксилэстерлипаза (CEL; липаза, стимулируемая солями желчных кислот) и фосфолипаза A₂. Достаточно важно, чтобы содержание карбоксилэстерлипазы было высоким, однако существующие ферментные препараты значительно различаются в этом отношении. Креон® - один из препаратов с высоким содержанием карбоксилэстерлипазы и фосфолипазы A₂ (табл. 2).

Пищеварительный потенциал ферментных препаратов поджелудочной железы (Huwelet. Al. 1996).

Липаза (ед)/ доза*минуты, %	Котазим 20 000	946 624	2 194 404	100.0
	Креон 25 000	1 328 760	2 539 430	119.1
	Панцитрат 25 000	657 801	1 658 971	53.1
	Панкреатин	651 541	1 649 841	75.2
	Microratiopharm 20 000			

Примечание: Препарат Показатель (абсолютный) Показатель (относительный)*.

* - Значение за 1 час стандартизовано на 20 000 единиц активности липазы относительно Котазима 20 000 (=100%).

Препарат Креон® соответствует всем требованиям, предъявляемым к эффективному современному препарату для заместительной ферментной терапии. Например, Креон® 25 000 имеет самый высокий пищеварительный потенциал по сравнению с другими ферментными препаратами табл.3. Нутритивный статус каждого пациента, несомненно, важен для прогноза заболевания. Улучшение процессов пищеварения может облегчить течение заболевания, уменьшить количество осложнений, улучшить состояние легких при муковисцидозе, что приведет к увеличению средней продолжительности жизни. В частности, адекватное питание, обучение больного, его родственников правильной диете влияет на продолжительность жизни. Плохое питание и/или задержка развития в настоящее время просто неприемлемы. Больным муковисцидозом требуется обычная диета без каких-либо специальных ограничений для предупреждения энергетического дефицита, возникающего, в конечном итоге, при неадекватном питании, усиленной дефекации и увеличении энергетических потребностей организма. Последнее, но очень важное положение. Ранняя диагностика и раннее начало

лечения муковисцидоза снижают уровень смертности и способствуют психологической и социальной адаптации.

В этом отношении Креон® обладает оптимальным соотношением «стоимость/эффективность» для лечения не только муковисцидоза, но и других заболеваний поджелудочной железы. Большинство больных с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, по нашей информации, получают адекватное лечение современными ферментными препаратами. От 5% до 10% больных не реагируют или слабо реагируют на терапию ферментами поджелудочной железы, возможно, из-за низких значений рН в желудочно-кишечном тракте. Таким больным может помочь адьювантная терапия Н₂-антагонистами или ингибиторами протонной помпы. Тем не менее, из-за высокой стоимости и возможного побочного действия этих препаратов, регулярное их назначение не рекомендуется.

3. Физико-химические свойства ферментов поджелудочной железы

Хотя физико-химические свойства большинства ферментных комплексов поджелудочной железы хорошо изучены, полностью механизм их катализа во многом остается неясным, нет какой-либо обобщающей концепции их действия. Отсутствие четких представлений о механизме функционирования ферменты является основной причиной, затрудняющей расшифровку специфичности их действия. Тем не менее, амилазы в основном однокомпонентные ферменты со сравнительно низкой молекулярной массой (в пределах 23-25кДа), их молекулы являются одномерными субъединицами, большинство из них – внеклеточные ферменты, что позволяет их легко извлекать из среды и очищать [40-41].

Литературные данные по определению величин рН, их влияния на активность ферментов, расчет теплоты ионизации, исследование фотоокисления позволили установить, что в расщеплении гликозидных

ингибированной сопряженной атаки нуклеофильных и электрофильных групп активного центра фермента. Развита идея об идентичности механизма катализа исследуемого карбогидраза. Специфичность действия ферментов связана с различными механизмами образования фермент-субстратных комплексов.

Кислотоустойчивость. Панкреатическая липаза очень восприимчива к воздействию кислоты и необратимо инактивируется при $\text{pH} < 4.0$. Поэтому кислотоустойчивые препараты являются средством выбора в лечении различных форм экзокринной недостаточности поджелудочной железы по сравнению с кислотонеустойчивыми (традиционными) лекарствами. Минимикросферы препарата Креон® имеют очень эффективное покрытие, устойчивое к кислоте. Так, стандартный Креон® показал большую резистентность к воздействию кислоты (98%), чем Панкреаза®.

Растворимая в кишечнике оболочка Креона® состоит из фталата-гидроксипропил-метилцеллюлозы (HP 55), тогда как оболочка минитаблеток содержит кополимеры метакриловой кислоты. Кополимеры, по всей вероятности, ответственны за развитие фиброзной колонопатии.

Растворимость. Эффективные ферментные препараты должны быстро высвобождать ферменты (>80%) при попадании в среду с $\text{pH} 5.5$ и выше.

pH оптимум и стабильность. По молекулярным весам трипсина представляет однородной группа со значения, лежащие для большинство из них в пределах 23800 Да [В.В. Мосолов, 1971]. Несколько выделяется из общей группы химотрипсиноген С, молекулярный вес которого, определенной с помощью ультрацентрифуги, равен приблизительно 30 000. В то же время определение молекулярного веса методом гелевой фильтрации дало величину 23 000. Хотя причины этих расхождений в прошедшее время не ясны, более низкое значение лучше согласуется с величиной

связей в олиго- и полисахаридах принимают участие карбоксильная и имидазольная группа активного центра ферментов. В представлениях о механизме разрыва гликозидных связей использован принцип ориентированной сопряженной атаки нуклеофильных и электрофильных групп активного центра фермента. Развита идея об идентичности механизма катализа исследуемого карбогидраза. Специфичность действия ферментов связана с различными механизмами образования фермент-субстратных комплексов.

Кислотоустойчивость. Панкреатическая липаза очень восприимчива к воздействию кислоты и необратимо инактивируется при $\text{pH} < 4.0$. Поэтому кислотоустойчивые препараты являются средством выбора в лечении различных форм экзокринной недостаточности поджелудочной железы по сравнению с кислотонеустойчивыми (традиционными) лекарствами. Минимикросферы препарата Креон® имеют очень эффективное покрытие, устойчивое к кислоте. Так, стандартный Креон® показал большую резистентность к воздействию кислоты (98%), чем Панкреаза®.

Растворимая в кишечнике оболочка Креона® состоит из фталата-гидроксипропил-метилцеллюлозы (HP 55), тогда как оболочка минитаблеток содержит кополимеры метакриловой кислоты. Копolíмеры, по всей вероятности, ответственны за развитие фиброзной колонопатии.

Растворимость. Эффективные ферментные препараты должны быстро высвобождать ферменты (>80%) при попадании в среду с $\text{pH} 5.5$ и выше.

pH оптимум и стабильность. По молекулярным весам трипсина представляет однородной группа со значения, лежащие для большинство из них в пределах 23800 Да [В.В. Мосолов, 1971]. Несколько выделяется из общей группы химотрипсиноген С, молекулярный вес которого, определенной с помощью ультрацентрифуги, равен приблизительно 30 000. В то же время определение молекулярного веса методом гелевой фильтрации дало величину 23 000. Хотя причины этих расхождений в прошедшее время не ясны, более низкое значение лучше согласуется с величиной

молекулярного веса активного фермента и с предполагаемым механизмом активации зимогена.

Бычий трипсин представляет собой белки с сильно выраженными основными свойствами с положением изоэлектрической точки около рН 10.5. Некоторые ферменты оказываются способными к саморегуляции рН среды. Так, различных химотрипсин и химотрипсиноген, они могут быть разделены в этом отношении на две группы. При этом сначала происходит образование органических кислот и когда кислотность среды достигает определенной величины, то в действие вступают ферментные системы, способствующие образованию из кислот нейтральных продуктов, в частности, спиртов [15-17].

Протеолитические ферменты можно разделить на кислые, слабокислые, нейтральные, слабощелочные и щелочные. К кислым относятся протеазы, проявляющие максимум активности при рН 1.7-3.0, к слабокислым -4.0-6.0, к нейтральным -6.5-7.5, к слабощелочным -7.5-8.0, к щелочным при рН выше 8.0-8.5.

Температурный оптимум и стабильность. Следует отметить, что множество факторов могут оказать влияние на стабильность трипсина, включая: чистоту препарата, влияние температур, рН, субстрат и др. Высокая способность трипсиногена к обращению денатурации проявляется также при температурных воздействиях. Трипсин полностью денатурированный нагреванием при 70-100 °С в отсутствие солей, при последующем охлаждении неотличим от исходного белка по своей растворимости и потенциальной активности.

