УДК 615.07

С.Л. Сафронюк, Э. Р. Абдураманова, А.М. Кацев

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АЛЬГИНАТНЫХ ГЕЛЕЙ С ХЛОРГЕКСИДИНОМ МЕТОДОМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского

Ключові слова: *біолюмінесцентний аналіз, альгинатний гель, вивільнення, хлоргексидин.*
Ключевые слова: *биолюминесцентный анализ, альгинатный гель, высвобождение, хлоргексидин.*
Keywords: *bioluminescent analysis, alginate gel, releasing, chlorhexidine.*

Показана можливість використання біолюмінесцентного аналізу в біофармацевтичних дослідженнях, зокрема для оцінки впливу різних біофармацевтичних чинників на швидкість вивільнення лікарських речовин з лікарських форм. Встановлено дію лікарської речовини - хлоргексидина, що інгібує біолюмінесценцію бактерій *Photobacterium leiognathi* Sh1, а також вивчено вплив компонентів альгинатного гелю на їх свічення. Встановлено, що швидкість вивільнення хлоргексидину з альгинатного гелю залежить від способу введення лікарської речовини в гель і від щільності гелю.

Показана возможность использования биолюминесцентного анализа в биофармацевтических исследованиях, для оценки влияния различных биофармацевтических факторов на скорость высвобождения лекарственных веществ из лекарственных форм. Установлено ингибирующее действие лекарственного вещества – хлоргексидина на биолюминесценцию бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1, а также изучено влияние компонентов альгинатного геля на их свечение. Показано, что скорость высвобождения хлоргексидина из альгинатного геля зависит от способа заключения лекарственного вещества в гель и от плотности геля.

Possibility of bioluminescent analysis application in biopharmaceutical researches, including the assessment of different biopharmaceutical factors influence on a speed of releasing of medicinal substances from medicinal forms, was shown. The inhibiting effect of medicinal substance - chlorhexidine on bioluminescence of bacteria *of Photobacterium leiognathi* Sh1 was established, and also influence of alginate gel components on their luminescence was studied. Dependence of speed of chlorhexidine releasing from alginate gels on the technique of introducing of medicinal substance into the gel and the gel density was established.

Для изучения высвобождения лекарственных веществ из лекарственных форм используется весь арсенал аналитических методов количественного анализа, а также биологические методы. Такие исследования необходимы при создании новых лекарственных препаратов, совершенствовании существующих лекарственных форм, разработки терапевтических систем с контролируемыми высвобождением и доставкой [1].

В данной работе изучается возможность использования биолюминесцентного анализа для биофармацевтических исследований высвобождения лекарственных веществ из лекарственных форм. В основе этого биотеста лежит измерение интенсивности люминесценции морских светящихся бактерий в присутствии анализируемых проб в сравнении с контрольными значениями. Действие образцов оценивается по степени ингибировании бактериальной люминесценции. Биотест нашел широкое применение во многих странах для анализа химической токсичности водных сред, сточных вод предприятий, природной и питьевой воды [2].

Проведенные нами исследования показали, что биолюминесцентный метод может быть использован также для анализа лекарственных препаратов, обладающих антисептической, антибиотической, цитотоксической и другими видами активности. Это открывает широкие возможности использования такого подхода в фармацевтических исследованиях. Различные биофармацевтические факторы (лекарственная форма, вспомогательные вещества, технология производства и др.) оказывая влияние на эффективность лекарственного препарата, могут быть оценены с помощью биолюминесцентного метода.

ЦЕЛЬЮ данной **РАБОТЫ** было изучить возможность использования морских светящихся бактерий для оценки скорости высвобождения лекарственного вещества хлоргексидина из альгинатных гелей различной плотности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали морские светящиеся бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенные авторами из Азовского моря. Штамм был идентифицирован в соответствии с существующими рекомендациями по определению бактерий семейства Vibrionacea [3] и рекомендациями по быстрой идентификации фотобактерий [4].

