

---

# НОВІ ПОЛІМЕРНІ МАТЕРІАЛИ КОМПЛЕКСНОЇ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ ДІЇ

I.I. Романовська, O.A. Рижак, C.C. Декіна,  
Ю.А. Шестеренко, Є.А. Шестеренко

---

<https://doi.org/10.15407/akademperiodyka.444.188>

Протеолітичні ензими (трипсин, колагеназа, папаїн та ін.) використовуються як високоефективні терапевтичні засоби медичного призначення, зокрема для терапії ранових ушкоджень шкіри. Перспективним є застосування мікробних ензимів, що розщеплюють нерозчинні білки: фібрин і колаген, тобто мають специфічні види протеолітичної активності [1].

Серратіопептидаза (КФ 3.4.24.40) (продуцент *Serratia sp.* E15) завдяки вираженій протинабряковій, протизапальній дії є активним протеолітичним ензимом, який використовують у медичній практиці [2, 3]. Недоліки, пов'язані з високою вартістю вільних ензимів, процесами автолізу і впливом рН ранового вмісту, що інактивує дію ферментів, мінімізуються шляхом іммобілізації в полімерні матриці. Актуальні наукові дослідження в цьому напрямі сприяють розробленню перспективних протиранових і протиопікових засобів різних лікарських форм (мазі, гелі, плівки, губки, текстильні матеріали) [4, 5].

Застосування серратіопептидази в медицині обмежено більшою мірою її пероральним введенням, тоді як препарати топічного способу введення практично відсутні [2]. У зв'язку з вищевикладеним, серратіопептидаза є актуальним об'єктом наукових досліджень для створення біоактивних полімерних матеріалів місцевого застосування.

Метою роботи є розроблення нових біосумісних полімерних матеріалів комплексної протеолітичної дії з серратіопептидазою у вигляді марлевих серветок та гелів, дослідження їх біохімічних і фізико-хімічних властивостей.

## Методи експерименту

У дослідженні використовували серратіопептидазу, отриману з таблеток СЕРРАТА®. Процес очищення ензиму включав такі стадії: подрібнення таблеток; екстрагування ензиму охолодженою дистильованою водою; центрифугування суспензії протягом 30 хв (10 000 g, 0 °C) для відділення супернатанту від осаду; діаліз проти дистильованої води при 0 °C протягом доби (мембрана «Діацел» з діаметром пор 200—400 мкм).

Визначення білково-фракційного складу препарату сerratіопептидази проводили методом SDS-електрофорезу в 15 % поліакриламідному гелі (ПААГ) [6, 7] із застосуванням електрофоретичного обладнання Cleaver Scientific (PowerPRO 3AMP Power Supply). Використовували маркерні білки з діапазоном  $M_r$  6 500—180 000 Да, Sigma-Aldrich; молекулярну масу ензиму визначали згідно з методикою, наведеною у [8].

Вміст загального протеїну визначали методом Лоурі в модифікації Хартрі [9], казеїнолітичну активність — методом Ансона в модифікації Петрової [10], фібринолітичну активність — методом Masada [11], колагенолітичну активність — згідно з методикою, наведеною в роботі [12]. Одиниця казеїнолітичної активності еквівалентна 1 мкмоль тирозину, що утворюється внаслідок гідролізу казеїну за 1 хв при 37 °С. За одиницю фібринолітичної активності приймали таку кількість ензиму, яка збільшує оптичну густину реакційної суміші продуктів розщеплення фібрину на 0,01 од. за 1 хв. Одиниця колагенолітичної активності еквівалентна 1 мкмоль L-лейцину, вивільненого з колагену за 1 хв гідролізу при 37 °С.

Дослідження впливу рН реакційного середовища на активність ензиму проводили при 37 °С в інтервалі рН від 4,0 до 11,0 у буферних розчинах (0,05 М ацетатний буфер 4,0—7,0; 0,1 М Трис-НСl рН 7,0—9,0; 0,1 М гліциновий буфер рН 9,0—11,0) з використанням гемоглобіну як субстрату. Вплив температури реакційного середовища на активність сerratіопептидази вивчали в інтервалі температур від 20 до 65 °С при рН 9,5 (субстрат — казеїн за Гаммерстейном). Термостабільність вільного й іммобілізованого ензиму визначали інкубацією рівних за активністю проб досліджуваних препаратів за температури 50 °С протягом 60 хв. Константи термоінактивації розраховували як тангенс кута нахилу прямої графіка залежності десятичного логарифма величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії.