Изучение кинетики реакций гидролиза различных субстратов в присутствии трипсина и химотрипсина позволяет детально охарактеризовать те специфические требования, которые предъявляет ферменты к строению молекулы субстрата.

Трипсин свободный от примеси химотрипсина, способен гидролизовать с заметной скоростью некоторые связи ароматических аминокислот в белках.

Таким образом, в этом главе характеристика ферментных комплексов поджелудочной железы, использование фармацевтикой промышленности ферментных комплексов поджелудочной железы и физико-химические свойства ферментов поджелудочной железы.

ГЛАВА II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

1. Получение и определение активности ферментов

В работе использовали поджелудочной железы (СПЖ) крупного рогатого скота и медицинский панкреатин с протеиназной активностью 3500 Ед/гр ферментного препарата.

Образец брали СПЖ крупного рогатого скота и готовили суспензии от 50мл до 500мл, т.е. 100 гр размороженной измельченной СПЖ крупного рогатого скота гомогенизировали с дистиллированной водой количестве 50, 100, 200, 300, 400 и 500мл. В полученную суспензию добавляли 96% этилового спирта в количестве 5 %.

Гидролиз 10 %-ного раствора медицинский панкреатин (сухой белкового экстракт) в колбе при соотношении фермент-субстрат комплекс 1:10 (по белку) 40°C и рН-6.5 в течение 5ч. Протеолитическую активность СПЖ определяли модифицированным методом Ансона.

Определение протеолитической активности осуществляли по модифицированному методу Ансона и ГОСТу – 20264.2-88. За единицу (Ед) протеолитической активности принимали способность фермента превращать 1%-ный раствор казеина в не осаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве, соответствующем 1 мкмоль тирозина за 1 мин при температуре 30°C и рН-5.5 [6].

Для определения температурного оптимума фермента, реакцию смесь фермента с субстратом в 0.05 М фосфатном буфере рН 6.5 инкубировали в течение 20 мин в интервале температур от 10-50°C, затем определяли количество прогидролизованного казеина.

СПЖ для гидролиза готовили путем измельчения поджелудочной железы и ее гомогенизации с водой в соотношении 2:1 (мас.). Ферментный комплекс СПЖ крупного рогатого скота предварительно активировали

инкубированием при 45 °С в течение 1.5 ч и при 50 °С в течение 2 ч соответственно.

2. Определение некоторых физико-химических свойств ферментов

Оптимальные значения рН, для проявления активности ферментов, определяли с использованием 1%-ного раствора крахмала в 0.05 М ацетатном буфере (рН 3.5-5.5), 0.05 М фосфатном буфере (рН 6.0-8.0), 0.05 М NaHCO_3 буфере (рН 8.5-11.5) при температуре 30 °С.

рН стабильность исследуемых ферментов определяли также как и в вышеуказанных значениях рН и буфере, выдерживанием ферментного раствора предварительно в определенных значениях рН буфера в течение 30 мин и определяли активность по отношению к растворимому крахмалу.

Для определения температурного оптимума фермента, реакцию смесь фермента с субстратом в 0.05 М фосфатном буфере рН 8.0 инкубировали в течение 10 мин при температуре в интервале от 10-80°С, и затем определяли количество прогидролизованного казеина.

Для определения стабильности ферментов к различным температурам, ферментный раствор без субстрата растворяли в 0.05 М фосфатном буфере рН 8.0 и инкубировали в течение 30 мин при различных интервалах температур от 5 до 80 °С.

Таким образом, получение и определение активности ферментов, некоторых физико-химических свойств поджелудочной железы крупного рогатого скота.

ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

1. Выделение ферментов и их предшественников

В настоящее время ферментных комплексов поджелудочной железы широко применяются в фармацевтической промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине, фармацевтике и пищевой промышленности. Применение препараты ферментов, полученные из тканей, поджелудочной железы и органов животных, предназначаются в основном для пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности определяется уровнем развития современной биотехнологии. Высокоочищенные ферменты используются для лечения различных ран, ожогов, для удаления некротических тканей с поверхности гнойных ран. Готовятся различные таблетки, эмульсии, аэрозоли и рассыпчатые формы лекарственных средств на основе протеолитических ферментов. Поэтому к ним предъявляются особо жесткие требования в отделении и получении [43, 46].

Кристаллический бычий трипсин (К.Ф. 3.4.4.4) получен впервые Нортропом и Кунитцем в 1931 г. из продажного препарата трипсина. При медленном нагревании до 25 °С холодного насыщенного раствора белка в сульфате аммония появлялись квадратные пластинки кристаллов трипсина. В 1933 г. те же авторы выделили из кислого экстракта ткани поджелудочной железы быка кристаллический белок, который превращался в присутствии трипсина в активный протеолитический фермент – химотрипсин (К.Ф.3.4.4.5). На следующий год Кунитц и Нортроп сообщили о выделении кристаллического предшественника трипсина – трипсиногена из маточной жидкости, оставшейся после кристаллизации химотрипсиногена.

Более перспективной является предложенная Лайнером в 1960 г. и детально разработанная Дэнноэлем с сотрудниками методика выделения

трипсиногена из маточного раствора после кристаллизации химотрипсиногена с помощью хроматографии на КМ-целлюлозе. Трипсиноген, очищенный хроматографически, значительно превосходит кристаллической по своей гомогенности, стабильности и потенциальной ферментативной активности. Кроме того, полученный таким путем трипсиноген свободен от примеси химотрипсиногена и трипсина, хотя и может содержать некоторое количество так называемых инертных белков. Чистый кристаллический трипсин был выделен из панкреаса индюка Рианом и другие в 1965 г. и Кисидой и Лайнером в 1968 г.

Несмотря на большие успехи, достигнутые в выделении и очистке протеолитических ферментов и их зимогенов из поджелудочной желез различных видов животных. Целый ряд проблем, связанных с чистотой и гомогенностью полученных препаратов, не решен. Практически все препараты кристаллического трипсина и химотрипсина, полученные до настоящего времени, не были однородными и содержали большее или меньшее количество неактивного материала. Негомогенность кристаллических препаратов ферментов неоднократно показано с помощью методов электрофореза, хроматографии и гельфильтрации.

В.В. Мосолов и Е.В. Лушникова предложили проводить очистку трипсина с помощью специфической адсорбции активного фермента на нерастворимом ингибиторе белковой природы. Препарат нерастворимого ингибитора может быть получен путем химического связывания природных ингибиторов трипсина из различных источников с целлюлозой или другими полимерными носителями. Процесс очистки включает три стадии: а). смешивание раствора фермента с нерастворимым ингибитором при нейтральном рН, в условиях, когда комплекс фермента с ингибитором обладает наибольшей устойчивостью; б). отделение соединения фермента с нерастворимым ингибитором с помощью центрифугирования; в). Разрушение соединения трипсина с ингибитором при кислом рН 3.0 [16].

Результаты очистки трех различных препаратов кристаллического трипсина с помощью описанного метода приведены ниже (табл.3).

Таблица 3

Очистки кристаллического трипсина

Трипсин (после очистки)	Ферментативная активность, мк· экв ОН ⁻ (мин/мг) белка	Выход по активности, %
I	50.6	100.0
II	40.2	79.4
III	73.8	145.8
IV	74.2	146.6

Панкреатин – это лекарственный препарат, в состав которого входят ферменты поджелудочной железы, участвующие в переваривании пищи. Он также стимулирует секрецию собственных пищеварительных ферментов органами желудочно-кишечного тракта, что позволяет применять этот препарат при многих заболеваниях органов пищеварения, а также при приеме жирной и трудно перевариваемой пищи здоровыми людьми.

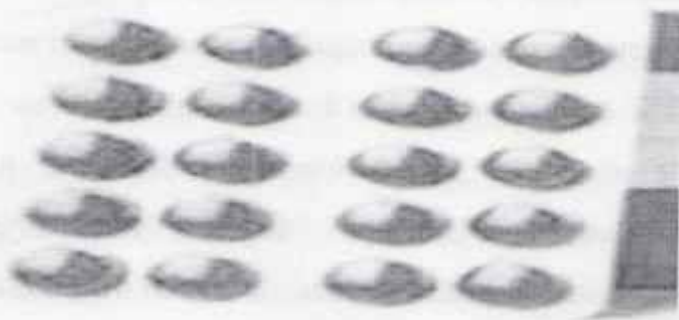


Рис. 10. Панкреатин инструкция – помощь пищеварению.

