

## ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И КАЧЕСТВА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПРОЛОНГИРОВАННОЙ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*Любкевич Ирина Александровна,  
студентка бакалавриата,  
e-mail: llyubkevich@mail.ru*

*Смирнова Софья Александровна,  
магистрант,  
e-mail: Murakremerk@yandex.ru*

*Молчанов Владимир Петрович,  
доктор технических наук, профессор,  
e-mail: science@science.tver.ru*

*Тверской государственный технический университет,  
г. Тверь, Россия*

© Любкевич И.А., Смирнова С.А., Молчанов В.П., 2024

**Аннотация:** предложены способы улучшения качества антимикробных препаратов белкового происхождения с пролонгированным действием и повышения их эффективности. Указано, что под этими способами понимается создание препаратов, иммобилизованных на различных носителях, а также контроль их активности с помощью методики биотестирования.

**Ключевые слова:** лизоцим, полиэтиленгликоль, иммобилизация, антимикробное действие.

## IMPROVEMENT OF EFFICIENCY AND QUALITY OF ENZYMATIC PREPARATIONS WITH PROLONGED ANTIMICROBIAL ACTIVITY

*Lyubkevich I.A., Smirnova S.A., Molchanov V.P.,  
Tver State Technical University*

**Abstract:** the methods of improving the quality of antimicrobial drugs of protein origin with prolonged action and increasing their effectiveness are proposed. It is indicated that these methods mean the creation of drugs immobilized on various media and the control of their activity using a biotesting technique.

**Keywords:** lysozyme, polyethylene glycol, immobilization, antimicrobial action.

С учетом растущей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам перспективной методикой для лечения инфекционных заболеваний является использование бактериолитических ферментов, таких как лизоцим. Лизоцим\* – антимикробный пептид, обладающий ферментативной активностью и положительным зарядом. Этот фермент относится

---

\* Код фермента по международной иерархической классификации – КФ 3.2.1.17.

к классу муреиновых гидролаз, расщепляющих пептидогликан, содержащийся в клеточных стенках бактерий [1].

Благодаря своей способности разрушать бактериальные клеточные стенки лизоцим находит широкое применение в различных сферах человеческой деятельности. Он эффективен в борьбе с бактериями, особенно с теми, которые обладают грамположительной клеточной стенкой, может использоваться для лечения инфекций, таких как пневмония, бронхит, ангина, синусит и др. Наличие лизоцима в слезной жидкости позволяет избежать инфекционного заболевания глаз. В слюне также присутствует лизоцим, который участвует в защите полости рта от вредных организмов и помогает предотвратить развитие кариеса и пародонтита [2, 3].

В медицине существуют как препараты лизоцима (и других гидролаз), так и антисептические средства наружного применения. Однако основные лекарственные формы лизоцима – это таблетки и растворы.

Лизоцим обладает рядом преимуществ перед другими препаратами подобного действия. Так, он не вызывает раздражения тканей и может использоваться при непереносимости других антибактериальных препаратов.

К хранению препарата на основе лизоцима предъявляется множество требований. Фермент чувствителен к температуре (его температура плавления составляет 69–73 °С), ферментная активность снижается после 36 °С.

В процессе своей активности лизоцим вызывает биодegradацию клеточной стенки бактерий, катализируя гидролиз между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в пептидогликановом слое, являющемся основным компонентом клеточной стенки бактерий (рис. 1) [2].

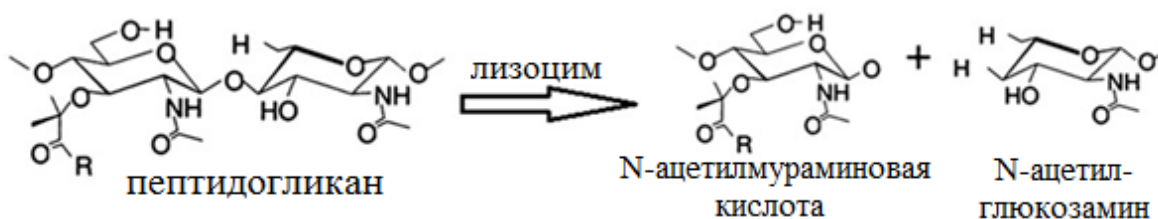


Рис. 1. Взаимодействие лизоцима с субстратом

Для повышения эффективности использования ферментного препарата лизоцима предлагается провести его иммобилизацию на полимерных носителях, в частности на полиэтиленгликоле (его формула представлена на рис. 2). Поскольку этот полимер обладает рядом свойств (водорастворимостью, неионогенностью, замедлением выведения белков из крови), он улучшает свойства лекарства: обеспечивает более длительное

нахождение в крови, понижение общетоксического действия, лучшую усвояемость и др. Модификация лекарственных веществ пегилированием может использоваться при разработке ряда лекарственных форм, таких как суспензии или лиофилизаты для приготовления суспензий и инъекций.

