

## Секция «Медицинская биотехнология, клеточная и генетическая инженерия и биофармацевтика»

УДК 616-092.4

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-5-9>

### РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ И ИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

И.А. Любкевич, А.И. Зорин, О.Н. Торгованова, В.П. Молчанов, А.М. Сульман

ФГБОУ ВО "Тверской государственный технический университет", Тверь, Россия

Антимикробные препараты являются одними из самых применимых препаратов в медицинской практике. Это объясняется тем, что микроорганизмы способны существовать везде – как в теле человека, так и в окружающей среде. Микроорганизмы способны вызывать инфекции любой локализации: в дыхательных и мочевыводящих путях, коже и мягких тканях, ЦНС, желудочно-кишечном тракте, а также могут осложнять течение любых заболеваний (хирургических, гинекологических, легочных, офтальмологических и т.д.). В связи с этим, разработка и тестирование антибактериальных препаратов невероятно актуальна сейчас, как и сотни лет назад.

С учетом растущей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам перспективной стратегией борьбы с инфекционными заболеваниями становится использование бактериолитических ферментов. В качестве объекта исследования в данной работе выступали специально синтезированные образцы препаратов на основе лизоцима. Лизоцим – энзим, разрушающий клеточную стенку бактерий за счет гидролиза связей между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина в составе цепи пептидогликана. В медицине лизоцим применяют для лечения хронических септических состояний и гнойных процессов, при ожогах, отморожениях, конъюнктивитах, эрозиях роговицы, стоматитах и других инфекционных заболеваниях. Лизоцим нетоксичен, не раздражает ткани и может использоваться при плохой переносимости других антибактериальных средств. Отсутствие стабильных лекарственных форм энзима (за исключением таблеток), необходимость приготовления растворов *ex tempore* стимулируют исследования в области его иммобилизации. Инструментами для таких манипуляций предлагается использовать носители, в нашем случае это природные полимеры.

Изучение различных факторов, влияющих на свойства бактериолитических ферментов, является исключительно важной задачей, которая может углубить наше понимание особенностей защитных функций организма и дать возможность разрабатывать новые типы лекарств, способных помогать работе иммунной системы.

Несмотря на длительную историю изучения лизоцима и других бактериолитических ферментов, остается много нерешенных вопросов. В реальных условиях субстратом бактериолитического фермента являются целые живые бактериальные клетки. Многие ферментативные свойства лизоцима до сих пор были изучены только на синтетических субстратах или на ограниченном наборе стандартных модельных клеток. Для адекватного понимания особенностей действия бактериолитических ферментов в природе и при биотехнологическом использовании должен быть проработан вопрос исследования их бактериолитического действия на разнообразные реальные живые бактериальные клетки в различных условиях.

Для тестирования препаратов на основе лизоцима были использованы бактерии вида *Micrococcus luteus*, являющегося стандартной тест-культурой для спектрофотометрических методик определения антибактериальной активности ферментов. Разработана методика определения антибактериальной активности лизоцима, заключающаяся в измерении изменений оптической плотности во время действия препаратов на тестовую культуру. Лизоцим расщепляет пептидогликановую оболочку бактерий по гликозидной связи, под влиянием разности осмотического давления клетка разрушается, ее содержимое проливается в окружающую среду – в результате оптическая плотность раствора падает.

Лизис проводили при 37°C. Пробу готовили разведением 4 см<sup>3</sup> исследуемого раствора, до 5 см<sup>3</sup> субстратно-ферментативной смеси. Данные светопропускания снимали при длине волны 540 нм в 1 см кювете на спектрофотометр В-1100 по показаниям секундомера. Показания оптической плотности рассчитывали исходя из показаний пропускания. Охлаждением пробы в период детектирования пренебрегали.