Механизм действия панкреатина. Панкреатин получают из поджелудочных желез свиней и крупного рогатого скота. В его состав входят ферменты амилаза (переваривает углеводы), липаза (переваривает жиры), протеазы (переваривают углеводы). Различными фармацевтическими компаниями панкреатин выпускается в виде таблеток, капсул и драже под названиями: биозим, вестал, гастенорм, зимет, креон, ликреаза, мезим, микрозим, пангрол, панзим, панзинорм, панкреазим, панкреалипаза, панкреаль, панкренорм, панкреон, панцитрат, пензитал, пролипаза, трифермент, фестал, энзистал, эрмитель [43-45]. Все эти препараты могут содержать как чистый панкреатин, так и всевозможные добавки в виде желчных кислот, желчегонных средств и так далее.

Кроме того, препараты, содержащие панкреатин, можно разделить по размеру частиц активного действующего вещества на обычные таблетки, драже или капсулы, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, которая позволяет препарату растворяться только в двенадцатиперстной кишке (в кислой среде желудка панкреатин теряет свои свойства) и микрогранулированные формы. Микрогранулированные формы (например, креон) представляют собой желатиновые капсулы, внутри которых находятся кислотоустойчивые шарики диаметром меньше 2 мм – это обеспечивает одновременное поступление препарата вместе с пищей в двенадцатиперстную кишку.

В инструкциях к лекарственным препаратам, содержащим панкреатин, обязательно указывается активность входящих в него ферментов – амилазы, липазы и протеаз (она может быть разной).

Механизм действия панкреатина основан на том, что входящие в его состав ферменты поджелудочной железы (липаза, альфа-амилаза, трипсин, химотрипсин) расщепляют белки до аминокислот, жиры - до глицерина и жирных кислот, углеводы - до простых сахаров. Это улучшает процесс пищеварения в целом (в том числе усвоение пищи), снимает нагрузку с органов желудочно-кишечного тракта и улучшает их функциональное

состояние. При различных заболеваниях поджелудочной железы с нарушением ее функции препараты, содержащие панкреатин, компенсирует недостаточную секрецию пищеварительного сока и стимулируют секрецию собственных ферментов поджелудочной железы. Кроме того, они стимулируют секрецию ферментов желудка, тонкого кишечника и желчи.

Показания и противопоказания. Панкреатин применяется при многих заболеваниях органов пищеварения, которые сопровождаются нарушением процесса переваривания пищи:

- при заболеваниях, сопровождающихся снижением выделения пищеварительных ферментов поджелудочной железы, – хроническом панкреатите и муковисцидозе;
- при заболеваниях, сопровождающихся снижением выделения пищеварительных ферментов желудка, кишечника, печени;
- для улучшения переваривания пищи у людей с нормальной функцией органов пищеварения при употреблении жирной, трудно перевариваемой пищи, нарушении процесса жевания или при длительном нахождении в вынужденном положении, когда нарушается двигательная активность кишечника;
- для уменьшения газообразования в процессе подготовки к рентгенологическому и ультразвуковому исследованию желудка, кишечника и других органов брюшной полости.

Применение панкреатина противопоказано при индивидуальной непереносимости его компонентов, а также при острых заболеваниях органов пищеварения – остром панкреатите, обострении хронического панкреатита, остром гепатите и кишечной непроходимости.

Панкреатин не оказывает тератогенного (аномалий развития плода) действия, тем не менее, беременным женщинам его рекомендуется применять с осторожностью, так как полных клинических испытаний на беременных женщинах этого препарата проведено не было. С осторожностью его применяют и при кормлении ребенка грудью.

Побочные эффекты. Панкреатин очень редко дает побочные эффекты, тем не менее, их нужно знать, так как этот препарат пациенты часто принимают самостоятельно, без назначения врача. Так, со стороны желудочно-кишечного тракта панкреатин может вызывать запоры (чаще) или поносы, тошноту, неприятные ощущения в области желудка. У детей при длительном применении панкреатина возможно раздражение кожи вокруг заднего прохода. Со стороны обмена веществ при длительном применении в больших дозах возможно повышение содержания мочевой кислоты в крови. Возможны также аллергические реакции в виде кожной сыпи, крапивницы, чихания и слезотечения.

2. Получение и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота

В настоящее время, наиболее эффективным методом получения высокопродуктивных фармацевтических ферментных комплексов поджелудочной железы активных соединений. На первых стадиях выделения ферментных белков, необходимо было освободиться от большого количества сопутствующих и неактивных белков, свободных аминокислот, углеводов и других веществ, содержащихся в СПЖ. Выделение ферментных препаратов из упаренных фильтратов, центрифугирование и экстрактов осуществляют при помощи этанола, ацетона, изопропилового спирта или их смесей, концентрация растворителя обычно подбирается таким образом, чтобы в осадок выпадало основное количество выделяемого фермента. С целью стабилизации ферментных комплексов при упаривании и осаждении органическими растворителями добавляют ацетат кальция [51].

В литературе много сообщений об успешном применении различных природных полисахаридов в качестве сорбентов для получения ферментных комплексов поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Для отделения активных ферментных комплексов использовали поджелудочной железы (СПЖ) крупного рогатого скота и медицинский панкреатин с протеиназной активностью 3500 Ед/гр ферментного препарата.

В данной работе нами был предпринят иной подход, где ферментного активностью СПЖ крупного рогатого скота и готовили суспензии от 50мл до 500мл, т.е. 100 гр размороженной измельченной СПЖ крупного рогатого скота гомогенизировали с дистиллированной водой количестве 50, 100, 200, 300, 400 и 500мл. В полученную суспензию добавляли 96% этилового спирта в количестве 5 % (табл. 4).

Протеолитическая активность ферментных комплексов СПЖ
крупного рогатого скота.

Разбавления	Протеолитическая активность, Ед/гр
0,5	0,9±0,15
1,0	1,6±0,1
2,0	2,5±0,05
3,0	3,8±0,15
4,0	4,4± 0,2
5,0	4,1± 0,1

Полученные данные показывают, что для получения активной СПЖ крупного рогатого скота следует брать суспензии 400мл фермент-субстрат комплекс 1:10 (по белку) 40°C и рН-6.5 в течение 5 часов.

Научно-исследовательские работы по выделению, очистке и изучению свойств индивидуальных ферментов, показали их исключительную специфичность, а иногда широкую, а также высокую эффективность. Именно высокая активность и исключительно узкая субстратная специфичность очищенных ферментов в отношении полисахаридов позволяет использовать их в различных областях биологической и клинической химии, а также в аналитической практике.

Использование протеолитических ферментов гетерогенного характера в производственных условиях, а также в процессе и их хранения фермента. Предполагается, что свежее приготовление препараты также претерпевают