Для іммобілізації сerratіопептидази використовували комплексні полімерні матриці полівініловий спирт (ПВС)/альгінат натрію і ПВС/хітозан, які готували змішуванням 2 % водного розчину альгінату натрію і 20 % водного розчину ПВС в об'ємному співвідношенні 1:2 або 2 % хітозану, розчиненого в 1,5 % оцтовій кислоті і 20 % водного розчину ПВС в об'ємному співвідношенні 1,5:1. Після чого вводили розраховану кількість ензиму в діапазоні масових відношень матриця: пептидаза 1:0,001—0,005; для поліпшення пластичних властивостей додавали гліцерин, перемішували. Отриманою сумішшю просочували перев'язувальний матеріал (бинт марлевий медичний, виробник — ТОВ «Аріадна», розмір пов'язок — 10 × 10 см). Висушували за кімнатної температури протягом 2 діб, пакували в герметичні поліетиленові пакети і зберігали при 0—4 °С.

Включення сerratіопептидази в гель натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) здійснювали згідно з методикою, наведеною в роботі [13].

Віскозиметричні характеристики водних розчинів ензиму з ПВС, альгінатом натрія, Na-КМЦ та хітозаном досліджували, вимірюючи в'язкість віскозиметром Оствальда. Характеристичну в'язкість визначали згідно з методикою [14]. УФ-спектри отримували за температури 25 °С з використанням спектрофотометра Cary 60 Agilent. Загальну протеолітичну активність ензиму в іммобілізованих препаратах вивчали впродовж 6 місяців.

Кінетику гідролізу казеїну в присутності вільної та іммобілізованих форм сerratіопептидази досліджували в межах висхідної гілки залежності початкової швидкості реакції від концентрації субстрату, лінеаризуючи отримані дані методом Хейнса [15]. Константу інгібування субстратом  $K_{is}$  визначали, використовуючи графік залежності  $1/V$  від  $[S]$  [15]. Статистичну обробку результатів проводили в програмі Statistica, використовуючи  $t$ -критерій Стьюдента, результати вважали достовірними при кількості повторень  $n = 5$  і  $P < 0,05$ .

### **Іммобілізовані форми сerratіопептидази: біохімічні та фізико-хімічні властивості**

Широка субстратна специфічність, нетоксичність та наявність реєстрації препаратів сerratіопептидази в Україні зумовлюють доцільність створення нових полімерних матеріалів з комплексною протеолітичною активністю, перспективних для медичного застосування, в тому числі в терапії ран та опіків.

Аналіз білково-фракційного складу виділеного ензиму показав його гомогенність (рис. 1); молекулярна маса становить  $45 \pm 4$  кДа, що відповідає наведеним у літературі даним [16].

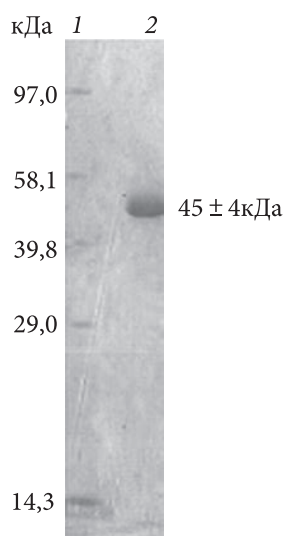
Вивчення біохімічних властивостей ензиму підтвердило наявність загальної протеолітичної, фібринолітичної та колагенолітичної активностей (табл. 1).

Для іммобілізації сerratіопептидази було обрано полімери природного і синтетичного походження, що застосовуються в медицині, та їх композиції.

Включення ензимів в альгінат натрію привертає увагу через біосумісність, термостійкість, пористість гелю та економічність полімеру [17]. Хітозан — полімер з антимікробною, кровоспинною дією, що дозволяє значно скоротити строки лікування і зумовлює перспективність його використання в репаративній медицині. Однак безпосередньо носії мають погані плівкоутворювальні властивості та низьку пластичність. Тому як матриці для створення біоактивних полімерних матеріалів перспективним є використання їх суміші з ПВС [18—21].