Эксперименты были проведены на растворах лизоцима (рисунок 1) и лизоциме, ковалентно или адсорбционно иммобилизованном на альгинате (рисунок 2) и хитозане (рисунок 3). Носители для иммобилизации были выбраны по принципам биоразлагаемости и биосовместимости. Эти природные полимеры являются подходящими носителями для иммобилизации клеток и ферментов, поскольку они экономичны, нетоксичны, обладают высокой емкостью, нерастворимы в физиологических условиях, образуют прозрачные пленки, что дает возможность применять их в различных биотехнологических процессах, синтезе пептидов, в медицине. Кроме того, указанные полимеры обладают способностью оказывать замедляющее действие на выведение белков из крови, что может оказать существенное влияние на улучшение ряда биологических процессов.

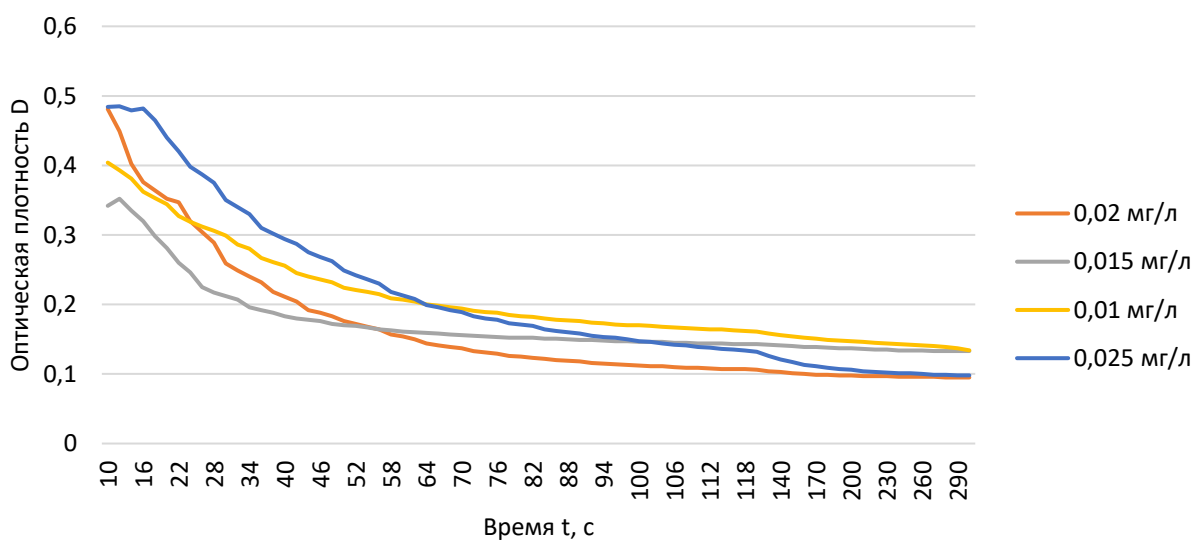


Рисунок 1 – Кинетика лизиса *Micrococcus luteus* при различном содержании лизоцима (измерение по шкале оптической плотности)