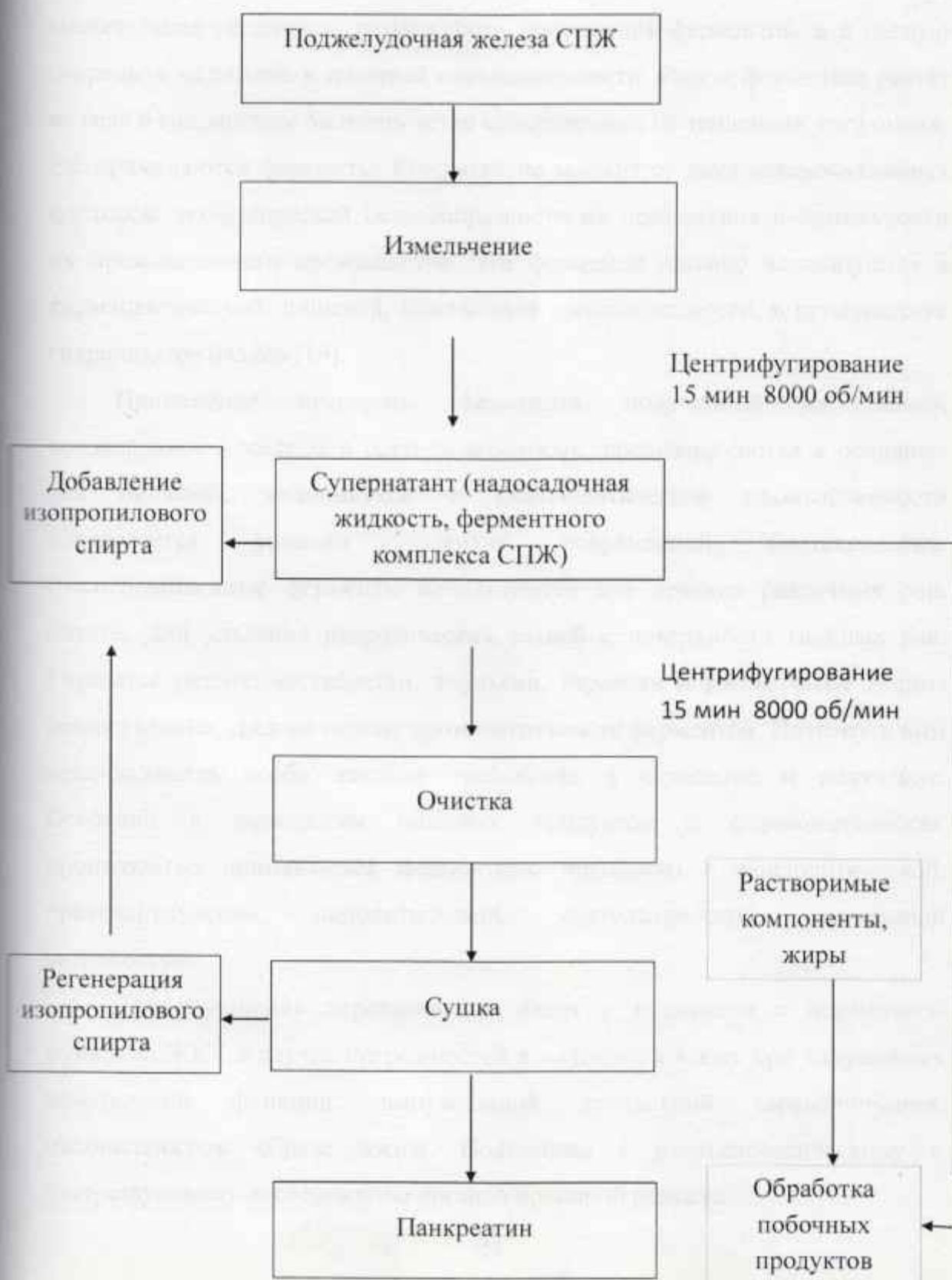
протеолиз. Удаление других ферментов и очистка протеолитического белка осуществляется только в процессе очистки фермента.

В промышленности не всегда используется высокоочищенных, кристаллических трипсин, возможно эффективное использование комплексных и частично очищенных ферментов. Последние годы новые перспективы использования частично очищенных панкреатин в различных видов животных.

В литературе встречаются различные методы получения высокоочищенный и кристаллический бычий панкреатин [Linden Aetal., 2000, Yuar Fetal., 2003, Wang Letal., 2006].

Таким образом, для эффективных способов получение и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота обладающих наибольшей активностью ферментных комплексов.

Рис.11. Схема выделения препаратов панкреатина из поджелудочной железы СПЖ в лабораторных условиях



3. Определение активности ферментного комплекса

В последние годы ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительнее расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства. Эти ферменты широко используются в фармацевтической, пищевой, кожевенной промышленности, в производстве гидролизатов белков [19].

Применение препараты ферментов, полученные из тканей, поджелудочной железы и органов животных, предназначаются в основном для пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности определяется уровнем развития современной биотехнологии. Высокоочищенные ферменты используются для лечения различных ран, ожогов, для удаления некротических тканей с поверхности гнойных ран. Готовятся различные таблетки, эмульсии, аэрозоли и рассыпчатые формы лекарственных сред на основе протеолитических ферментов. Поэтому к ним предъявляются особо жесткие требования в отделении и получении. Особенно в технологии пищевых продуктов и фармацевтических производство применяются ферментные препараты с амилалитической, протеолитической, липолитической, пектолитической, оксидазной активностью.

Для улучшения переваривания пищи у пациентов с нормальной функцией ЖКТ в случае погрешностей в питании, а также при нарушениях жевательной функции, вынужденной длительной иммобилизации, малоподвижном образе жизни. Подготовка к рентгенологическому и ультразвуковому исследованию органов брюшной полости.

Следующие исследования определено активации ферментного комплекса крупного рогатого скота. В результате проведенной работе, видно активация ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота обладал протеолитической активностью 8.6 константа активации.

Таблица 5

Значения активации ферментного комплекса СПЖ и панкреатина

Вид	Температура, °С	Активация ферментного комплекса (константа активации, $K_a \cdot 10^2$, 10 минут)
СПЖ крупного рогатого скота	30	4,7± 0,32
	35	8.6± 0,4
	40	5,2± 0,26
Сухой панкреатин	30	2,8±0,15
	35	3,1±0,25
	40	2,4±0,2

Таким образом, сравнивая данные по активности ферментных препаратов СПЖ с сухим панкреатином с протеиназной активностью 3500 Е/г, можно отметить, что ферментного комплекса СПЖ в 1.2 раз активно, чем в исследуемой препарат панкреатин. Этот препарат можно использовать для получения ферментного гидролизата из животного сырья в сравнительно мягких условиях.

4. Изучение влияния рН и температуры на активности полученных комплексов

В связи с тем, что ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота отличаются физико-химическими и каталитическими свойствами, особенно в начальных и конечных этапах гидролиза, становится необходимым индивидуальный подбор метода для каждого типа фермента.

Изучены температуры и рН оптимумы действия на активность и стабильность ферментного комплекса [13-16].

Помимо рН и температурного оптимума, удаления балластных белков и очистки ферментных комплексов СПЖ крупного рогатого скота.

В следующих сериях экспериментах для характеристики и сравнительного изучения полученных очищенных ферментных препаратов исследовали некоторые физико-химические и биохимические свойства, такие как, температурные и рН – оптимумы на их активности и т.д.

Исследования влияния рН на активность фермента проводили в диапазоне рН от 3,0 до 10, а также в интервале температур от 10 до 60 °С.

Полученные данные показано, что при комнатной температуре активность ферментов крупного рогатого скота практически не изменялась в течение 1-2 сут, в то время активность фермента в этих условиях очень сильно падала. Для характеристика полученного СПЖ крупного рогатого скота исследовали физико-химические свойства температурной и рН оптимум активность ферментного комплекса.

Влияние температуры на протеолитическую активность ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота показано, что максимальная активность ферментов изучали в интервале температур от 10 до 60 °С. Высокая активность фермента проявилась при температуре 40°С в течении 60 мин, при температуре 50°С сохранялось 25-30%, тогда как при 60 °С фермент сохранял лишь 3-6% активности от максимального. Как видно из рисунка протеолитическую активность ферментного комплекса СПЖ крупного

рогатого скота проявляла максимальную стабильность при низких температурах 10-20°C. При этом активность фермента сохраняла почти 90-100%-ную активность (рис. 12).

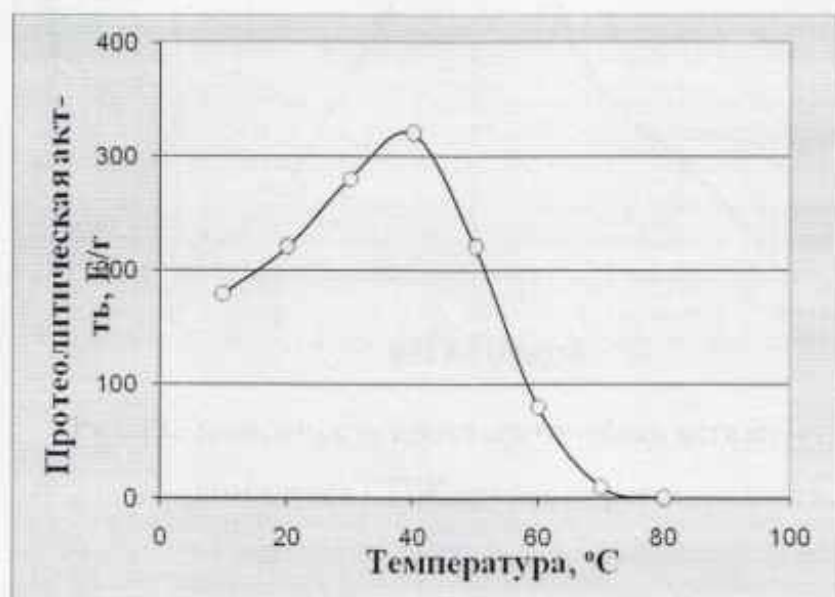


Рис. 12. Влияние температуры на протеолитическую активность ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота.