Na-карбоксиметилцелюлоза — один з головних компонентів адгезивно-поглинальних систем при лікуванні ран; використовується для видалення ранового вмісту, ексудатів та ін. Зв'язуючи властивості Na-КМЦ викорис-

**Рис 1.** Електрофореграма сerratіопептидази (SDS-електрофорез): 1 — маркери: лізоцим (14,3 кДа), карбоангідраза (29,0 кДа), алкогольдегідрогеназа (39,8 кДа), каталаза (58,1 кДа), фосфорилаза В (97,0 кДа); 2 — сerratіопептидаза (45,0 ± 4 кДа)



товують у виробництві ліків з модифікованою кінетикою вивільнення діючих речовин [22—24]. На світовому фармацевтичному ринку представлено низку препаратів для терапії ран у вигляді гелів на основі Na-КМЦ (Convatec®, Intrasite Gel®, Granugel®, Hydromed gel®).

Нами досліджено масові співвідношення полімерів для розроблення біоактивних матеріалів протеолітичної дії: ПВС/альгінат натрію (5:1), ПВС/хітозан (7:1); отримано гель Na-КМЦ (3 %) з іммобілізованим ензимом [25]. Збереження загальної протеолітичної активності сerratіопептидази після включення у ПВС/альгінат натрію, ПВС/хітозан та Na-КМЦ становило 88; 49 та 80 % відповідно. Значне зниження активності ензиму, іммобілізованого в ПВС/хітозан, свідчить про недоцільність використання цієї матриці для подальшого вивчення.

Для дослідження взаємодії сerratіопептидази з обраними полімерами вивчено реологічні та оптичні характеристики сумішей. Встановлено зменшення характеристичної в'язкості розчинів полімерів на 47 і 23 % для альгінату натрію та Na-КМЦ відповідно, що спостерігається при додаванні сerratіопептидази і може свідчити, як показано в роботі [26], про утворення асоціатів білок—полімер.

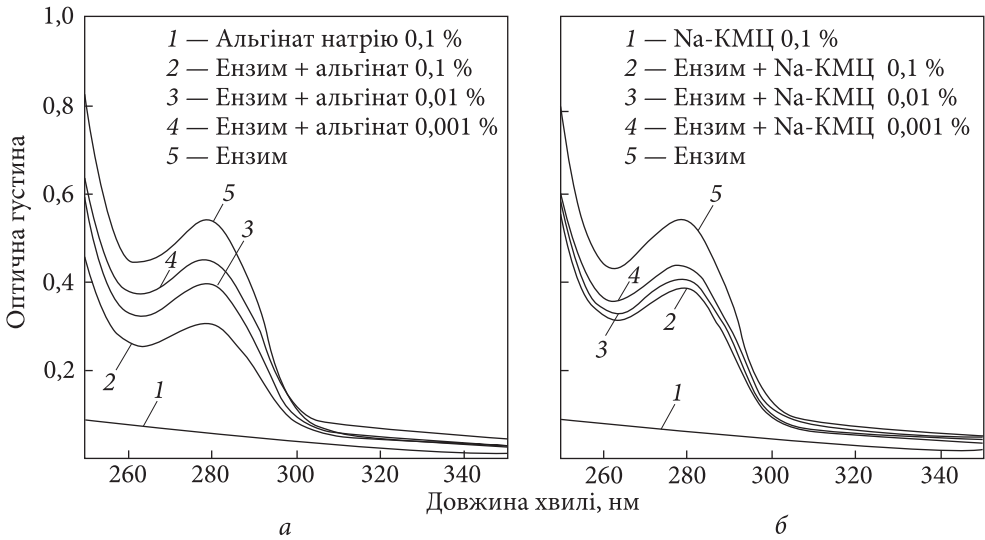
Використання УФ-спектроскопії також підтвердило взаємодію ензиму з полімерними носіями: в їх присутності спостерігалось зменшення оптичної густини розчину ензиму (гіпохромний ефект) (рис. 2а, б). Слід зазначи-

Т а б л и ц я 1

**Біохімічні характеристики сerratіопептидази**

Властивості сerratіопептидази	Показник, (M ± m)
Вміст білка, мг/см <sup>3</sup>	1,4 ± 0,1 (*P < 0,05)
Протеолітична активність, од/мг білка за хв	19,2 ± 0,9 (*P < 0,05)
Колагенолітична активність, нмоль лейцину/мг білка за хв	117,5 ± 0,1 (*P < 0,05)
Фібринолітична активність, од/мг білка за хв	7,1 ± 0,3 (*P < 0,05)

\* При n = 5.



