

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Манський Олександр Анатолійович**

УДК 615.322:615.451:615.014,45:615.33:577.18,03

**ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТАБІЛІЗУЮЧОГО ВПЛИВУ  
γ-ОПРОМІНЮВАННЯ НА ПОХІДНІ АМІНОГЛІКОЗИДІВ**

15.00.01 - технологія ліків та організація фармацевтичної справи

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі мікробіології, імунології та вірусології Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України

**Науковий керівник:**

доктор медичних наук, професор

**ДИКИЙ ІГОР ЛЕОНІДОВИЧ**

*Національний фармацевтичний університет,  
професор кафедри мікробіології, імунології та  
вірусології*

**Офіційні опоненти:**

доктор фармацевтичних наук, професор

**ЗАЙЦЕВ ОЛЕКСАНДР ІВАНОВИЧ**

*Національний фармацевтичний університет, завідувач  
кафедри процесів та апаратів хіміко-фармацевтичних  
виробництв*

кандидат фармацевтичних наук

**СПИРИДОНОВ АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ**

*Фармацевтична компанія “Здоров’я”,  
заступник директора по виробництву з питань  
наукових розробок*

Захист відбудеться “   3   ” \_\_\_\_\_ липня \_\_\_\_\_ 2008 року о   10<sup>00</sup>   годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.02 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий “   2   ” \_\_\_\_\_ червня \_\_\_\_\_ 2008 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
доктор фармацевтичних наук, професор

*Д.І. Дмитрієвський*

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Антибіотики відносяться до групи лікарських препаратів, що не підлягають перекональному контролю після закінчення регламентних термінів зберігання. Втрата специфічної активності відбувається навіть під час встановлених термінів придатності. Актуальним завданням є стабілізація антимікробних препаратів під час їхнього зберігання.

Таким чином, для антибіотиків (за умов їхньої хімічної цілісності), які знизили активність під час позарегламентних термінів зберігання, актуальним є підвищення її до рівнів, притаманних комерційним зразкам.

Клінічною медициною досліджено, що зниження специфічної активності призводить до появи антибіотикорезистентних штамів патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів у вогнищах гнійних та запальних захворювань. Номенклатура антибіотиків та антисептиків, незважаючи на появу нових поколінь препаратів, не забезпечує достатнього лікувального ефекту. З метою подолання появи антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів обґрунтованою є задача надання антибіотикам властивостей антисептиків.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету “Створення нових лікарських препаратів на основі рослинної і природної сировини, зокрема продуктів бджільництва для дорослих і дітей” (№ державної реєстрації 0198U007008) та проблемної комісії ”Фармація” МОЗ та АМН України.

**Мета і завдання дослідження.** На експериментально-теоретичному рівні обґрунтувати потенціюючий вплив  $\gamma$ -опромінювання на підвищення бактерицидних властивостей антибіотиків, збільшення термінів їх зберігання, відновлення вихідних рівнів антимікробної активності.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- проаналізувати і узагальнити сучасні літературні дані щодо шляхів підвищення специфічної активності антибіотиків;
- простежити зниження рівнів антимікробної активності антибіотиків на зразках стрептоміцину сульфату продовж регламентованих термінів придатності;
- встановити закономірні фізико-хімічні зміни у досліджуваних антибіотиках на зразках з суттєво перевищеними термінами придатності;
- обґрунтувати здатність впливу  $\gamma$ -опромінювання підвищувати рівень бактерицидної активності антибіотиків з регламентними термінами зберігання та потенціювальний вплив на антибіотики з перевищеними термінами зберігання;
- обґрунтувати оптимальну дозу  $\gamma$ -опромінювання;
- на прикладі дослідження комерційних зразків стрептоміцину сульфату вивчити стабілізуючий вплив  $\gamma$ -опромінювання;

- на прикладі дослідження зразків стрептоміцину сульфату з простроченими термінами придатності розкрити фізико-хімічний механізм відновлюючої дії  $\gamma$ -опромінювання;
- розробити технологічну схему виробництва та принципову технічного комплексу для дозозалежного  $\gamma$ -опромінювання стрептоміцину сульфату;
- дослідити зразки стрептоміцину сульфату на гостру і хронічну токсичність під впливом  $\gamma$ -опромінювання на моделях локалізованої та генералізованої стафілококової інфекції в експериментальних тварин.

*Об'єкт дослідження.* Ліофілізована форма стрептоміцину сульфату.

*Предмет дослідження.* Розробка технології  $\gamma$ -опромінювання, що забезпечує стабілізацію антибіотика – похідного аміноглікозидів.

*Методи дослідження.* Конформаційні характеристики молекули антибіотика стрептоміцину сульфату вивчали за допомогою інфрачервоної спектроскопії, спектроскопії комбінаційного розсіювання світла, поляризаційних методів аналізу. Технологічні властивості порошоків антибіотиків визначали за фармакопейними методами. Стабільність молекули стрептоміцину сульфату досліджена за допомогою методів спектроскопії ядерного магнітного резонансу та тонкошарової хроматографії. Визначення бактерицидної і бактериостатичної дії досліджуваних зразків стрептоміцину сульфату здійснювали за допомогою мікробіологічних методів. Фармакологічні дослідження проводили за загальноприйнятими методиками.