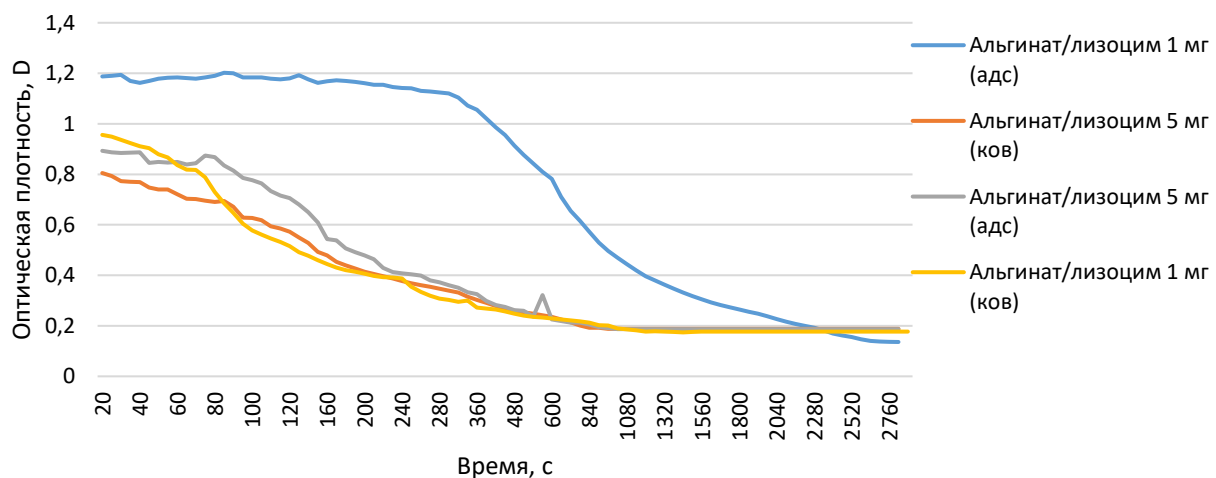


Рисунок 2 – Кинетика лизиса *Micrococcus luteus* при различном содержании лизоцима, иммобилизованного на альгинате (измерение по шкале оптической плотности)

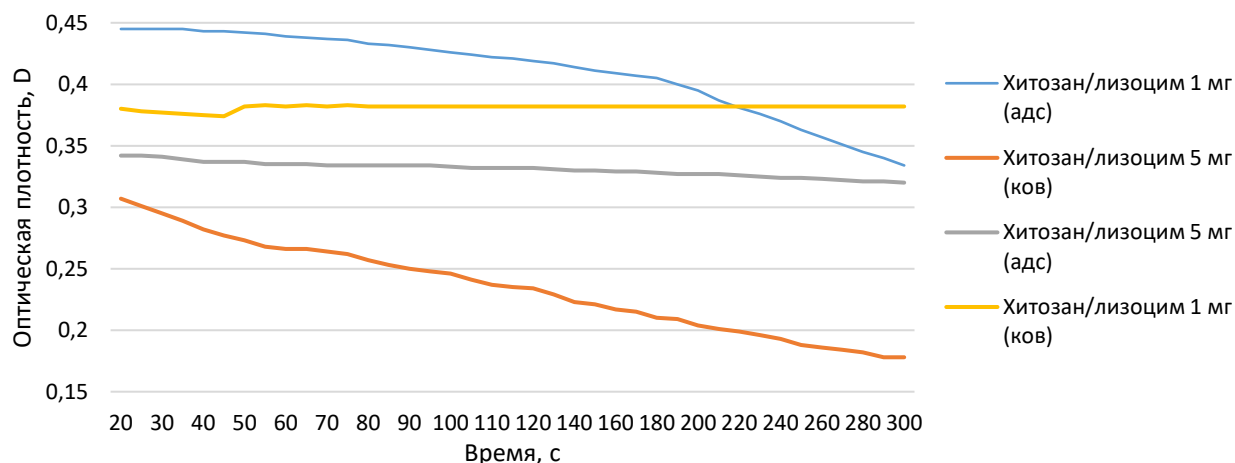


Рисунок 3 – Кинетика лизиса *Micrococcus luteus* при различном содержании лизоцима, иммобилизованного на хитозане (измерение по шкале оптической плотности)

Ковалентная иммобилизация на хитозане осуществлялась путем случайной перешивки лизоцима и хитозана глутаровым альдегидом с последующей простой отмывкой препарата от избытка сшивающего агента. Способ иммобилизации имеет существенный недостаток ввиду не полной ясности в плане структур сшивок между хитозаном и лизоцимом и неопределенной стабильности продуктов. Адсорбционно и ковалентно иммобилизованный на хитозане лизоцим показал активность на клетках *S. aureus* и *E. coli*.

Адсорбционную иммобилизацию лизоцима на хитозане осуществляли следующим образом: 1 г носителя оставляли на 1 час при комнатной температуре в 10 мл фосфатного буфера (pH 5,8). 5 мл раствора лизоцима ( $5 \times 10^{-5}$  моль/л) добавляли к суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 часов при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин, осадок промывали буфером (pH 5,8) до отсутствия белка в промывных водах, контроль осуществляли на спектрофотометре В-1100 при 280 нм.