**Рис 2.** Електронні спектри поглинання водних розчинів вільної та включеної в альгінат натрію (а) і Na-КМЦ (б) серратіопептидази

ти, що значення  $\lambda_{\max}$  (280 нм) не змінювалося, тобто конформаційні зміни є незначними і не порушують природну структуру серратіопептидази.

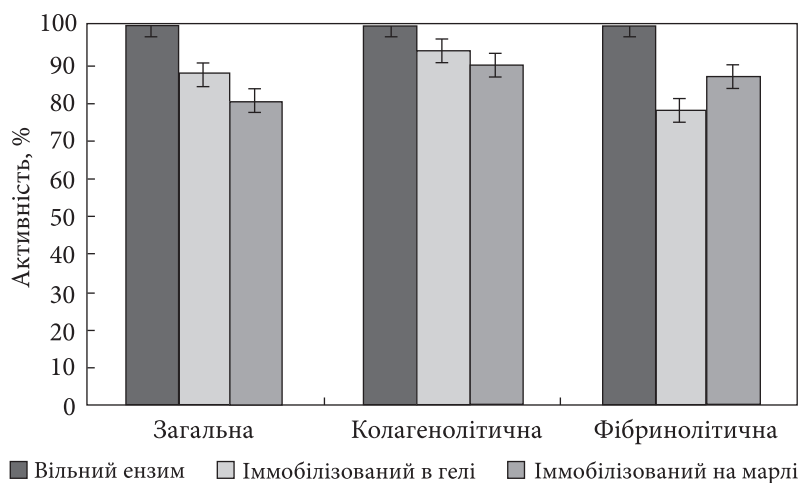
Для створення потенційних протиранових пов'язок з комплексною протеолітичною дією провели імпрегнацію отриманою композицією ПВС/альгінат натрію/ензим перев'язувального матеріалу.

Відомо, що закріплення полімерних матеріалів з протеолітичними ензимами тваринного походження на перев'язувальних матеріалах надає препарату міцність, пластичність, здатність додатково адсорбувати рановий ексудат (Мультиферм (ТУ 9393-025-05824192-2006), «Пам-ТЛ» (ТУ 9393-012-05824192-2003), «Протеокс-Т» (ТУ 9393-011-05824192-2003), «Протеокс-ТМ» (ТУ 9393-010-05824192-2003)) [27].

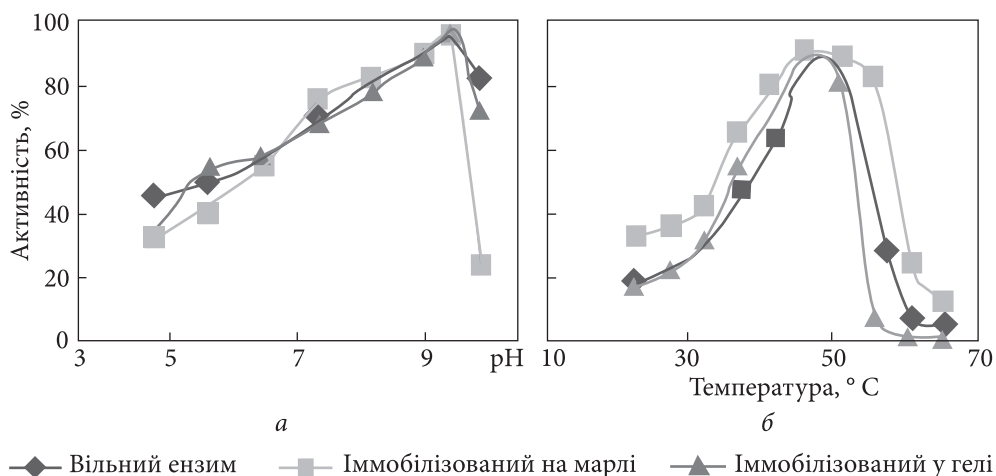
Раніше нами було показано перевагу використання двошарової марлі порівняно з одношаровою, що дозволило нанести на пов'язки більшу кількість полімерної суміші з ензимом і тим самим поліпшити властивості отриманих покриттів [28]. Тому було проведено закріплення композиції ПВС/альгінат натрію/ензим на двошарових марлевих пов'язках.