Зазначені методи дослідження застосовано для зразків стрептоміцину сульфату комерційних, з простроченим терміном зберігання та після  $\gamma$ -опромінювання.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше в Україні теоретично та експериментально обґрунтовано потенціувальну здатність  $\gamma$ -опромінювання підвищувати бактерицидні властивості стрептоміцину сульфату, подовжувати регламентні терміни його зберігання та відновлювати вихідні рівні антибактеріальної активності у зразків з термінами зберігання, що закінчились.

Досліджено механізм зниження антибактеріальної активності антибіотиків на початкових етапах “старіння”. Доведено, що  $\gamma$ -опромінювання відновлює специфічну активність стрептоміцину сульфату та підвищує рівень бактериостатичної.

Встановлено дозу  $\gamma$ -опромінювання в 7 Гр, що забезпечує відповідні фізико-хімічні та біологічні ефекти у вираженості специфічної активності антибіотика.

Розроблено технологічну схему виробництва та принципову технічного комплексу для дозованого  $\gamma$ -опромінювання стрептоміцину сульфату.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено технологію стабілізації стрептоміцину сульфату шляхом дозованого  $\gamma$ -опромінювання (7 Грей), що відповідно подовжує терміни зберігання комерційних зразків антибіотика. Цей

ефект є підґрунтям для впровадження розробленої технології  $\gamma$ -опромінення в технологічний процес виробництва стрептоміцину сульфату.

Показано, що в умовах позарегламентних термінів придатності антибіотики закономірно знижують початкові рівні специфічної активності, з метою стабілізації запропоновано проводити дозоване  $\gamma$ -опромінення в процесі зберігання препарату.

Розроблена технологія включена до перспективного плану розвитку на ЗАТ „Біолік” (акт від 16 березня 2006 р.).

**Особистий внесок здобувача.** В опублікованих працях зі співавторами І.Л. Диким, Н.І Філімоною, О.В. Шаповаловим, В.І. Чуєшовим, О.М. Дикою, А.П. Домарьовим, Т.В. Больбух автором особисто: здійснено пошук та аналіз літературних джерел з проблеми, що вирішується; здійснено вибір джерела  $\gamma$ -випромінювання; визначено дозу  $\gamma$ -опромінювання, що закономірно підвищує антимікробні властивості антибіотиків; обґрунтовано вибір необхідних фізико-хімічних методів аналізу досліджуваних зразків антибіотика; проведено у співставленні технологічні дослідження комерційних та опромінених зразків стрептоміцину сульфату; узагальнено результати доклінічних фармакологічних досліджень препарату.

**Апробація результатів роботи.** Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на: II Московському міжнародному конгресі “Біотехнологія: состояние и перспективы развития” (м. Москва, 2003 р.), Міжнародній науковій конференції “Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями” (м. Харків, 2003 р.), I-й Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Біотехнологія. Освіта. Наука.” (м Київ, 2003 р.), VI Національному з’їзді фармацевтів України (м Харків, 2005 р.), III Міжнародній науково-практичній конференції „Актуальні проблеми сучасних наук: теорія та практика )” 6002’м Дніпропетровськ, 2006 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 робіт, у тому числі 3 статті в наукових фахових виданнях, 5 тез доповідей, а також 1 стаття в науковому журналі медичного напрямку та 1 методичні рекомендації.

**Обсяг і структура дисертації.** Роботу викладено на 128 сторінках, складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальної частини (розділи 2-5), загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 191 найменування, у тому числі 50 іноземних, та додатків. Роботу ілюстровано 7 рисунками та 14 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, сформульовано задачі дослідження, наведено відомості про наукову новизну і практичне значення одержаних результатів.

**Перший розділ** “Фармакологічне обґрунтування способів підвищення специфічної активності та термінів зберігання антимікробних препаратів” присвячений огляду літератури, який включає відомості щодо впливу режимів зберігання на специфічну активність антибіотиків. Показано, що одним з важливих завдань сучасної клінічної медицини є подолання формування у мікроорганізмів антибіотикорезистентності та розширення термінів придатності використовуваних антимікробних препаратів, що досягається шляхом фізико – хімічних модифікацій. Останнім часом достатньо поширена радіаційна обробка, зокрема  $\gamma$ -опромінення антибіотиків з метою їхньої стерилізації. Разом з тим залишається практично невивченим питання щодо спрямованої активності малих, стерилізаційно неактивних доз  $\gamma$ -опромінення та їх вплив на початкові біологічні властивості антибіотиків. Останнє є перспективним щодо подальшого поглибленого фармакологічного дослідження з метою застосування оптимальних режимів  $\gamma$ -опромінення у позитивному впливі на регламентну активність антибіотиків та забезпечення реверсування заданої фармакологічної активності у зразках, що знизили її у межах передбаченого або простроченого терміну зберігання.

**У другому розділі** “Обґрунтування загальної методології та методів досліджень” викладено загальну методологію проведення досліджень, характеристика об’єктів дослідження, а також обґрунтовано вибір методик, що використані для проведення досліджень. Описано методи фізико-хімічних та біофармацевтичних досліджень.

**У третьому розділі** “Вплив термінів зберігання на основні властивості антибіотиків” наведено результати експериментальних досліджень впливу термінів зберігання на антимікробні та фізико – хімічні властивості антибіотиків.