Иммобилизация на альгинате проводилась как по описанному выше методу ковалентной сшивки, так и путем микрокапсулирования – это процесс заключения мелких частиц вещества в тонкую оболочку пленкообразующего материала. В результате микрокапсулирования получен продукт в виде отдельных микрокапсул размером от долей микрона до сотен микрон. При создании микрокапсул с веществами пептидной природы в качестве инкапсулянтов важнейшим критерием качества системы является защищенность вещества от внешних разрушающих воздействий (воздействие соляной кислоты, протеолитических ферментов и т.д.). С этой точки зрения альгинат является одним из наиболее перспективных полимеров. Матрица на основе альгината устойчива в условиях желудка и улучшает всасывание лекарства в кишечнике.

Проведенное моделирование кинетики лизиса показало большую линейность реакции у препаратов с меньшей концентрацией. Степень кривизны кинетической кривой зависит от активности раствора. Наибольшей линейностью обладают пробы с минимальным содержанием (активностью) лизоцима. Активность препаратов с иммобилизованным лизоцимом в результате была ниже активности растворов чистого лизоцима. Препараты лизоцима, адсорбционно иммобилизованного на альгинате, были более активны чем препараты, связанные ковалентно (разницы между концентрациями обнаружено не было). Препараты лизоцима, иммобилизованного на хитозане, показали аналогичные результаты.

Разработаны математические модели для экспериментальных препаратов. Смоделированы скорости лизиса культуры *Micrococcus luteus*. В ходе анализа полученных данных рассчитаны коэффициенты (таблица 1) уравнения ингибирования микробной культуры растворами лизоцима разной концентрации:

$$\frac{1}{W} = \mu_m \frac{K_i}{C_l + K_i}, \quad (1)$$

где  $W$  – скорость лизиса культуры *Micrococcus luteus* препаратами лизоцима;  $\mu_m$  – фактор лимитирования роста культуры *Micrococcus luteus* субстратом;  $K_i$  – константа ингибирования;  $C_l$  – концентрация лизоцима.

Таблица 1 – Коэффициенты уравнения ингибирования микробной культуры *Micrococcus luteus*

$C_{л}$ , мг/л	W	1/W	$\mu_m$	$K_i$
0,025	0,003253	307,3975	-0,00576	-995,085
0,02	0,002748	363,9293		
0,015	0,001404	712,4969		
0,01	0,000792	1261,862		
0,07	0,008197	2645,685		

Рассчитана константа скорости и частные порядки реакции (таблица 2) по уравнению кинетики каталитического процесса лизиса культуры *Micrococcus luteus*:

$$W = k \times C_m^{n_m} \times C_{л}^{n_{л}}, \quad (2)$$

где  $k$  – константа скорости лизиса;  $C_m$  – концентрация культуры *Micrococcus luteus*;  $n_m$  – частный порядок реакции по клеткам культуры *Micrococcus luteus*;  $C_{л}$  – концентрация лизоцима;  $n_{л}$  – частный порядок реакции по лизоциму.

Таблица 2 – Коэффициенты уравнения кинетики лизиса культуры *Micrococcus luteus*

$C_{л}$ , мг/л	W	$n_m$	$n_{л}$	k
0,025	0,003253	0,5412	1,09	2,69
0,02	0,002748	0,3633		
0,015	0,001404	0,6239		
0,01	0,000792	0,4283		
0,07	0,008197	0,4433		

Таким образом, установлен первый порядок реакции по лизоциму и полупорядок реакции по *Micrococcus luteus*. Первый порядок означает наличие лишь одного субстрата реакции лизиса и возможность выбора для анализа уравнения кинетики Михаэлиса-Ментен, которое показывает зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата:

$$W = \frac{V_m \times C_m}{K_m + C_m}, \quad (3)$$

где  $V_m$  – максимальная скорость реакции при данной концентрации субстрата;  $K_m$  – константа Михаэлиса.

Полупорядок по *Micrococcus luteus* объясняется наличием диффузионных ограничений в реакции. Рассчитаны коэффициенты  $V_m$  и  $K_m$  уравнения Михаэлиса-Ментен для разных концентраций раствора лизоцима (таблица 3).