На рис. 3 показано протеолітичні активності вільної та іммобілізованих форм ензиму. Як можна бачити, спостерігається високе збереження загальної та специфічних видів активності серратіопептидази після іммобілізації в полімерні матриці (в діапазоні 78—92 %).

У результаті дослідження фізико-хімічних характеристик отриманих іммобілізованих продуктів за загальною протеолітичною активністю, показано відсутність суттєвих відмінностей у рН-профілі активності вільної



**Рис. 3.** Протеолітичні активності вільної та стабілізованих полімерами форм серратіопептидази (питомі активності вільного ензиму наведено в табл. 1)



**Рис. 4.** Вплив рН (а) і температури (б) інкубаційного середовища на загальну протеолітичну активність вільної та вивільненої з полімерних матриць серратіопептидази

та іммобілізованої серратіопептидази (рН-оптимум вільного та іммобілізованих ензимів дорівнює рН 9,5) (рис. 4а). Дослідження залежності загальної протеолітичної активності зазначених препаратів від температури показало відсутність змін термооптимумів їх активності, але спостерігалось розширення термопрофілю іммобілізованої на марлі за допомогою ПВС/альгінат натрію пептидази в область підвищених температур (рис. 4б).

При вивченні термоінактивації вільної і стабілізованих полімерами форм сerratіопептидази при 50 °С встановлено, що термостабільність включених ензимів підвищується порівняно з вільним.

Отже, закріплення на марлі за допомогою ПВС/альгінат натрію і включення в гель Na-КМЦ захищає ензим від несприятливого впливу високих температур, про що свідчить зменшення констант термоінактивації в 5,1 і 2,9 раза ( $k_{ин}$  для вільного ензиму —  $2,5 \cdot 10^{-2}$ , для іммобілізованих форм —  $0,49 \cdot 10^{-2} \text{ хв}^{-1}$  та  $0,85 \cdot 10^{-2} \text{ хв}^{-1}$  відповідно) (рис. 5).

Безумовною перевагою іммобілізованих ензимів перед вільними є можливість їх тривалого зберігання без значних втрат активності. Вивчення збереження загальної протеолітичної активності ензиму (0—4 °С, 12 місяців) в марлевих пов'язках і в гелі показало його високу активність (78 і 90 % відповідно) (табл. 2), тоді як вільний ензим повністю втрачав активність впродовж трьох діб.

### Кінетичні особливості гідролізу казеїну вільною та іммобілізованими формами сerratіопептидази

Внаслідок іммобілізації протеолітичних ензимів може змінюватися їх швидкість реакції, спорідненість до субстрату, а також низка інших властивостей, тому проведення кінетичних досліджень є актуальним завданням [29, 30].

Вплив закріплення сerratіопептидази на марлі за допомогою ПВС/альгінат натрію і включення в гель Na-КМЦ на кінетичні параметри гідролізу казеїну визначали після розчинення полімерів, адже матриці створюють дифузійні обмеження і перешкоджають проникненню субстрату до іммобілізованої пептидази.

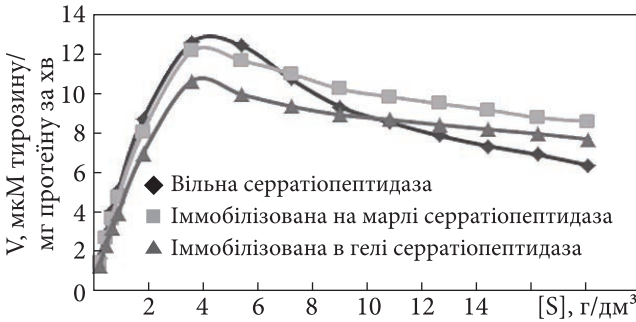
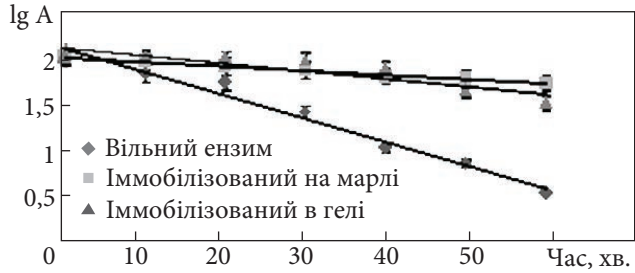
При відносно невисоких значеннях концентрації субстрату швидкість реакції зростає пропорційно, з подальшим підвищенням концентрації субстрату значення швидкості наближається до граничного, а потім починає знижуватися, тобто в певному діапазоні концентрацій казеїну відбувається інгібування ензиму субстратом (рис. 6).