Зависимость протеолитическая активность ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота от рН среды показано на рис.13. Как видно из рисунков, что ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота рН оптимум 6.5.

В результате проведенной работе, видно активация ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота обладал протеолитической активностью 4600 Е/г, при температуре 40°C в течении 60 минут.

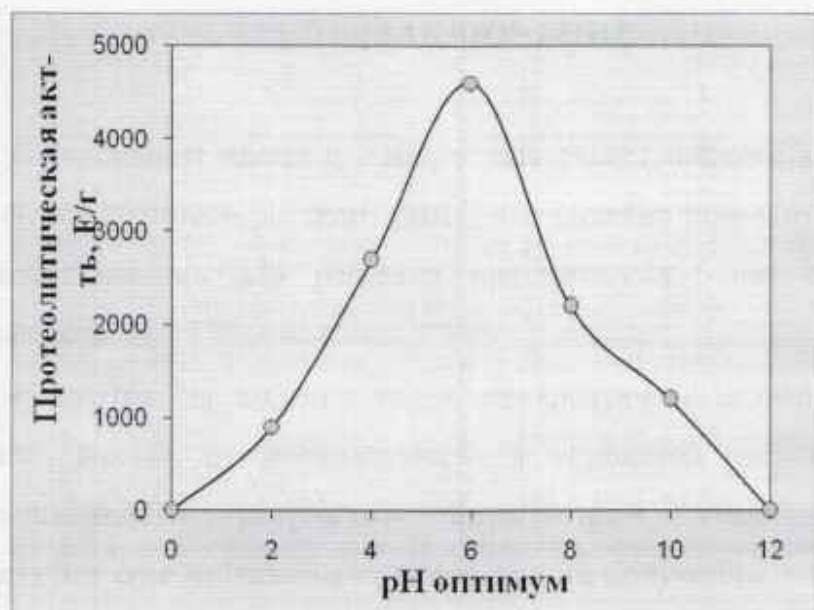


Рис.13. Зависимость протеолитическая активность ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота.

Таким образом, сравнивая данные по активности ферментных препаратов СПЖ с сухим панкреатином с протеиназной активностью 3500 Е/г, можно отметить, что ферментного комплекса СПЖ в 1.2 раз активно, чем в исследуемой препарат панкреатин. Этот препарат можно использовать для получения ферментного гидролизата из животного сырья в сравнительно мягких условиях. Изучены температурны и рН оптимумы действия на активность и стабильность ферментного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время в Узбекистане растет интерес к панкреатическим ферментам крупного рогатого скота, что вызвано широкими возможностями их использования для решения практических задач фармацевтических производств.

Несмотря на то, что среди панкреатических ферментов занимают высшее место и используются в производстве фармацевтических промышленности получения ферментного комплекса панкреатин, существуют еще множества проблем при их получении, очистке, хранения и д.т. Так, в данной работе получение и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Определение активности ферментного комплекса и изучение влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Таким образом, полученные данные по активности ферментных препаратов СПЖ с сухим панкреатином с протеиназной активностью 3500 Е/г, можно отметить, что ферментного комплекса СПЖ в 1.2 раз активно, чем в исследуемой препарат панкреатин. Этот препарат можно использовать для получения ферментного гидролизата из животного сырья в сравнительно мягких условиях. Изучены температуры и рН оптимумы действия на активность и стабильность ферментного комплекса.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке технологических регламентов получения недорогих, конкурентоспособных и импортозамещающих панкреатина поджелудочной железы крупного рогатого скота.

ВЫВОДЫ

1. В результате общая ферментативная активность СПЖ крупного рогатого скота самые выше 0,4 разбавления.
2. Определено и изучено факторы (влияние рН, температура) зависимость протеолитическая активность ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота, что ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота рН оптимум 6.5, а температура 40°C в течении 60 мин.
3. Определено активация ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота обладал протеолитической активностью 4600 Е/г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

I. Законы Республики Узбекистан.

1. Закон Республики Узбекистан «О лекарственных средствах и фармацевтической деятельности» №415-и от 25.04. 1997г.
2. Ўзбекистон Республикаси “Хусусий корхоналар тўғрисида”ги Қонуни. 11 декабр 2003 йил (Ўзгартириш ва қўшимчалар билан).

II. Постановления и указы Президента Республики Узбекистан, Постановления Кабинета Министров.

3. Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг қарори. Ўзбекистон Республикаси фармацевтика саноати («ЎЗФАРМСАНОАТ») давлат акционерлик концернининг уставини тасдиқлаш ҳақида. Вазирлар Маҳкамасининг 1993 йил 11 ноябрдаги 542-сон қарори.

III. Издания Президента И.А.Каримова.

4. Каримов И. А. «Ўзбекистон мустақилликка эришиш оstonасида» («Узбекистан на пороге достижения независимости») Т., 2011 г.
5. Каримов И. А. «Наша высшая цель - независимость и процветание родины, свобода и благополучие народа» Т., 2000г. 511 с.

IV. Основная литература

6. Виестур У.Э., Кузнецов А.М., Савеньков В.В., Системы ферментации. // Рига, Зинатне, 1986, 367 с.
7. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов. Киев:Наукова думка,1987,190 с.
8. Глемжа А.А., Людьюс Л.Л., Петрова Л.И., Микробные ферменты в народном хозяйстве.// Вильнюс, Мокслас, 1985, 188 с.
9. Грачева И.М., Технология ферментных препаратов. М: Агропромиздат, 1987, с. 335.
10. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Перевод с англ. Под ред. Антонова В.К. и акад. Браунштейна. М: Мир, 1989, Том 1.2, 801 с.

- 11.Егорова Н.С., Промышленная микробиология.// Москва, Высшая школа, 1989, 688 с.
- 12.Кислухина О.В., Микробиологическая промышленность, т.3, стр.3-8, 1971.
- 13.Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 1993. Т. 2. -С. 63-95.
- 14.Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология, Изд-во «Колос», Москва, 1970, 36-37 стр.
15. Мосолов В.В., Протеолитические ферменты, Изд-во «Наука», Москва, 1971, стр. 11-95.

V. Дополнительная литература:

- 16.Прист Ф., Внеклеточные ферменты микроорганизмов.// Москва, Мир, 1987, 117 с.
17. Фогарти В.М. Микробные ферменты и биотехнология. Москва, Агропромиздат, 1986, 318 с.

VI. Периодические издания, статистические сборники и отчеты:

- 18.ГОСТ 20264.2-74. Препараты ферментные. Метод определения протеолитической активности. – М.: 1975.
- 19.Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. О механизме каталитического действия карбогидраз. Прикл. биохимия и микробиология, 1999, Т.35, № 2, стр.123-132.
20. Жеребцов Н.А., Руадзе И.Д., Яковлев А.Н., О механизме кислотного и ферментативного гидролиза крахмала.// Прикл. биохимия и микробиология, 1995, Т.31, № 6, стр. 599-603.
- 21.Колтукова Н.В., Бондарчук А.А., Коваленко Э.А., Гетьман Е.И. Некоторые физико-химические свойства амилолитического комплекса *Bacillus mesentericus*. Прикл. Биохим. и микробиол.,1990, Т.26, № 1, стр.50-54.

22. Мосолов В.В., Белки ингибиторы протеаз и α -амилаз у растений. // Прикл. Биохимия и микробиология, 1995, Т.31, № 1, стр. 5-10.
23. Павлова И.Н., Кичакова Н.А., Захарова И.Я. // Всесоюз. Конф. «Методы получения, анализа и применения ферментов». Тез. Докл. Рига, 1990. С.34.
24. Рахимов М.М., Хасанов Х.Т., Очистка кислых протеиназ биоспецифической хроматографией. // Биотехнология, 1989, Т.5, № 2, стр. 189-193.
25. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Сербя Е.М., Трифонова В.В., Сравнительная характеристика микробных протеаз по степени гидролиза белковых субстратов. // Прикл. биохимия и микробиология, 1997, Т.33, № 1, стр. 43-48.
26. Adams, M.W.W.; Kelly, R.M. Finding and using thermopiles enzymes. Trends Biotechnol., 16: 329-332, 1998.
27. Barbaric S., Mrsa V., Ries B., Mildner P. Role of the carbohydrate part of yeast acid phosphatase. Arch. Bioch. And Biophys., 1984, v. 234, 567-575.
28. British Pharmacopoeia 1993, vol. 1. London: HMSO, Martindale: The Extra Pharmacopoeia, Thirty-first Edition, London, Royal Pharmaceutical Society 1996.
29. Chen J., Li D.Ch., Zhang Y.Q., Zhou Q.X. J. Gen. Appl. Microbiol., 2005, 51, 175-181.
30. European Pharmacopoeia, Third Edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997.
31. Fogarty W.M., Kelly C.T., Microbial Enzymes and Bioconversions. // J. Economic Microbiology, 1980, V.5, pp. 115-170.
32. Fogarty W.M., Kelly C.T., Microbial Enzymes and Biotechnology, 2nd edn, 1990, Elsevier Science Publishers, London.
33. Freedman R.B. Post-translational modification and folding of secreted proteins. Biochem. Soc. Trans., 1989, 331-335.
34. Freedman R.B. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. Cell, 1989, v.57, 1069-1072.
35. Ichikawa K., Tonozuka T., Tomita U.T., Akeboshi H., Nishikawa A., Sakano Y. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2004, 68, 413-420.