Таблица 3 – Коэффициенты уравнения Михаэлиса-Ментен

$C_{л}$ , мг/л	W	$V_m$	$K_m$
0,025	0,003253	0,0062	0,3639
0,02	0,002748	0,0054	0,3095
0,015	0,001404	0,0041	0,5408
0,01	0,000792	0,0033	0,8717

В результате выполнения исследований экспериментально подтверждена эффективность разработанных ферментативных препаратов лизоцима на основе биосовместимых полимерных носителей. Перспективность создания иммобилизованных форм лизоцима на основе альгината и хитозана обусловлена полной экологической безопасностью разрабатываемых технологических процессов и высокой экономической эффективностью технологии за счет использования безотходных технологий и дешевого и доступного отечественного сырья для получения высококачественных конечных продуктов – биологически активных веществ и готовых лекарственных препаратов на их основе.

Предложенная в работе методика биотехнологического тестирования является достаточно эффективной и может быть использована на фармацевтических, биотехнологических и пищевых предприятиях для лабораторного контроля качества готовых препаратов, обладающих антимикробной активностью, а также в научно-исследовательской практике. В ходе дальнейших исследований предполагается распространить данную методику для исследования более широкого спектра антимикробных препаратов и антисептических средств.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-79-10042).*

#### Литература

1. Critical Reviews in Biotechnology. 2016. Vol. 36. № 6. P. 1078–1088. doi: 10.3109/07388551.2015.1084263
2. Naveed M., Wang Y. Purification, characterization and bactericidal action of lysozyme, isolated from *Bacillus subtilis* BSN314: a disintegrating effect of lysozyme on Gram-positive and Gram-negative bacteria // *Molecules*. 2023. Vol. 28. № 1. P. 290–301. doi: 10.3390/molecules28010290
3. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск: Издательство Томского университета, 1974. 209 с.

УДК 602.7

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-9-10>

## РАЗРАБОТКА УСТАНОВКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЗОНИРОВАННОЙ ВОДЫ

**Ю.А. Романцова, Л.Р. Григорьян, М.И. Гордин, Е.В. Тяжолова**

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия*

Озонирующая вода – это уникальный раствор, в который добавлен озон ( $O_3$ ), обладающий множеством полезных свойств. Озон, как известно, является мощным окислителем, что делает озонирующую воду особенно эффективной в борьбе с различными патогенными микроорганизмами.

Для проведения озонотерапевтических процедур был разработан аппарат для получения озонирующей воды. Устройство состоит из двух резервуаров, в одном из которых находится дистиллированная вода, в другом озонатор, двух блоков питания, насоса, блока управления, датчиков озона, аэраторов.

В качестве источников озона рассматривались различные виды озонотенерирующих устройств, такие как:

- Газоразрядная лампа высокого давления ДРК 120;
- Четыре газоразрядные лампы низкого давления ДРН 8;
- Высокочастотный высоковольтный генератор.

В ходе проведенных предварительных испытаний было принято решение использовать высокочастотный высоковольтный генератор в качестве источника озона, в связи с тем, что ультрафиолетовые лампы С–диапазона имеют низкую производительность и КПД.

На рисунке 1 изображена схема экспериментальной установки для получения озонирующей воды, методом аэрации озоном, полученным посредством коронного разряда.

В данной установке озон образуется за счет коронного электрического разряда, который образуется в условиях, когда электрическое поле вокруг проводника сильно неоднородно. В подобного вида озонаторах используются два электрода: высоковольтный и заземленный. Под воздействием электрических разрядов молекулы кислорода расщепляются (происходит диссоциация электронным ударом) с последующим образованием трёхатомного озона. В стандартных условиях производительность этого метода достигает до 20 г/ч. С помощью системы подачи газа, регулирующей поток озон-кислородной смеси, озон по трубкам попадает во второй резервуар (с водой), где через множество отверстий (аэраторов) насыщает воду озоном, а остальные пары и газы циркулируют обратно в резервуар с озонатором. Данный процесс протекает по кругу, пока не закончится кислород в первом резервуаре, либо вода полностью не насытится озоном.