Т а б л и ц я 2

Зміни загальної протеолітичної активності ензиму при зберіганні

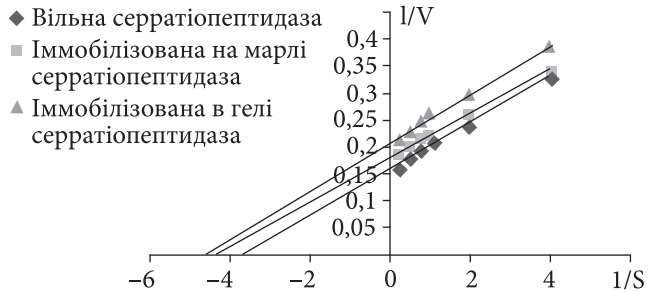
Час, діб	Протеолітична активність, % від максимальної		Час, діб	Протеолітична активність, % від максимальної	
	Іммобілізований на марлі	Іммобілізований в гелі		Іммобілізований на марлі	Іммобілізований в гелі
Після іммобілізації	100	100	30	84,9	90,1
7	85,6	97,8	90	75,4	90,1
14	85,1	98,2	360	77,7	89,5

**Рис. 5.** Залежність  $\lg A$  залишкової активності вільної та іммобілізованих форм серратіопептидази від часу інкубації при 50 °С



**Рис. 6.** Кінетика гідролізу казеїну, що каталізується вільною і іммобілізованими формами серратіопептидази

**Рис. 7.** Визначення кінетичних параметрів гідролізу казеїну, що каталізується вільною і іммобілізованими формами серратіопептидази, в координатах Хейнса



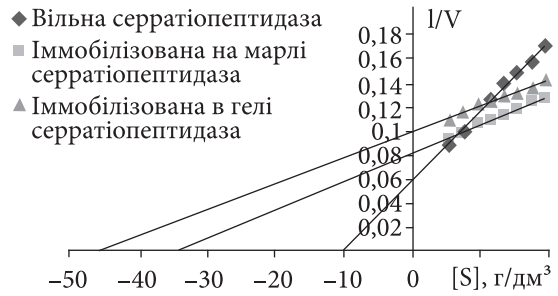
Показано, що включення ензиму в обидві матриці істотно не впливає на  $V_{\text{макс}}$  гідролізу казеїну (рис. 7, табл. 3), що свідчить про м'який метод іммобілізації серратіопептидази, який не порушує каталітичний центр ензиму.

Однак  $K_m$  збільшується в 1,2 і 1,3 раза у випадку закріплення ензиму на марлі за допомогою ПВС/альгінат натрію і включення в гель Na-КМЦ відповідно, що, ймовірно, обумовлено зменшенням спорідненості ензиму до субстрату в результаті конформаційних змін глобули білка, або наявності в'язкісних обмежень в результаті взаємодії з компонентами матриць.

За допомогою графіка залежності  $1/V$  від  $S$  (рис. 8) були проаналізовані спадні гілки кінетичних кривих, де спостерігалось інгібування субстратом. Значення константи інгібування вільної серратіопептидази казеїном ( $K_{is}$ ) становить 9,6 г/дм<sup>3</sup>.