36. J.A. James, J.-L. Berger, B.H. Lee. *Current Microbiology*, 1997, Vol. 34, 186–191.
37. Kim M.S., Park J.T., Kim Y.W., Lee H.S., Nyawira R., Shin H.S., Park Ch.S., Yoo S.H., Kim Y.R., Moon T.W., Park K.H. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 3933–3940.
38. Moseley M.N., Keay L., J. *Biotechnol. And Bioeng.*, v.12, p. 251-271, 1970.
39. Palmer T., *Understanding enzymes*. // Ellis Horwood Publishers, Chichester, 1985, p. 411.
40. Schaumann K., Weide G. // *Hydrobiologia*. 1990. V. 204. P. 589-596.
41. Takasaki J. // *Agr. Biol. Chem*/ 1987. V. 51. №1. P. 9-16.
42. Zeikus, J.G.; Vieille, C.; Savchenko, A. *Thermozymes: Biotechnology and structure-function relationship*. *Extremophiles*, 1: 2-13, 1998.
43. Srivastava R.A.K. // *Enzyme. Microbiol. Technol.* 1984. V. 6. №9. P. 422-426.
44. Wellington Cristina Almeida do Nascimento; MeireLelisLeal Martins February 03, 2003.
45. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Returned to authors: June 03, 2003; Approved: March 04, 2003.
46. Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., Mohan R. *Advances in microbial amylases*. *J. Biotechnol Appl. Biochem.*, 2000, V.31, pp. 135-152.
47. Wijbenga D-J., Beldman G., Veen A., Binnema D.J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991. V. 35. P. 180-184.

VII. Интернет сайты:

48. www.google.ru.
49. <http://www.ihfz.ru/products/element/pancreatin>.
50. <http://www.golkom.ru/kme/19/3-243-3-1>.
51. <http://www.golkom.ru/kme/19/3-243-1-7>.
52. <http://www.lekhim.ua/products/pankreatin>.
53. <http://medicalplanet.su/farmacia/329>.

54. <http://medicalplanet.su/farmacia/329>, Linden Aetal., 2000.

55. <http://medicalplanet.su/farmacia/329>, Yuar Fetal., 2003.

56. <http://medicalplanet.su/farmacia/329>, Wang Letal., 2006.

ПРИЛОЖЕНИЕ

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Н.Х.Туксанова., К.Т.Нормуродова., Н.И.Бозоров.
Протеолитическая активность ферментного комплекса поджелудочной железы крупного рогатого скота. // *Фармацевтический журнал*, Ташкент, № 1, 2013, стр.59-62.
2. Н.Х.Туксанова., К.Т.Нормуродова. Технология получение фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Проф. М.А. Азизов таваллудининг 100 йиллигига бағишланган талабалар илмий жамиятининг анъанавий 70-илмий анжуман материаллари. Тошкент, 24-25 май, 2013 йил, 115 - бет.

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI SOG'LIQNI SAQLASH VAZIRLIGI
TOSHKENT FARMATSEVTIKA INSTITUTI

FARMATSEVTIKA JURNALI

*Jurnalga 1992 yilda asos solingan
Yilda 4 marta chiqadi*

№1. 2013

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

*Основан в 1992 г.
Выходит 4 раза в год*

TOSHKENT
2013

Х.Ж. Камбаров, У.М. Азизов, Х.К. Бекчанов

«ШАРҚ ТАБИБИ» КУРУК ЭКСТРАКТИНИ ОЛИШДА ВАКУУМ ОСТИДА БУҒЛАТИШ ВА ҚУРИТИШНИНГ ОПТИМАЛ ШАРОИТЛАРИНИ ТАҒЛАШ

Биобарин ушбу ишда усимлик хом ашёси биофасл моддаларининг сакланиб қолишини таъминлаб бера оладиган вакуумли буғлатиш ва қуритиш жараёнлари учун оптимал шарт-шароитларни тағлаш бўйича олиб борилган тадқиқотлар ва уларнинг натижалари баён этилган. Тадқиқот натижаларига кўра «Шарқ Табиби» курук экстрактини олишда буғлатиш ва қуритиш босқичларини мос равишда 70 ва 60°C да олиб бориш мақсадга мувофиқ деб топилди.

ЎзР А.Султонов номидаги кимё-фармацевтика илмий текшириш институти
Тошкент фармацевтика институти

25.01.2013 й.
қабул қилинди

УДК 582.280

Н.Х.Туксанова., К.Т.Нормуродова., Н.И.Бозоров

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В последние годы ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, в таких как, фармацевтической, пищевой, кожевенной и в производстве гидролизатов белков, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства [1].

Ферменты также применяется для улучшения переваривания пищи у пациентов с нормальной функцией ЖКТ в случае погрешностей в питании, а также при нарушениях жевательной функции, вынужденной длительной иммобилизации, малоподвижном образе жизни, подготовка к рентгенологическому и ультразвуковому исследованию органов брюшной полости [2].

Данная работа проведена с целью разработки способа получения и изучения активности

ферментного комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота, обладающего выраженной протеолитической активностью, которая достигается за счет увеличения выхода действующих веществ.

Экспериментальная часть

В работе использовали поджелудочную железу (СПЖ) крупного рогатого скота и медицинский панкреатин с протеиназной активностью 3500 Ед/гр ферментного препарата.

На основе образцов СПЖ крупного рогатого скота и готовили суспензии от 50мл до 500мл. При этом 100 гр размороженной измельченной СПЖ крупного рогатого скота гомогенизировали с дистиллированной водой в количестве 50, 100, 200, 300, 400 и 500 мл. В полученную суспензию добавляли 96% этилового спирта в количестве 5%.

Гидролиз 10 %-ного раствора медицинского панкреатина (сухой белковый экстракт) проводили в колбе при соотношении фермент-субстрат комплекс 1:10 (по белку) 40° С и pH-6.5 в течение 5 ч.

Определение протеолитической активности осуществляли по модифицированному методу Ансона и ГОСТу – 20264.2-88. За

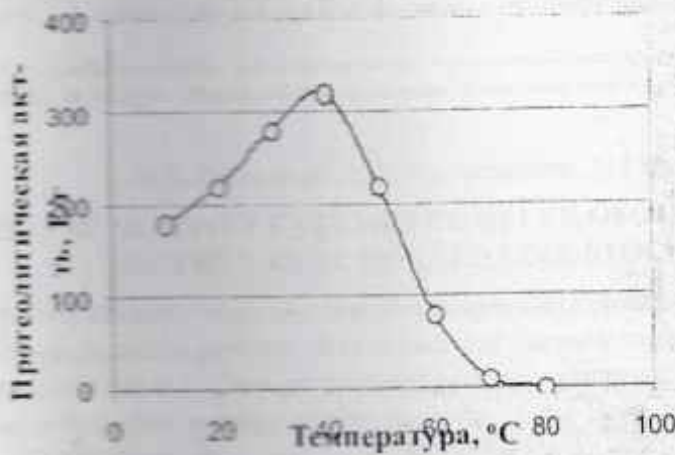


Рис. 1. Влияние температуры на протеолитическую активность полученного ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота.

Зависимость протеолитической активности ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота от pH среды показано на рис.2. Как видно из рисунка, ферментной

комплексе СПЖ крупного рогатого скота достигает высокую протеолитическую активность pH оптимум 6.5.