Для проведения биолюминесцентного анализа хлоргексидина бактерии культивировали на жидкой питательной среде в течение 12 ч, а затем разводили 1:1000 3% раствором хлорида натрия. В кювету люминометра вносили 1,0 мл 3% хлорида натрия, раствор хлоргексидина биглюконата (ОКВП «Фармация», Луганск) в объеме 5 – 50 мкл и суспензию бактерий в объеме 50 мкл (конечная концентрация $5 \cdot 10^5$ кл/мл). Определяли интенсивность биолюминесценции полученных образцов с помощью биохемилюминометра БЛМ-8801 (СКТБ «Наука», Россия) через каждые 10 минут, в течение 30 мин. Полученные зависимости интенсивности свечения от концентрации антисептика обрабатывали с помощью компьютерной программы Excel для получения линейных зависимостей и определения математических характеристик ингибирования.

Для оценки влияния альгината натрия и хлорида кальция на активность хлоргексидина в биолюминесцентном методе, в пробы, вместо 3%-го раствора хлорида натрия, вводили 500 мкл 1% раствора альгината натрия (или 500 мкл 5%-го хлорида кальцит), 250 мкл воды и 250 мкл 12%-го раствора хлорида натрия. Остальная часть методики оставалась без изменений.

Для приготовления гелей альгината кальция с хлоргек-

© С.Л. Сафронюк, Э. Р. Абдураманова, А.М. Кацев, 2009

сидином использовали 1%-й раствор альгината натрия (A. Johnson Matthey Company, United Kingdom) и раствор хлорида кальция с концентрацией от 0,05 – 5%. Смешивание проводили в следующем порядке: к раствору альгината натрия прибавляли хлоргексидин, после чего прибавляли раствор хлорида кальция соответствующей концентрации. Смеси выдерживали 1,5 – 2 ч при комнатной температуре для завершения гелеобразования.

Плотность гелей оценивали фотометрически с помощью фотоэлектроколориметра КФК-2, по оптической плотности при длине волны 315 нм. Значение длины волны подбирали экспериментально по максимальным значениям поглощения и светорассеяния получаемых гелей.

Для оценки высвобождения хлоргексидина, в кюветах люминометра готовили по 0,5 мл гелей альгината натрия, как описано выше. На полученные образцы наслаивали по 0,5 мл суспензии светящихся бактерий ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) и измеряли люминесценцию в автоматическом режиме, через каждые 5 мин до полного тушения (снижения до нуля). Расчеты высвобождения проводили в микрограммах хлоргексидина в час, для чего использовали полученные ранее калибровочные кривые и уравнения линейной зависимости интенсивности биолюминесценции в % от концентрации антисептика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения биофармацевтических исследований лекарственных форм на первом этапе нужно иметь информацию о действии лекарственного вещества и возможности его количественного определения.

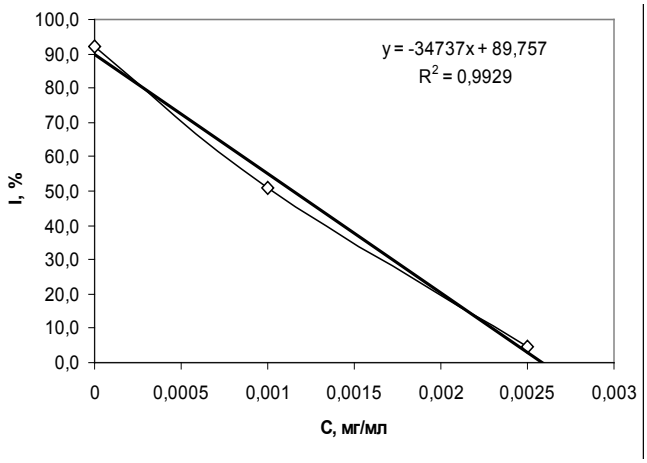

Рис. 1. Калибровочные кривые для оперделения концентрации хлоргексидина биолюминесцентным методом.