При проведенні досліджень як аксіомне положення прийнято таке: у процесі дворічного зберігання антибіотик змінює початкові рівні своєї специфічної активності, виразність якої має бути пропорційною часу, що минув від виробництва препарату. Тому як задачу досліджень було визначено вивчення рівня втрати антимікробної активності зразків шести серій стрептоміцину сульфату в умовах прискореного „старіння” – протягом 48 днів при температурі 40 °С, що відповідає їх дворічному зберіганню за звичайних умов. Дані експерименту наведено в табл. 1. Встановлено, що стрептоміцину сульфат в умовах прискореного “старіння” закономірно знижує початкові рівні антибактеріальної активності.

Оскільки метод прискореного “старіння” може розглядатися як більш жорсткий порівняно з передбаченими умовами зберігання антибіотиків у процесі використання, було доцільним підтвердити закономірність установлених мікробіологічних відхилень шляхом зіставлення значень специфічної активності антибіотиків з відповідними і простроченими термінами зберігання.

**Динаміка зміни рівнів антимікробної активності стрептоміцину сульфату в умовах прискореного “старіння”**

Термін дослідження, днів	Тест штами	Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК), мкг/мл						Середнє значення, мкг/мл	% втрати активності від контролю
		Серія зразків стрептоміцину сульфату							
		№1	№2	№3	№4	№5	№6		
Початк.	<i>S. aureus</i>	3,75	4,50	4,50	3,75	3,75	7,50	4,6	0
Початк.	<i>E. coli</i>	14,40	12,50	14,60	15,80	14,40	15,00	14,4	0
8	<i>S. aureus</i>	4,00	4,50	4,50	4,00	4,00	7,50	4,6	0
8	<i>E. coli</i>	14,20	14,70	14,70	16,00	14,20	16,00	14,9	3,4
16	<i>S. aureus</i>	4,50	5,00	4,50	4,50	5,00	8,00	5,2	13
16	<i>E. coli</i>	14,60	15,20	15,20	16,00	15,00	18,00	15,7	19
24	<i>S. aureus</i>	5,00	5,50	5,20	5,00	5,50	8,50	5,8	26
24	<i>E. coli</i>	15,50	15,50	16,00	16,20	16,00	22,00	16,8	17
32	<i>S. aureus</i>	5,50	6,00	5,50	5,50	6,00	5,00	6,2	34
32	<i>E. coli</i>	16,00	16,00	18,00	17,00	18,00	25,00	18,0	27
40	<i>S. aureus</i>	6,20	6,50	6,00	6,20	6,50	10,00	6,9	47
40	<i>E. coli</i>	16,50	16,50	18,00	18,00	20,00	27,00	19,3	34
48	<i>S. aureus</i>	6,50	6,50	6,20	6,50	6,50	12,00	7,3	58
48	<i>E. coli</i>	17,00	17,00	18,00	20,00	22,00	28,00	20,3	40

Тому, у подальших мікробіологічних дослідженнях поряд зі стрептоміцину сульфатом порівнювали активність зразків бензилпеніциліну натрієвої солі, цефазоліну, тетрацикліну і левоміцетину. Результати проведених досліджень наведено в табл. 2.

Таблиця 2

**Порівняльна характеристика антимікробної активності антибіотиків придатних і тих, що перевищили регламентовані терміни зберігання, n=6**

Антибіотик	Перевищення термінів зберігання	МІК, мкг/мл		
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
1	2	3	4	5
Бензилпеніциліну натрієва сіль	Контроль	4,20±0,06	3,60±0,06	14,20±0,04
	на 1 рік	4,50±0,02	3,90±0,02	14,80±0,11
	на 3 роки	4,80±0,06	4,20±0,06	15,50±0,10
	на 5 років	5,40±0,32	5,00±0,18	16,80±0,30

1	2	3	4	5
Стрептоміцину сульфат	Контроль	2,80±0,04	2,80±0,06	6,20±0,01
	на 1 рік	3,00±0,02	3,10±0,01	6,50±0,07
	на 3 роки	3,30±0,07	3,20±0,01	6,80±0,01
	на 5 років	3,80±0,07	3,40±0,05	6,90±0,02
Цефазолін	Контроль	5,20±0,05	6,20±0,03	8,40±0,07
	на 1 рік	5,40±0,01	6,40±0,02	8,70±0,01
	на 3 роки	5,60±0,04	6,80±0,1	9,10±0,11
	на 5 років	5,80±0,02	7,20±0,01	10,00±0,16
Тетрацикліну гідрат	Контроль	12,60±0,05	8,40±0,09	6,20±0,05
	на 1 рік	12,90±0,03	8,80±0,03	6,50±0,03
	на 3 роки	15,50±0,14	9,60±0,21	6,90±0,09
	на 5 років	14,00±0,01	10,90±0,19	7,50±0,06
Левоміцетин	Контроль	15,00±0,1	16,00±0,2	16,20±0,15
	на 1 рік	16,20±0,25	16,80±0,04	16,90±0,06
	на 3 роки	17,40±0,1	17,70±0,23	18,10±0,32
	на 5 років	17,80±0,02	19,00±0,17	19,30±0,06

Аналізуючи дані табл. 2, нами зроблено висновок: для всіх досліджених антибіотиків з простроченим терміном зберігання простежується закономірне зниження регламентної антибактеріальної активності.