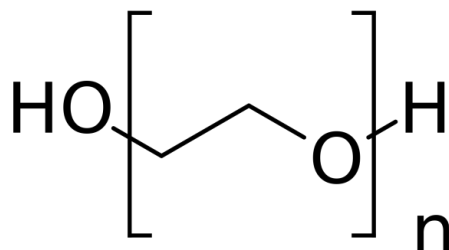


Рис. 2. Общая формула полиэтиленгликоля

Основными техническими параметрами, определяющими количественные, качественные и стоимостные характеристики продукции (в сопоставлении с существующими аналогами, в том числе мировыми), являются вид и структурная формула сополимера полиэтиленгликоля. От того, как много мономеров в полимере, зависит и его стоимость. Необходимо учитывать, что улучшение свойств препарата также напрямую обуславливается количеством мономеров. Молекулярная масса полимера до 750 и выше обеспечивает пролонгированное действие препарата в крови. Многое также зависит от характеристик и цены переносимого вещества, в частности лизоцима.

Иммобилизация лизоцима на полиэтиленгликоле – хороший способ увеличения эффективности и длительности действия производимого препарата. На этапе разработки лекарства необходимо проводить исследования анализаторов (для таких исследований нужны сложные методики и дорогостоящее оборудование). Это позволит прогнозировать токсические и другие свойства, а следовательно, фармакодинамику и фармакокинетику носителя медикаментов полиэтиленгликоля.

Еще одними важными параметрами являются количество и качество проводимых испытаний после разработки препарата [4]. Важно следовать строгим стандартам и протоколам, чтобы гарантировать стабильность активности лизоцима и надежность при использовании. Для контроля производства предлагается применять методику биотестирования, направленную на определение удельной ферментной активности лизоцима и, соответственно, созданной лекарственной формы.

Общим у большинства методов анализа активности лизоцима выступает использование в качестве субстрата живой или инактивированной тест-культуры микрококка *M. Lysodeicticus*. Меньше распространены методы анализа активности лизоцима на специальных субстратах, в структуре которых интегрирована радиоактивная метка или краситель. Последние крайне дороги, поэтому неслучайно предпочтение

отдается наиболее «старому» методу. Полуколичественные методы анализа активности лизоцима здесь не рассматриваются.

Нефелометрический метод В.Г. Дорофейчук основывается на изменении степени светопропускания опытной микробной взвеси микрококка по сравнению с исходной [5]. В качестве субстрата у нее была взята суточная культура *M. Lysodeicticus*, фосфатный буфер имел рН 7,2–7,4. Детектирование проводилось при длине волны 540 нм в кювете с рабочей длиной 3 мм. Светопропускание исходной взвеси составляло 20 %.

К.А. Каграманова и З.В. Ермольева определяли активность лизоцима подобным способом [6], но в несколько других условиях. Их метод основан на способности лизоцима, добавленного к ацетоновому порошку тест-бактерий, лизировать последние. Падение оптической плотности в фиксированном интервале времени служит характеристикой активности фермента. Главные отличия – использование ацетонового порошка культуры *M. Lysodeicticus*, фосфатного буфера 1/15 М с рН 6,2.

О.В. Бухарин, Н.В. Васильев [3] предложили более совершенный подход. Однако оказалось, что после 30-минутного инкубирования в термостате, несмотря на тщательную стандартизацию взвеси микрококка, в инициальных (контрольных) пробах без лизоцима наблюдаются колебания оптической плотности субстрата от 0,52 до 0,43. По этим данным были построены крупномасштабные усредненные калибровочные кривые с учетом результатов группировки контролей. В итоге была составлена таблица, позволяющая по степени лизиса культуры живого микрококка судить о концентрации (активности) фермента.

В клинико-биохимической лаборатории Национального медицинского исследовательского центра хирургии им. А.В. Вишневского освоена методика определения активности лизоцима с использованием хитинового субстрата, меченного красителем азуром. Метод основан на способности лизоцима растворять хитин с освобождением при этом адсорбированного красителя. Об активности лизоцима судят по разности флуоресценции опытных и контрольных проб. Изменение флуоресценции проводят на флуориметре при 650 нм (длина волны возбуждающего света – 558 нм). Активность лизоцима выражают в условных единицах: 1 усл. ед. равна 10-кратному количеству, мкг, освободившегося в раствор азур из хитиназура в расчете на 1 см<sup>3</sup> пробы за 1 ч инкубации при 37 °С.