Для определения хлоргексидина в работе был использован биолюминесцентный метод. Он позволяет неспецифически, не зависимо от механизма действия лекарственных веществ, определять их концентрацию по биологическому действию на морские светящиеся бактерии. Эти бактерии излучают видимый глазом свет с длиной волны 480 нм и большое число факторов, действующих на клеточные мембраны, синтетический аппарат клетки, ферментативную активность, приводят к ингибированию их свечения [5]. При анализе хлоргексидина использовали люминесцентные бактерии *P. leiognathi* Sh1, выделенные авторами из Азовского моря. Детальное изучение этого штамма выявило его высокую чувствительность к действию химических веществ различной структуры и биологической активности [6]. Хлоргексидин является катионным поверхностно-активным веществом, которое оказывает сильное бактериостатическое и бактерицидное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. В экспериментах он ингибировал биолюминесценцию светящихся бактерий в интервале концентраций 0,3 мкг/мл до 3 мкг/мл практически линейно (R^2=0,9929), *рис. 1.* Компьютерная линеаризация кривой с помощью программы Microsoft Excel дала уравнение С(мг/мл) = (89,757-I(%))/347368 позволяющее автоматически преобразовывать значения биолюминесценции в соответствующую концентрацию антисептика.

Для оценки высвобождения лекарственного вещества из альгинатных гелей, было изучено действие хлоргексидина на светящиеся бактерии в присутствии компонентов геля: альгината натрия и хлорида кальция. Результаты показали, что альгинат натрия оказывает незначительное влияние на ингибирующие свойства антисептика, в то время, как хлорид кальция приводит к значительному снижению активности хлоргексидина, *рис.2.* При этом эффективные концентрации антисептика, снижающие бактериальную биолюминесценцию на 50% увеличивались от 0,0010 мг/мл, для хлоргексидина в свободном виде, до 0,0022 мг/мл, в присутствии альгината натрия и 0,025 мг/мл, для хлоргексидина в присутствии хлорида кальция. Смешивание антисептика с хлоридом кальция приводило также к помутнению раствора и образованию осадка.

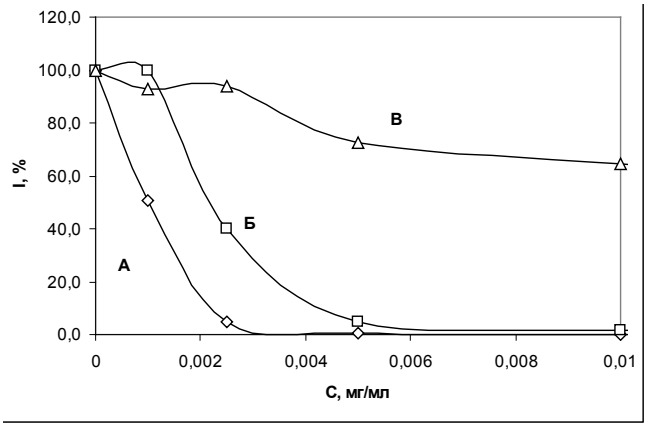

Рис.2 Ингибирование бактериальной биолюминесценции хлоргексидином в присутствии альгината натрия и хлорида кальция: **А** – хлоргексидин; **Б** – хлоргексидин в присутствии альгината натрия, **В** – хлоргексидин в присутствии хлорида кальция

Исходя из полученных данных, для оптимизации технологии получения альгинатных гелей с хлоргексидином, был выбран следующий порядок смешивания компонентов: в приготовленный 1% раствор альгината натрия вводили хлоргексидин, а затем прибавляли хлорид кальция для образования геля.

В результате были получены формы, консистенция которых менялась от вязких жидкостей до двухфазных систем с плотными гелевыми сгустками, *таблица 1.*

© С.Л. Сафронюк, Э. Р. Абдураманова, А.М. Кацев, 2009

Таблица 1.

Состав и свойства гелей альгината кальция

№	Состав геля			Оптическая плотность	Физико-химические свойства
	Альгинат натрия	Хлорид кальция	Хлоргексидин		
1	1%	0%	0,005%	0,016	вязкий раствор
2	1%	0,05%	0,005%	0,033	вязкий раствор
3	1%	0,1%	0,005%	0,04	вязкий раствор
4	1%	0,2%	0,005%	0,05	гель
5	1%	0,3%	0,005%	0,07	гель
6	1%	0,4%	0,005%	0,11	Двухфазная система гель-раствор
7	1%	0,5%	0,005%	0,145	Двухфазная система гель-раствор
8	1%	1%	0,005%	0,18	Двухфазная система гель-раствор
9	1%	1,75%	0,005%	0,225	Двухфазная система гель-раствор
10	1%	2,5%	0,005%	0,32	Двухфазная система гель-раствор
11	1%	5%	0,005%	0,47	Двухфазная система гель-раствор

Для изучения высвобождения хлоргексидина были выбраны формы (1 – 5) с однородной консистенцией. При более высоких концентрациях хлорида кальция, пробы расслаивались с образованием гелевого сгустка и жидкости и были непригодны для оценки высвобождения.