Таким чином, проведені дослідження показали, що зіставлення первинної і втраченої мікробіологічної активності є чутливим критерієм визначення рівня і ступеня "старіння" досліджуваних антибіотиків. Окрім антимікробних властивостей, необхідність обмеження термінів зберігання антибіотиків, зумовлена змінами основних технологічних та фізико-хімічних характеристик, які притаманні кожному з препаратів. Вірогідною причиною зниження початкових рівнів антимікробної активності може бути зміна фізико-хімічних властивостей антибіотика. При цьому, як правило, з метою їх дослідження найчастіше застосовуються такі методи: високоефективної рідкісної хроматографії (ВЕРХ), тонкошарової хроматографії (ТШХ) та поляризаційні.

Нами була вивчена залежність зміни окремих фізико-хімічних характеристик антибіотиків від терміну зберігання. Як початковий фізико-хімічний метод був обраний поляризаційний, за допомогою якого вивчали зміну кутів питомого обертання молекули досліджуваних антибіотиків. Результати проведеного аналізу свідчать, що за абсолютними значеннями зниженню антистафілокової активності левоміцетину в прострочених зразках кореляційно відповідає зменшення кута



питомого обертання. Аналогічну тенденцію простежено і для стрептоміцину сульфату.

Таким чином, логічно припустити, що одним з об'єктивних методів фізико-хімічної оцінки відповідності специфічних властивостей антибіотиків може бути врахування змін показників початкового кута питомого обертання.

На підставі аналізу отриманих попередніх результатів наступним кроком було детальне вивчення фізико-хімічних змін, що відбуваються в молекулі антибіотика під час його зберігання, та розробка технології  $\gamma$ -опромінення з метою подовження терміну його зберігання.

У **четвертому розділі** “Розробка технології  $\gamma$ -опромінення антибіотиків та вивчення їх активності” на першому етапі досліджень нами здійснено, на підставі літературних даних, вибір джерела  $\gamma$ -випромінювання ( $^{57}\text{Co}_{27}$  або  $\text{Co}^{60}$ ) та експериментально обґрунтовано оптимальну дозу іонізаційної обробки, яка дорівнює 7 Гр (табл. 3).

Таблиця 3

**Обґрунтування оптимальної дози  $\gamma$ -опромінення стрептоміцину сульфату  
мікробіологічним методом**

Доза $\gamma$ -опромінення, Гр	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл	
	S.aureus	E.coli
Контроль	3,600±0,200	13,800±1,400
1	3,500±0,400	14,200±1,700
2	4,000±0,300	13,600±1,500
3	4,200±0,600	14,400±1,800
4	3,700±0,500	13,500±1,600
5	2,400±0,300	8,300±0,900
6	1,200±0,200	5,600±1,200
7	0,400±0,003	3,400±0,080
8	0,400±0,002	3,400±0,090
9	0,400±0,003	3,400±0,020
10	0,400±0,003	3,400±0,030
14	0,400±0,003	3,400±0,020
20	0,400±0,002	3,400±0,040

Аналіз даних табл. 3 показав, що при опромінюванні дослідних зразків антибіотиків в дозах від 1 до 20 Гр в інтервалі доз 1 – 4 Гр зразки стрептоміцину сульфату не змінювали початкових рівнів активності щодо тест-культур *S.aureus* і *E.coli*, а в дозах 5 – 7 Гр – позитивні відхилення не мали статистично достовірних розбіжностей у виявах бактеріостатичної активності. Подальше підвищення доз опромінювання (8 – 20 Гр) не призвело до суттєвих змін початкових рівнів антимікробної активності. Таким чином, діапазон робочої дози  $\gamma$ -опромінення є 7 – 10 Гр. За оптимальне значення нами прийнята доза в 7 Гр.

Проведені дослідження дозволяють зробити висновок про те, що дозоване опромінювання  $Co^{60}$  потужністю 7 Гр дає позитивний ефект, який полягає у наданні опроміненим зразкам переважних бактерицидних властивостей. Аналізуючи одержані результати, логічно припустити, що дозоване  $\gamma$ -опромінювання може бути використане як фактор, що надає типовому антибіотику властивостей антисептика.

Застосування іонізаційної обробки антибіотика доцільне лише при збереженні до 50% його фармакологічних властивостей, але не допустимо її використання при руйнуванні, яке призводить до хімічних змін структури антибіотика.

Далі нами було вивчено вплив дозованого  $\gamma$ -опромінення на фармако-технологічні, хімічні та фізико-хімічні властивості стрептоміцину сульфату.

Результати оцінки залежності змін технологічних властивостей стрептоміцину сульфату від впливу  $\gamma$ -опромінення свідчать, що для зразків з терміном зберігання, що закінчився, спостерігається незначне зниження значень плинності (на 0,4%, що є статистично недостовірним), кута природного укусу (2,3%) та вологопоглинання порівняно з контрольними зразками. Зменшення кута природного укусу по відношенню до контрольних зразків пов'язане зі зменшенням початкової вологості.  $\gamma$ -опромінення не впливає на розчинність зразків. Дані вологопоглинання зразків стрептоміцину сульфату з терміном зберігання, який закінчився, незначно відрізняються від зразків контрольних та після опромінення. Після впливу  $\gamma$ -опромінення дозою 7 Гр на зразок стрептоміцину сульфату з терміном зберігання, що закінчився, дані зазначених параметрів з контрольним зразком збігаються.

На підставі проведених досліджень технологічних властивостей зразків стрептоміцину сульфату з діючим терміном зберігання та опромінених можна зробити висновок, що радіаційна обробка дозою 7 Гр не викликає реєстрованих змін.