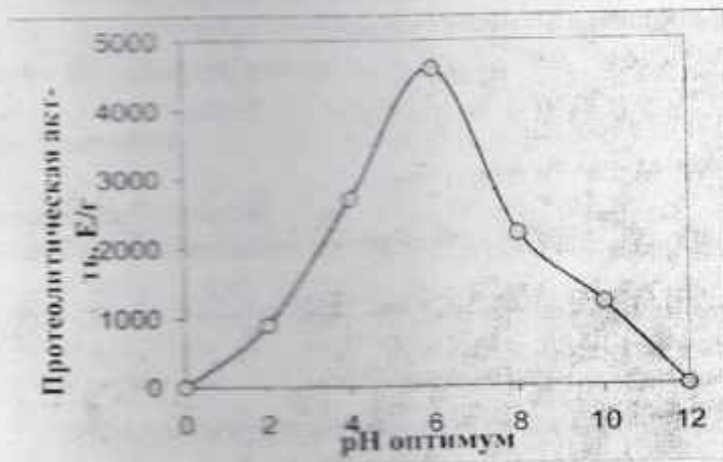


Рис. 2. Зависимость протеолитической активности ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота.

В результате видно активация ферментного комплекса СПЖ крупного рогатого скота обладает протеолитической активностью 4600 E/g.

Таким образом, сравнивая данные по активности ферментных препаратов СПЖ с сухим панкреатином с протеолитической активностью 3500 E/g, можно отметить, что

полученный ферментный комплекс в 1.2 раз активнее, чем в исследуемом препарате. Этот препарат можно использовать для получения ферментного гидролизата из животного сырья в сравнительно мягких условиях. Изучены pH оптимумы и температурные действия на активность ферментного комплекса.

Литература:

- Машковский М.Д. *Лекарственные средства. Пособие для врачей. 15-е издание, перераб.* Москва, «Новая волна», 2005, с.1164.
- Нормуродова К.Т. *Изучение некоторых физико-химических и каталитических свойств высокоочищенной α -амилазы Bacillus subtilis-150* Труды института Микробиологии национальной академии наук Азербайджана. Том 9, №1, 2011. - С. 179-184.

N.X.Tuksanova., K.T.Normurodova., N.I.Bozorov

PROTEASE ACTIVITY ENZYMES COMPLEX OF THE PANCREAS OF THE LARGE HORNED LIVE-STOCK

The studied protease activity enzymes complex suspension hatches of the pancreas of the large horned live-stock are ascertain protease. It is shown that the most night activity enzyme complex developed in 40 °C and pH 6.5. They are determined kinetic parameters enzyme complex, which enzyme complex suspension hatches of the pancreas of the large horned live-stock is shown maximum protease activity.

Н.Х.Туксанова., К.Т.Нормуродова., Н.И.Бозоров

КОРАМОЛ ОШКОЗОН ОСТИ БЕЗИ ФЕРМЕНТ КОМПЛЕКСИНИНГ ПРОТЕОЛИТИК ФАОЛЛИГИ

Қорамол ошқозон ости беzi фермент комплекси суспензиясида протеолитик фаоллиги панкреатин препарати билан такослаб ўрганилди. Фермент комплексининг кинетик параметрлари ўрганилди ва юкори фаоллиги 40°C ва pH 6.5 ни ташкил этди. Қорамол ошқозон ости беzi фермент комплекси панкреатин билан солиштирилганда олинган фермент комплекси юкори фаолликни кўрсатди.

Тошкент фармацевтика
институтини
Низомий номидаги Тошкент
Давлат педагогика университети

08.01.2013 й.
қабул қилинди

УДК 615.015

Ш.Ф.Искандарова

ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

Индустрия биологически активных добавок (БАД), начавшая своё развитие в 70-е годы XX века в США, на сегодняшний день завоевала большую часть мира, в том числе Западную и Восточную Европу, Азию, страны СНГ и др. За этот относительно короткий в историческом аспекте период времени отношение к пищевым добавкам у среднестатистического человека успело несколько раз кардинально

измениться. Причиной этого часто была реклама производителей своей продукции, которая не всегда соответствовала реальности и иногда грешила преувеличениями. Тем не менее индустрия БАД не «умерла» и, несмотря ни на что, усиленно развивается. Это является свидетельством того факта, что биологически активные добавки действительно востребованы [1].

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
СОЎЛИКНИ САКЛАШ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ



ПРОФЕССОР МАННОН АЗИЗОВИЧ АЗИЗОВ ТАВАЛЛУДИНИНГ
100 ЙИЛЛИГИГА БАҒИШЛАНГАН ТАЛАБАЛАР ИЛМИЙ
ЖАМИЯТИНИНГ АНЪАНАВИЙ 70-ИЛМИЙ АНЖУМАН

МАТЕРИАЛЛАРИ



24-25 май, 2013 йил
Тошкент, Ўзбекистон

proteolytic enzyme hydrolysis was fully completed. Hydrolysis of the raw material composition (amino acids, polypeptides) protein hydrolyzate can be used in replacement of blood and plasma and can be used as a drug albumin in which the investigation must continue.

Conclusion. The first time by this method was obtained enzymatically hydrolysed in this proteins. But on the safety and usefulness of protein hydrolyzate sudut not only by its amino acid composition. Of great importance is the depth of proteolysis, the presence of peptides as well as by-products formed during the hydrolysis of the protein.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТА ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Н.Х. Туксанова – магистрант 2 курса
Ташкентской фармацевтический институт, г. Ташкент
Кафедра биотехнологии
Руководитель: К.Т. Нормуродова

Актуальность работы: В последние годы применяемые препараты ферментов, полученные из тканей, поджелудочной железы и органов животных, предназначаются в основном для пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности определяется уровнем развития современной биотехнологии. Высокоочищенные ферменты используются для лечения различных ран, ожогов, для удаления некротических тканей с поверхности гнойных ран. Готовятся различные таблетки, эмульсии, аэрозоли и сыпучие формы лекарственных средств на основе протеолитических ферментов. Поэтому к ним предъявляются особо жесткие требования в выделении и получении.

Цель работы: В работе представлены результаты получение и изучение активности ферментного комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Эксперименты и методы: В работе использовали поджелудочную железу (СПЖ) крупного рогатого скота и медицинский панкреатин с протенназой активностью 3500 Ед/гр ферментного препарата.

На основе образцов СПЖ крупного рогатого скотаи готовили суспензии от 50мл до 500 мл. При этом 100 гр размороженной измельченной СПЖ крупного рогатого скотагомогенизировали с дистиллированной водой в количестве 50, 100, 200, 300, 400 и 500 мл. В полученнуюсуспензию добавляли 96% этилового спирта в количестве 5 %. Гидролиз 10 %-ного раствора медицинского панкреатина (сухой белковый экстракт)проводили в колбе при соотношение фермент-субстрат комплекс 1:10 (по белку) 40°C и рН-6, 5 в течение 5ч.

Результаты: Полученные данные показывают, что для получения активной СПЖ крупного рогатого скота следует брать суспензии 400 мл фермент-субстрат комплекс 1:10 (по белку) 40°C и рН-6, 5 в течение 5ч.

Выводы: Таким образом, сравнивая данные по активности ферментных препаратов СПЖ с сухим панкреатином с протенназой активностью 3500 Е/г, можно отметить, что полученный ферментный комплекс в 1, 2 раз активнее, чем в исследуемого препарата. Этот препарат можно использовать для получения ферментного гидролизата из животного сырья в сравнительно мягких условиях. Изучены рН оптимумы и температурные действия на активность ферментного комплекса.