Для оценки высвобождения хлоргексидина из полученных лекарственных форм в данной работе был использован метод, основанный на измерении биолюминесценции светящихся бактерий. При контакте полученных альгинатных форм хлоргексидина с бактериальной суспензией происходило высвобождение антисептика, что приводило к прогрессирующему ингибированию биолюминесценции во времени, *рис. 3*.

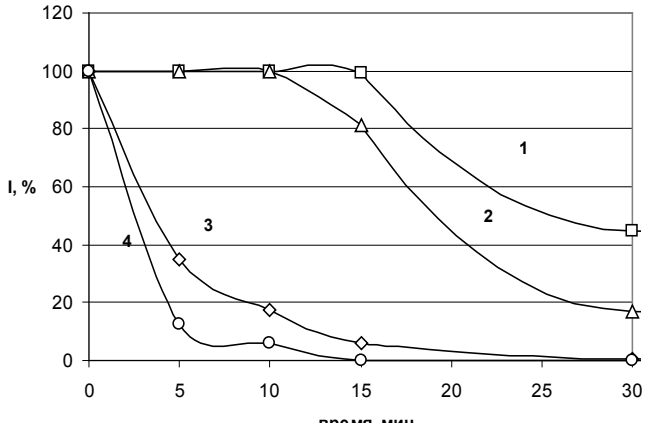

Рис.3. Кинетика высвобождение хлоргексидина из гелей альгината кальция, полученных при разных концентрациях хлорида кальция: 1 – 0,3%; 2 – 0,2%; 3 – 0,1%; 4 – 0,05%.

Кинетика биолюминесценции регистрировалась в автоматическом режиме с помощью самописца и вся измерительная система представляла собой, фактически биосенсор, работающий в режиме on line. Полученные зависимости показали, что скорость высвобождения хлоргексидина определяется плотностью альгинатного геля, *рис.3*. Используя калибровочную кривую *(рис.1)* и полученное для нее уравнение, можно заключить, что при увеличении содержания хлорида кальция в гелях от 0,05% до 0,3%, плотность геля увеличивается приблизительно в 2 раза, что приводит к уменьшению скорости высвобождения антисептика от 2,7 до 0,27 мкг/ч. Такие значения скорости высвобождения лекарственного вещества означают, что полное высвобождение хлоргексидина из гелей произойдет за период от 1 ч до 10 ч.

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Panchagnula P., Thomas N.* Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research // Int. J. Pharmac. – 2000. – V. 201(2). – P. 131 – 150.

2. *Girotti S., Nora Ferri E, N., Grazia Fumo M., Maolini E.* Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria // Analytica Chimica Acta. – 2008. – V. 608 (1). – P. 2-29.

3. Определитель бактерий Берджи. Т. 1./Под ред. *Дж.. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, С. Уильямса*. – М.: Мир, 1997.-432 с.

4. Светящиеся бактерии. / *Гительзон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др.* Новосибирск: Наука, 1984, 279 с.

5. *Ren S., Fryimer P. D.* Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays// Chemosphere. - 2005. - V. 58. - P. 543-556.

6. *Кацев А.М., Макемсон Дж.* Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2006. – Т. 19(58), №4. – С. 111-116.

Сведения об авторах: Кацев Андрей Моисеевич кандидат химических наук доцент
Адрес: КГМУ, кафедра фармации, бульвар Ленина 5/7., г. Симферополь 95006, Крым, Украина
тел.: 8-0652-294-918 E-mail: katsev@mail.ru

© С.Л. Сафронюк, Э. Р. Абдураманова, А.М. Кацев, 2009