Вплив  $\gamma$ -опромінення на хімічні параметри стрептоміцину сульфату досліджувався шляхом визначення тотожності і рН зразків з дійсними термінами зберігання та опромінених за методиками А, В, наведених в ДФУ, доп.1, с.454. Узагальнені результати наведено в табл. 4.

**Результати дослідження тотожності та рН розчину стрептоміцину сульфату до і після опромінення, n=6**

Зразок	Умови реакції	Параметри, що досліджуються		Відповідність АНД
		Якісна реакція на тотожність	рН розчину	
З діючими термінами зберігання	+NaOH 1М Т, °С	Фіолетове забарвлення	5,0	Відповідає
З термінами зберігання, що закінчились	+NaOH 1М Т, °С	Фіолетове забарвлення	5,4	Відповідає
Після $\gamma$ -опромінення дозою 7 Гр	+NaOH 1М Т, °С	Фіолетове забарвлення	5,5	Відповідає

Отримані результати свідчать, що зразки стрептоміцину сульфату з терміном зберігання, який закінчився, та опромінені дозою 7 Гр, відповідають вимогам АНД.

З метою підтвердження припущення про відсутність деструктивного впливу  $\gamma$ -опромінення дозою 7 Гр на зразки стрептоміцину сульфату було проведено хроматографічне дослідження зразків, опромінених різними дозами у порівнянні з препаратом з діючим терміном зберігання. Система розчинників : ізопропанол – вода – кислота оцтова льодяна (35:10:5). Пластинка містить тонкий шар сілікагелю.

За даними ТШХ розраховано  $R_f$  (табл. 5).

**Значення  $R_f$  досліджуваних зразків стрептоміцину сульфату**

Зразок	а, см	б, см	$R_f$
З діючими термінами зберігання	7,0	15	0,47
Опромінений дозою 5 Гр	6,5	15	0,43
Опромінений дозою 7 Гр	7,0	15	0,47
Опромінений дозою 10 Гр	6,1	15	0,41
Опромінений дозою 20 Гр	6,3	15	0,42
Опромінений дозою 3000 Гр (відтворилось 2 плями)	Пляма 1: 7,6	15	0,51
	Пляма 2: 5,7	15	0,38

Аналіз даних табл. 5 дозволяє зробити висновок, що при  $\gamma$ -опроміненні стрептоміцину сульфату дозами 5 – 20 Гр хімічна структура молекули антибіотика не змінюється та продуктів розпаду не виявлено.

На хроматограмі зразка стрептоміцину сульфату, який опромінено дозою 3000 Гр, спостерігається поява двох плям (для плями №1  $R_f = 0,51$ , для плями №2  $R_f = 0,38$ ), що свідчить про руйнування молекули.

Таким чином, на підставі результатів дослідження стрептоміцину сульфату за технологічними та хімічними параметрами препарат відповідає вимогам ДФУ, доп.1 “Стрептоміцину сульфат”.

Наступним кроком у наших дослідженнях було співставлення фізико-хімічних характеристик зразків стрептоміцину сульфату з діючими термінами зберігання зі зразками, термін зберігання у яких закінчився та зразками, що були  $\gamma$ -опромінені.

Враховуючи, що зміна показників кутів питомого обертання для антибіотиків під час зберігання може залежати від просторового положення молекули, для подальшого дослідження логічним є застосування методу ІЧ – спектроскопії, для чого використовували спектрофотометр SPECORD 75IR (Німеччина). Досліди проводились на базі Інституту хімії при ХНУ ім. Каразіна. Дані досліджень свідчать, що для комерційних зразків стрептоміцину сульфату з діючими та позарегламентними термінами зберігання помітні незначні зміни розмірів дуплета лише в зоні довжини хвилі  $1380 \text{ см}^{-1}$  (рис. 1) Це свідчить про можливі конформаційні зміни молекули.

1

 $\nu = 1380 \text{ см}^{-1}$ 

2

МК=12,5 мкг/мл

Рис. 1. ІЧ – спектрограми стрептоміцину сульфату:

1 – стандартний зразок (регламентні терміни зберігання);

2 – зразок з позарегламентними термінами зберігання (36 місяців)

З метою підтвердження зазначеного припущення було використано метод спектроскопії комбінаційного розсіяння світла (КРС-спектроскопія). Спектри КРС

знімали на приладі "DILOR Omars 8800" (Франція). Досліди проводились на базі Інституту біофізики ім. Усікова. Отримані результати показали, що зміна біологічної активності стрептоміцину сульфату з терміном зберігання, який закінчився, може бути пов'язана з перерозподілом електронної щільності в молекулі. Про це свідчить зменшення частоти для групи (C=N-H) від  $\nu = 1432 \text{ см}^{-1}$  до  $\nu = 1421 \text{ см}^{-1}$ , що може бути викликано появою слабкого водневого зв'язку між гуанідиновими залишками (рис. 2).

1

2

Рис. 2. КРС – спектрограми стрептоміцину сульфату:

1 – стандартний зразок (регламентні терміни зберігання);

2 – зразок з позарегламентними термінами зберігання (36 місяців).

↓ ↓

Проведене дослідження показало відновлюючий вплив  $\gamma$  – опромінення дозою 7 Гр на структуру антибіотика. Про це свідчить повна ідентичність результатів ІЧ-спектроскопії для зразків стрептоміцину сульфату з позарегламентними, обробленими  $\gamma$ -опромінюванням, та з регламентними термінами зберігання, що може пояснюватись поверненням просторового положення молекули антибіотика з перевищеними термінами зберігання до стану молекули придатного антибіотика з регламентними термінами зберігання.