ЎСИМЛИК ҚУРУҚ ЭКСТРАКТИНИ САҚЛОВЧИ ГЕЛЛАРНИ ОЛИШ ТЕХНОЛОГИЯСИ

З.С. Ёқубжонова – 3-курс талабаси
Тошкент фармацевтика институти, Тошкент ш.
Биотехнология кафедраси
Илмий раҳбар: доц. Ф.Х. Тўхтаев

Ишдан мақсад: Тирноқгул доривор ўсимлиги қадимги халқ табиобатида турли касалликларни даволашда самарали восита сифатида қўлланилиб келинган. Айниқса, тери шикастланишида ва яллиғланишида сувли эритмаларидан тайёрланган дамламалари терини

Тошкент фармацевтика институти "Биотехнология" кафедраси 5A522902-
иммунобиологик ва микробиологик препаратлар технологияси
мутахассислиги магистри Туксанова Нигина Хакимовнанинг "Технология
получения фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота"
мавзусидаги академик магистр диссертациясига илмий раҳбар

ХУЛОСА СИ

Магистрант Туксанова Нигина Хакимовна диссертация мавзусини танлашга илмий ва ижодий ёндашган ҳолда қорамол ошқозон ости беши фаол фермент комплексини ўрганиш, ажратиш олиш, фаоллигини аниқлаш ва фермент фаоллигига физик-кимёвий омилларнинг таъсирлари устида тажрибалар олиб борди ва бу борасида етарли билимга эга эканлигини намойиш қилди. Юқори фаолликка эга қорамол ошқозон ости безидан фаол фермент комплексини ажратиш олиш, ундаги протеолитик фермент фаоллигини аниқлаш ва фермент фаоллигига физик-кимёвий омилларнинг таъсирини ўрганиш, қорамол ошқозон ости безидан фаол фермент комплексини ажратиш олишнинг қулай ва самарали технологик схемасини ишлаб чиқиш каби параметрларни ўз олдига мақсад қилиб қўйди. Республикамизнинг дорисаноатини ривожлантириш мақсадида арзон ва танқис бўлмаган қорамол ошқозон ости безидан овқат ҳазм қилиш системасини яхшилашда иштирок этувчи фаол фермент комплексини олиш, биологик препарат сифатида ишлаб чиқариш ва амалиётга татбиқ этиш даркор. Танланган мавзу долзарб бўлиб, ҳозирда ривожланган Исломий давлатларда қорамол ошқозон ости безидан ажратиш олинган фаол фермент комплексига бўлган талаб янада ортомқда ва бу соҳадаги тадқиқотлар жадал суратда олиб борилмоқда.

Туксанова Нигина Хакимовна назарий ва тажриба тадқиқотларини муваққил равишда бажариш учун адабиётлардан унумли фойдаланган ва тажриба натижаларини жадаллар ва расмлар шаклида расмийлаштирган.

Тадқиқот учун қорамол ошқозон ости безидан фаол фермент комплексини ажратиш ва фермент фаоллигига физик-кимёвий омилларнинг таъсирини аниқлашда биокимёвий ва технологик усулларидан фойдаланган.


Тадқиқотлар асосида муваққил равишда илмий-амалий хулосалар чиқарилган бўлиб, диссертация илмий жиҳатдан тўғри расмийлаштирилган.

Умуман, магистрант Туксанова Нигина Хакимовнанинг диссертация иши тугалланган илмий тадқиқот бўлиб, ҳажми ва мазмуни бўйича ЎзР ОЎМТВ талабларига тўлиқ жавоб беради. Бу магистрлик диссертациясини химояга тавсия этиш мумкин.

Илмий раҳбар:

Тошкент фармацевтика институти
"Биотехнология" кафедраси доц., б.ф.н.

 К.Т. Нормуродова.



ТошФарми XБ таълиғи

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Туксановой Нигины Хайдаровны на тему «Технология получения фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота», представленную на соискание академической степени магистра по специальности 5A522902-технологии препаратов иммунологии и микробиологии.

Актуальность проблемы. Настоящее время применение ферментных препаратов полученных из тканей, поджелудочной железы и органов животных, предназначенных в основном для пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности, определяется уровнем развития современной биотехнологии. Это магистерская диссертационная работа представлена «Технология получения фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота». В последнее время в Узбекистане растет интерес к панкреатическим ферментам крупного рогатого скота, что вызвано широкими возможностями их использования для решения практических задач фармацевтических производств.

Особенно это относится к медицинской и фармацевтической промышленности, которая испытывает острую потребность в комплексных протеолитических ферментных препаратах, проявляющих максимальную активность в кислой и слабокислой среде.

К сожалению, в Узбекистане производство, выпуск, высокоочищенных панкреатических ферментов не налажен и потребность отечественного производства в них удовлетворяется путем их импорта из зарубежных стран. По этому, одним из перспективных объектов в этом отношении являются панкреатина крупного рогатого скота.

Новизна исследований и полученных результатов. Получен и изучен ферментный комплекс из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Определено активность ферментного комплекса панкреатина. Изучено влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Применение материалов в диссертации. Полученные результаты и выводы диссертации могут быть использованы в научных учреждениях, работающие в области фармацевтики, биотехнологии и пищевой технологии. В качестве пожелания – если автором получены результаты исследований, которые могут быть использованы при разработке регламента, почему бы его не разработать.

Диссертация содержит 5 таблиц и 13 рисунка, 52 источника использованной литературы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

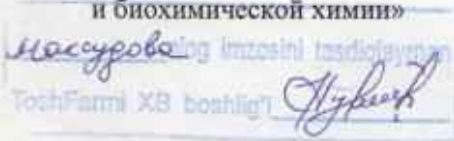
Таким образом, магистерская работа Туксановой Н.Х. выполнена на хорошем научном уровне. В диссертации представлен теоретический и экспериментальный материал по получению и отделению ферментного комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота, изучено влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Полученные результаты работы опубликованы двух работ из них один журнальные статьи и один тезисов докладов.

Диссертация нуждается в тщательно стилистической и грамматической коррекции. В целом, хорошо написанная и оформленная магистерская диссертационная работа Туксановой Н.Х. на тему: «Технология получения фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота» по объему выполненных работ, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к магистерским диссертациям на соискание и присуждения академической степени магистра по специальности 5A522902-технологии препаратов иммунологии и микробиологии.

Официальный оппонент:

Ташкентский фармацевтический институт, доц.,
к.б.н., кафедре «Токсикологической, органической
и биохимической химии»



ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Туксановой Нигина Хайдаровны «Технология получения фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота», представленную на соискание степени магистра по специальности 5A522902-технологии препаратов иммунологии и микробиологии.

Актуальность выбранной проблемы не вызывает сомнений. Предметом исследования магистерской диссертационной работы является технология получения фермента из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Вопросы получения и очистки ферментов из поджелудочной железы крупного рогатого скота остаются сложными, поскольку они обладают ограниченной активностью и стабильностью. В настоящее время в Узбекистане производство фармацевтических препаратов не налажен и потребность отечественного производства в них удовлетворяется путём их импорта из зарубежных стран. Это даёт основание утверждать, что научная проблема, сформулированная в диссертации: выделение высокоактивных ферментных комплексов, изучение их свойств и разработка новой технологии получения активных ферментных препаратов является актуальной. Решение указанной проблемы позволит совершенствовать технологию:

- в фармацевтике и медицине средство для улучшения пищеварения,
- в молочной промышленности для ускорения созревания сыров и снижения их себестоимости,
- в кожевенном и меховом производстве для ускорения снятия волоса со шкур и размягчения кожевенного сырья,
- в текстильной промышленности для ускорения процесса расшлихтовки тканей и для удаления серицина при размотке коконов тутового шелкопряда в производстве натурального шелка.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Автор достаточно корректно использует известные научные методы обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Автором изучены и критически анализируются современные известные достижения и теоретические положения по вопросам получения и выделения ферментов из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Список использованной литературы содержит 70 наименований.

Автор находит объяснение факту получения и отделение ферментов комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Изучение влияние физико-химических факторов на активности фермента.

Оценка новизны и достоверности. В качестве новых научных результатов диссертантом выдвинуты следующие положения:

- Получено и изучено отделение ферментного комплекса из поджелудочной железы крупного рогатого скота;
- Определено активности ферментного комплекса панкреатина.
- Изучено влияние физико-химических факторов на активности фермента

В целом, результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями в биотехнологической отрасли знаний.

Основные результаты диссертации опубликованы в 2 печатных работах, они неоднократно обсуждались на различных конференциях и получили одобрение ведущих специалистов.

Замечания по диссертации в целом:

1. В процессах с участием ферментов важным фактором является стабильность (хранения, влияния различных эффекторов и ингибиторов).
2. Имеются ошибки в тексте и рисунках.

Указанные замечания не снижают достоинств, представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на современном научном уровне. Работа базируется на достаточном числе исходных данных, примеров и расчётов. Она написана доходчиво и аккуратно оформлена. По каждой главе в работе в целом сделаны выводы.

Магистерская диссертационная работа отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения учёных магистерских степеней». Отмеченные недостатки не снижают качество исследований и не влияют на главные теоретические и практические положения диссертации. А её автор Туксанова Нигина Хайдаровна заслуживает присуждения степени магистра по специальности 5A522902-технологии препаратов иммунологии и микробиологии.

Официальный оппонент:
Заведующий кафедре «Биотехнологии»
Ташкентский химико-технологический
институт, к.б.н., доцент



Н. А. Хужамшукуров