**Рис. 8.** Визначення інгібування субстратом вільної і іммобілізованих форм сerratіопептидази



Таблиця 3

**Кінетичні параметри гідролізу казеїну, що каталізується вільною і іммобілізованими формами сerratіопептидази**

Сerratіопептидаза	$K_m$ , г/дм <sup>3</sup>	$V_{\text{макс.}}$ мкмоль тирозину/мг протеїну за хв
Вільна	$3,71 \pm 0,22$	$23,7 \pm 0,92$
Іммобілізована на марлі	$4,42 \pm 0,20$	$24,9 \pm 0,74$
Іммобілізована в гелі	$4,73 \pm 0,35$	$22,7 \pm 1,19$

Дослідження інгібування іммобілізованого на марлі ензиму субстратом показало збільшення константи інгібування в 3,5 рази ( $33,6 \text{ г/дм}^3$ ) порівняно з вільним. Використання іммобілізованої в гелі пептидази приводило до ще більшого зростання  $K_{is}$  ( $45,1 \text{ г/дм}^3$ ). Значне збільшення константи інгібування є суттєвою перевагою досліджених іммобілізованих форм ензиму, тому що субстратне інгібування значно змінює істинну активність сerratіопептидази, ускладнює її дослідження і зменшує діапазон робочих концентрацій субстрату.

Отже, було розроблено нові біосумісні високоактивні полімерні матеріали комплексної протеолітичної дії і тривалого зберігання у вигляді марлевих пов'язок та гелю, перспективні для застосування у терапії ран та опіків. Детально вивчено їх фізико-хімічні та кінетичні особливості.

Так, отримано та очищено протеолітичний фермент сerratіопептидазу з високими казеїнолітичною, колагенолітичною та фібринолітичною активностями; методом SDS-електрофорезу доведено гомогенність ензиму (М.м.  $45 \pm 4 \text{ кДа}$ ). Створено нові біосумісні високоактивні полімерні матеріали комплексної протеолітичної дії тривалого зберігання: марлеві пов'язки з сerratіопептидазою, включеною в ПВС/альгінат натрію, і гель на основі Na-КМЦ з іммобілізованим ензимом. Проведено спектрофотометричні дослідження і визначено реологічні характеристики полімерів при додаванні сerratіопептидази, що свідчать про наявність взаємодії між ензимом та полімерами. Досліджено фізико-хімічні характеристики

отриманих препаратів; показано відсутність суттєвих відмінностей у рН-профілях активності. У випадку пов'язок показано розширення термопрофілю активності в області підвищених температур порівняно з вільним ензимом. Встановлено, що іммобілізовані препарати були в 5,1 і 2,9 рази (для пов'язок і гелів відповідно) більш термостабільними порівняно з вільним ензимом. Визначено, що іммобілізація пептидази істотно не впливає на  $V_{\text{макс}}$  гідролізу субстрату. Показано збільшення  $K_M$  в 1,2 і 1,3 рази, а також зростання константи інгібування субстратом  $K_{is}$  у 3,5 і 4,7 рази для пов'язок і гелів відповідно.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed. Res. Int.* 2013. Vol. 13. P. 1—18.
2. Sivaramakrishnan G., Sridharan K.J. Role of serratiopeptidase after surgical removal of impacted molar: A systematic review and meta-analysis. *Maxillofacial and Oral Surgery.* 2018. Vol. 17, No. 2. P. 122—128.
3. Jadav S.P., Patel N.H., Shah T.G., Gajera M.V., Trivedi H.R., Shah B.K. Comparison of anti-inflammatory activity of serratiopeptidase and diclofenac in albino rats. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2010. Vol. 1, No. 2. P. 116—117.
4. Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P. Microbial protease in commercial applications. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 2016. Vol. 4, No. 3. P. 365—374.
5. Maheshwari M., Miglani G., Mali A., Paradkar A., Yamamura S., Kadam S. Development of tetracycline-serratiopeptidase-containing periodontal gel: formulation and preliminary clinical study. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2006. Vol. 7, No. 3. P. E162—E171.
6. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. P. 4406—4412.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227, No. 5259. P. 680—685.
8. Bonner P.L.R., Hargreaves A.J. *Basic bioscience laboratory techniques: a pocket guide.* John Wiley Sons. 2011. 232 p.
9. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochemistry.* 1972. Vol. 48, No. 2. P. 422—427.
10. Петрова И.С., Винцюнайта М.М. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения. *Прикл. биохимия и микробиол.* 1966. Т. 2, № 3. P. 322—327.
11. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract. *Food Style.* 2004. Vol. 8, No. 1. P. 92—95.
12. Yokoyama S., Hiramatsu J.-I. A modified ninhydrin reagent using ascorbic acid instead of potassium cyanide. *J. Bioscience Bioengineering.* 2003. Vol. 95. P. 204—205.
13. Декіна С.С., Романовська І.І., Леоненко І.І., Єгорова А.В. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом: отримання, властивості. *Biotechnologia Acta.* 2015. Т. 8, № 3. С. 104—109.
14. Тагер А.А. *Физикохимия полимеров.* Москва: Научный мир, 2007. 536 с.
15. Келети Т. *Основы ферментативной кинетики.* Москва: Мир, 1990. 348 с.