Зазначене припущення підтверджено результатами КРС – спектроскопії.

Досліджено іонізаційнозалежну ефективність спрямованої конформаційної модифікації хімічної структури антибіотиків як способу, що забезпечує підвищення лімітних рівнів їх бактерицидної активності та пов'язане з цим зниження селективних властивостей. З цією метою проведено серію мікробіологічних досліджень, у яких порівняно рівні бактерицидної і бактериостатичної активності стрептоміцину сульфату (табл. 6).

Проте дозоване  $\gamma$ -опромінення придатних до застосування зразків стрептоміцину сульфату викликає суттєве підвищення початкових рівнів бактерицидної активності. Це надає антибіотикам властивостей антисептиків та підвищує стабільність препаратів під час зберігання, що відповідно збільшує терміни зберігання до чотирьох років.

Таблиця 6

**Порівняльна оцінка антибактеріальної активності і селективного потенціалу зразків стрептоміцину сульфату з відповідними і перевищеними термінами придатності, n=6**

Показник	Тест-мікроб	МІК, мкг/мл
----------	-------------	-------------

		Регламентний зразок	Прострочений зразок	Кратність
Бактері-остатична активність	<i>S. aureus</i>	7,5±1,6	24,2±2,8	3,2
	<i>E. coli</i>	14,2±1,3	53,9±5,2	3,8
Бактерицидна активність	<i>S. aureus</i>	13,6±2,5	37,2±3,5	2,7
	<i>E. coli</i>	24,3±3,3	78,5±8,7	3,5
Селективний ефект	<i>S. aureus</i>	21,0±2,8	150,8±4,3	2,8/6,3*
	<i>E. coli</i>	51,2±6,7	294,7±16,6	3,6/5,6*

\* у чисельнику позначено кратність зниження чутливості при пасуванні тест-штамів у присутності субактивних концентрацій антибіотиків з діючими термінами, а в знаменнику – із простроченою придатністю.

При дозованому опроміненні комерційних зразків антибіотиків  $\gamma$ -опромінення закономірно приводить до підвищення рівнів бактерицидної активності препаратів та надання їм властивостей антисептиків (табл. 7).

Таблиця 7

**Порівняльна оцінка селективної здатності комерційних та опромінених зразків стрептоміцину сульфату**

Кратність пасажів	Антибіотик	Антибактеріальна активність, мкг/мл, щодо			
		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		комерційного зразка	опроміненого зразка	комерційного зразка	опроміненого зразка
1	2	3	4	5	6
Контр.	Стрептоміцину сульфат	5,9±1,4	7,2±1,1	18,4±2,2	19,9±1,8
5	Стрептоміцину сульфат	8,2±1,9	7,6±0,9	20,5±1,9	21,0±1,4

Продовження таблиці 7

1	2	3	4	5	6
10	Стрептоміцину сульфат	18,1±2,2	8,2±1,2	45,1±3,6	23,7±2,6
15	Стрептоміцину сульфат	25,3±1,6	10,5±1,5	58,5±4,6	27,8±1,9
20	Стрептоміцину сульфат	35,4±4,2	13,6±1,6	70,2±8,4	34,2±2,8
25	Стрептоміцину сульфат	49,5±7,7	16,6±1,9	91,2±10,2	42,4±4,1
Кратн.	Стрептоміцину сульфат	8,4	2,3	4,9	2,1

Особливістю сучасної антибіотикотерапії є необхідність комплексного лікування, що вимагає паралельного введення хворому кількох препаратів. Враховуючи підвищену сенсibiliзацію сучасного населення, є доцільним скорочувати кількість препаратів, які вживаються. Таким чином, набуття антибіотиками властивостей антисептиків дає можливість скоротити кількість призначуваних препаратів та частоту їх прийому, що може зробити більш доступною та ефективною антибіотикотерапію.

З метою реалізації проведених досліджень на практиці розроблено принципову схему комплексу із застосуванням мальтійського механізму для радіаційної дозованої обробки стрептоміцину сульфату під час його промислового виготовлення (рис. 3).

Рис. 3. Принципова схема комплексу для іонізаційної обробки антибіотиків:

1 – двигун; 2 – муфти; 3 – двоступінчаста зубчаста передача (закрита); 4 – плоскопасова передача; 5 – мальтійський механізм; 6 – накопичувальний стіл; 7 – стрічка конвеєра; 8 – джерело  $\gamma$ -випромінювання; 9 – флакон з антибіотиком; 10 – роликівий конвеєр; 11 – стіл для відгрузки.

Комплекс працює таким чином: флакон з антибіотиком (9) з накопичувального стола (6) встановлюється на транспортерну стрічку конвеєра (7), яка пересувається з керованою швидкістю до джерела  $\gamma$ -випромінювання (8).

До приводу конвеєра входить двигун (1), двоступінчаста закрита зубчаста передача (3) та плоскопасова передача (4). Перетворення рівномірного обертального руху вала на виході з плоскопасової передачі (4) на періодичний із заданим часом зупинки здійснюється мальтійським механізмом (5).

Обробка  $\gamma$ -опромінюванням флакона з антибіотиком здійснюється у свинцевому контейнері (8).