В справочнике [7] опубликована методика Бухарина, значительно отличающаяся от рассмотренных выше [3, 5, 6]. Согласно ей, лизис микрококка также осуществляют при рН = 6,2 в 1/15 М фосфатном буфере (в кювете толщиной 10 мм). Показания изменений оптической плотности снимают на спектрофотометре при 540 нм, но только в течение 3 мин. Разность экстинций характеризует активность лизоцима. По предварительно построенному калибровочному графику (1–128 мкг) находят

содержание лизоцима в пробе. Линейная зона при концентрации – 1–16 мкг/см<sup>3</sup>.

С некоторыми отличиями в фармакопейной статье на лизоцим ФС-42-2585-97 количественное определение ферментативной активности препарата проводят в сравнении с ферментативной активностью согласно Государственному стандартному образцу. Оптическая плотность микрококка (готовится из лиофилизированного порошка) должна быть 0,6–0,75. Детектирование осуществляется на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Лизис микрококка проводят при обычной температуре в 1/15 М фосфатном буфере при pH = 6,2, снимая показания в единицах оптической плотности в течение 2 мин через каждые 15 с. За результат анализа принимают среднее арифметическое не менее 10 определений падения оптической плотности в течение 10 мин. Активность выражают в единицах на грамм (ед/г) в соответствии с показаниями стандартного образца (ФС 42-287-95), активность которого известна и также выражается в единицах на грамм, что корректно в сравнении с данными справочника [7], где конечный результат выражают в концентрации лизоцима.

Так как полиэтиленгликоль гидрофилен, при эксплуатации и хранении нельзя допускать попадания влаги. Температура не должна превышать 60 °С, так как при ней происходит плавление полиэтиленгликоля. Необходимо также не допускать попадания солнечных лучей на препарат. Иными словами, лизоцим как фермент чувствителен к нагреву, поэтому рекомендуется хранить его при температуре, не превышающей 25 °С, и влажности не более 60 %. Необходимо, помимо этих требований, учитывать условия хранения самой лекарственной формы. При производстве предлагается использовать традиционную плотную полиэтиленовую упаковку, снабженную крышкой, обеспечивающей герметичность и возможность многократного закрывания/открывания, для растворов – применять флаконы из непрозрачного стекла, в которых необходимая доза препарата будет содержаться в виде дисперсии или лиофилизата для приготовления дисперсии или инъекций. Конечная лекарственная форма и объем флаконов могут варьироваться в зависимости от переносимого вещества и других показателей. Вторичную упаковку лучше всего изготавливать традиционно (из мелованного картона со специальными перегородками во избежание битья флаконов). Для мелованного картона характерна высокая передача цвета, а это значит, что будет достигнут высокий спрос на препарат благодаря яркой обертке. Наконец, транспортная упаковка выполняется из гофрокартона (в дополнительных средствах защиты материал не нуждается).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ercan D., Demirci A. Recent Advances for the Production and Recovery Methods of Lysozyme // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016. № 3. P. 1078–1088.
2. Purification, Characterization and Bactericidal Action of Lysozyme, Isolated from *Bacillus subtilis* BSN314: A Disintegrating Effect of Lysozyme on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria / M. Naveed [et al.] // *Molecules*. 2023. № 28. P. 290–301. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36770725/> (дата обращения: 29.10.2023).
3. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1974. 209 с.
4. Журавлев Д.М. Методология разработки системы управления стратегированием и региональным развитием // *Вестник НГИЭИ*. 2019. № 10 (101). С. 19–27.
5. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом // *Лабораторное дело*. 1968. № 1. С. 28–30.
6. Каграманова К.А., Ермольева З.В. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима // *Антибиотики*. 1966. № 10. С. 917–919.
7. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник: в 2 т. / под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999. Т. 2. Медицинские лабораторные технологии и диагностика. 656 с.

УДК 005.6:664

## КАЧЕСТВО ПРОДУКЦИИ И ЭКОЛОГИЧНАЯ УПАКОВКА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

*Безрук Артем Сергеевич,*

*магистрант,*

*e-mail: tstu-emp@mail.ru*

*Гараникова Лидия Федоровна,*

*кандидат экономических наук, доцент,*

*e-mail: tstu-emp@mail.ru*

*Тверской государственный технический университет,*

*г. Тверь, Россия*

© Безрук А.С., Гараникова Л.Ф., 2024

**Аннотация:** указано, что в нынешних условиях производители обязаны выбирать упаковку, которая должна быть одновременно экономически выгодной и экологически чистой, сохранять качество пищевой продукции, удовлетворять эстетические запросы потребителей. Отмечено, что характеристики современных упаковочных материалов, максимально сочетающих в себе функциональные, потребительские и экологические свойства, пока хуже характеристик упаковки, произведенной из пластика. Сделан вывод, что без организации сортировки использованной обертки не будет достигнуто снижение негативного воздействия на окружающую среду.

**Ключевые слова:** качество продукции, экологически чистая упаковка, окружающая среда, утилизация, отходы, обертка, сортировка.