16. Hamada K., Hata Y., Katsuya Y., Hiramatsu H., Fujiwara T., Katsube Y. Crystal structure of Serratia protease, a zinc-dependent proteinase from *Serratia* sp. E-15, containing a beta-sheet coil motif at 2.0 Å resolution. *J. Biochem.* 1996. Vol. 119, No. 5. P. 844—851.
17. Vos P., Faas M.M., Strand B., Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials.* 2006. Vol. 27, No. 32. P. 5603—5617.
18. Kamoun E.A., Kenawy E.S., Tamer T.M. et al. Poly(vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bioevaluation. *Arabian J. Chem.* 2015. Vol. 8, No. 1. P. 38—47.
19. Illum L., Casettari L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J. Controlled Release.* 2014. No. 190. P. 189—200.
20. Thomas C., Keleher J., Kevin J., Bianca G. et al. Synthesis and characterization of a chitosan/PVA antimicrobial hydrogel nanocomposite for responsive wound management materials. *J. Microb. Biochem. Tech.* 2016. Vol. 8, No. 2. P. 65—70.
21. Dekina S., Romanovska I., Sevastyanov O., Shesterenko Ye., Ryjak A., Varbanets L., Dzubluk N., Muratov E. Development and Characterization of Chitosan/Polyvinyl Alcohol Polymer Material with Elastolytic and Collagenolytic Activities. *Enzyme Microbial Technology.* 2020. Vol. 132. P. 1093—1099.
22. Liu Y., Chen J.Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *J. Bioactive Compatible Polymers.* 2016. Vol. 31, No. 6. P. 553—567.
23. Wui T., Nor W., Ramli A. Carboxymethylcellulose film for bacterial wound infection control and healing. *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 112. P. 367—375.
24. Basu P., Narendrakumar U., Arunachalam R., Dev S. Characterization and Evaluation of Carboxymethyl Cellulose-Based Films for Healing of Full-Thickness Wounds in Normal and Diabetic Rats. *ACS Omega.* 2018. Vol. 3, P. 12622—12632.
25. Романовська І.І., Декіна С.С., Рижак О.А., Севастьянов О.В., Шестеренко Є.А., Шестеренко Ю.А. Властивості протеолітичного ензиму серратіопептидази та пошук біосумісних матриць для іммобілізації. В кн.: *Нові функціональні речовини і матеріали хімічного виробництва: тези доп. наук. звітної сесії цільової програми наукових досліджень НАН України.* 12 грудня 2019, Київ. С. 40—41.
26. Raza F., Zafar H., Zhu Y., Ren Y. A review on recent advances in stabilizing peptides/proteins upon fabrication in hydrogels from biodegradable polymers. *Pharmaceutics.* 2018. Vol. 10, No. 1. P. 16—21.
27. Машковский М.Д. *Лекарственные средства.* Москва: Новая волна, 2012, 1216 с.
28. Пат. України № 121937. Романовська І.І., Севастьянов О.В., Рижак О.А., Шестеренко Є.А., Декіна С.С., Варбанець Л.Д. Ранозагоювальна пов'язка з протеолітичною активністю. Опубл. 10.08.2020.
29. Nwagu T.N., Ugwuodo C.J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 127. P. 406—414.
30. Thakrar F.J., Singh S.P. Catalytic, thermodynamic and structural properties of an immobilized and highly thermostable alkaline protease from a haloalkaliphilic actinobacteria, *Nocardiosis alba* TATA-5. *Bioresour. Technol.* 2019. Vol. 278. P. 150—158.