Використовуючи  $\text{Co}^{60}$  як  $\gamma$ -випромінювач, для досягнення потужності випромінювача 200 Р/с можна застосувати 11 джерел потужністю 300 Р/хвил, що розташовані по кільцю. Тоді для досягнення дози в 7 Грей термін обробки зразка складає 5 с. Товщина захисної свинцевої оболонки для цих умов складає близько 20 см.

Флакон з готовою продукцією через роликівий конвеєр (10) надходить до столу для відгрузки (11) з наступним пакуванням флаконів до стандартної коробки.

У **п'ятому розділі** “Біофармацевтична сумісність і антиінфекційна спроможність опромінених зразків стрептоміцину сульфату” досліджено фармако – терапевтичну активність комерційного та опроміненого зразків стрептоміцину сульфату. Результати проведених досліджень гострої та хронічної токсичності опромінених зразків стрептоміцину сульфату свідчать, що дозована дія  $\gamma$ -опромінювання не змінює фармакологічних та токсикологічних характеристик

стрептоміцину сульфату і тому може використовуватись для підвищення антибактеріальних властивостей антибіотика. Хіміотерапевтичну активність порівнюваних зразків стрептоміцину сульфату випробувано на різних стадіях формування генералізованої інфекції шляхом одноразового внутрішньосудинного введення препаратів одночасно з зараженням та одноразового внутрішньосудинного введення через 6 годин після зараження. Препарати застосовано в дозі 140 ОД/миша. Проведеними дослідженнями встановлено, що комерційний та опромінений зразки стрептоміцину сульфату характеризуються достатньою лікувально-профілактичною здатністю. В результаті експерименту доведено, що дозоване опроміювання зразків стрептоміцину сульфату не змінює показників токсичності комерційних зразків, а при локальній гнійно-запальній інфекції сприяє суттєвому підвищенню їх хіміотерапевтичного ефекту. Досліди проведено на базі НфаУ під керівництвом проф. І. Л. Дикого.

### ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. З використанням системного підходу на основі проведених технологічних, фізико-хімічних та мікробіологічних досліджень вперше запропоновано і розроблено технологію дозованого  $\gamma$ -опромінення стрептоміцину сульфату з метою його стабілізації під час зберігання та відновлення початкових рівнів антимікробної активності.

2. При порівняльному фізико-хімічному та мікробіологічному дослідженні комерційних зразків стрептоміцину сульфату показано, що первинні зміни антимікробної активності зразків антибіотиків в процесі зберігання не пов'язані з деструктивними змінами притаманної хімічної структури.

3. За даними поляризаційних методів, ІЧ- та КРС - спектроскопії встановлено, що зниження антимікробних властивостей стрептоміцину сульфату супроводжується конформаційними модифікаціями, які характеризуються зміною кутів питомого обертання, збільшенням плеча дуплету в зоні частоти  $1380\text{ см}^{-1}$  та зсувом частот від  $1432 - 1421\text{ см}^{-1}$ , що характерно для  $\text{C}=\text{N}-\text{H}$  групи.

4. На теоретичному і експериментальному рівні доведено, що дозообумовлений вплив  $\gamma$ -опромінювання сприяє поліпшенню вихідних антимікробних та фармакологічних властивостей антибіотиків. В якості джерела  $\gamma$ -випромінювання обгрунтовано вибір  $^{57}\text{Co}_{27}$  або  $\text{Co}^{60}$ . Доведено, що оптимальна доза  $\gamma$ -опромінювання становить 7 Гр. Запропонований режим  $\gamma$ -обробки підвищує бактерицидну активність стрептоміцину сульфату, надаючи йому властивостей антисептиків.

5. У результаті дозованого  $\gamma$ -опромінення підвищується стабільність комерційного стрептоміцину сульфату під час зберігання, що відповідно збільшує терміни зберігання з двох до чотирьох років.



6. Дозоване  $\gamma$ -опромінення зразків стрептоміцину сульфату з позарегламентним терміном зберігання закономірно супроводжується відновленням вихідних рівнів антимікробної активності. Потенціувальний вплив  $\gamma$ -опромінювання на зразки стрептоміцину сульфату, термін зберігання якого закінчився, пов'язаний з відновленням конформаційної характеристики молекули антибіотика.

7. Розроблено технологічну схему виробництва та принципову напівавтоматичного комплексу для радіаційної дозованої обробки стрептоміцину сульфату.

8. Встановлено, що дозоване  $\gamma$ -опромінювання (7 Гр) стрептоміцину сульфату не змінює початкової гострої токсичності, фармакологічних та токсикологічних характеристик стрептоміцину сульфату. Опромінені зразки стрептоміцину сульфату відрізняються суттєво підвищеною хіміотерапевтичною активністю при експериментальній гнійно-запальній інфекції.

9. Фрагменти роботи впроваджено у навчальний процес ряду медичних та фармацевтичних вузів України.

### **Список опублікованих праць за темою дисертації**

1. Потенціюючий вплив радіаційного опромінювання на бактерицидну активність антибіотиків / І. Л. Дикий, О. А. Манський, Н. І. Філімонова, А. П. Домарьов // Фармаком. – 2004. – №4. – С. 74-77. *(особистий внесок - участь у проведенні експерименту, статистична обробка результатів, оформлення статті).*
2. Дикий І. Л., Філімонова Н. І., Манський О. А. Фізико-хімічні та біологічні аспекти потенціюючого впливу радіації на специфічну активність антибіотиків // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: збірник наукових статей. – 2006. – Вип. XV, т. 3. – С. 551-556. *(особистий внесок - аналіз результатів, статистична обробка експериментальних даних, оформлення статті).*
3. Напівавтоматичний комплекс опромінювальної дії для підвищення специфічної активності антибіотиків / О. В. Шаповалов, В. І. Чуєшов, І. Л. Дикий, О. А. Манський // Фармацевтичний журнал. – 2006. – №2. – С. 29-33. *(особистий внесок - участь у виконанні експерименту та аналізі результатів, оформлення статті).*
4. Дикий І. Л., Манський О. А., Дика О. М. Порівняльна оцінка селективного потенціалу комерційного та опромінюваного зразків антибіотиків щодо здатності формування антибіотикорезистентності // Буковинський медичний вісник. – 2003. – Т. 7, №4. – С. 152-154. *(особистий внесок - участь у виконанні експерименту, статистична обробка результатів, оформлення статті).*
5. Принципи іонізаційного потенціювання специфічної активності антимікробних препаратів / О. А. Манський, І. Л. Дикий, В. І. Чуєшов, Н. І.

- Філімонова, О. В. Шаповалов, А. П. Домарьов: метод. рек. – Х.: Вид-во ХНАДУ, 2007. – 40 с. (*особистий внесок – узагальнення результатів експерименту, статистична обробка результатів, оформлення методичних вказівок*).
6. Влияние ионизирующего излучения на специфическую активность антибиотиков / И. Л. Дикий, А. А. Манский, Н. Ф. Клещев, Н. И. Филимонова // *Аннали Мечніковського інституту*. – 2003. – №4-5. – С. 110. (*особистий внесок – аналіз результатів дослідження та підготовка тез*).
  7. Оценка биологической активности антибиотиков по результатам спектров комбинационного рассеивания / И. Л. Дикий, Н. Ф. Клещев, Т. В. Больбух, А. А. Манский // *Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы II-го Московского международного конгр. Ч. 1. Москва, 10-14 нояб. 2003 г.* – С. 89. (*особистий внесок – обробка матеріалу та оформлення тез*).
  8. Манський О. А., Домарьов А. П., Блізнюк Н. Ю. Вплив фізико-хімічних чинників на відновлення специфічної біологічної активності антибіотиків // *Біотехнологія. Освіта. Наука: зб. тез I-ї Всеукр. наук.-практ. конф. студ., асп. та молодих вчен., Київ, 10-11 лютого 2003 р.* – К.: Політехніка, 2003. – С. 87-88. (*особистий внесок - аналіз результатів експерименту та оформлення тез*).
  9. Манский А. А., Шаповалов А. В. Обеспечение прерывисто-вращательного движения в полуавтоматическом комплексе для ионизационной обработки антибиотиков // *Актуальні проблеми сучасних наук: теорія та практика '2006: матеріали III Міжнар. наук.-практ. конф., Дніпропетровськ, 16-30 черв. 2006р.* – Дніпропетровськ, 2006. – С. 69-71. (*особистий внесок – аналіз результатів та оформлення тез*).
  10. Потенційний вплив іонізаційного опромінювання на специфічну активність антибіотиків / І. Л. Дикий, Н. І. Філімонова, О. А. Манський, О. Г. Гейдеріх // *Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: матеріали VI Нац. з'їзду фармацевтів України, Харків, 28-30 вересня 2005 р.* – Х.: Вид-во НФаУ, 2005. – С. 511-512. (*особистий внесок – обробка матеріалу та оформлення тез*).

#### АНОТАЦІЯ

**Манський О. А. Технологічні аспекти стабілізуючого впливу  $\gamma$ -опромінювання на похідні аміноглікозидів.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – технологія ліків та організація фармацевтичної справи. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2008 р.

Роботу присвячено розробці технології  $\gamma$ -опромінювання антимікробних препаратів з метою підвищення стабільності під час зберігання.

Здійснено вибір  $\gamma$ -випромінювача, проведено дослідження технологічних, фізико-хімічних, мікробіологічних і фармакологічних властивостей стрептоміцину сульфату, обробленого  $\gamma$ -опромінюванням в дозі 7 Гр.

Вперше на теоретичному та експериментальному рівні обґрунтовано потенціювальну здатність  $\gamma$ -опромінювання підвищувати бактерицидні властивості стрептоміцину сульфату, подовжувати регламентні терміни його зберігання. На моделі стрептоміцину сульфату досліджено механізм зниження антибактеріальної активності на початкових етапах „старіння”. Встановлено дозу  $\gamma$ -опромінювання в 7 Гр, що забезпечує відповідні відновлювальні фізико-хімічні та біологічні ефекти у вираженості специфічної активності антибіотика. Розроблено принципову схему технічного комплексу для дозованого  $\gamma$ -опромінювання зразків антибіотиків.

*Ключові слова:* радіаційне опромінювання,  $\gamma$ -випромінювання, технологія, антимікробна активність, стабільність, стрептоміцину сульфат.

## АННОТАЦІЯ

**Манский А. А. Технологические аспекты стабилизирующего воздействия  $\gamma$ -облучения на производные аминогликозидов.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2008 г.

Работа посвящена разработке технологии  $\gamma$ -облучения лиофилизированных антимикробных препаратов с целью повышения их стабильности в результате хранения. Данная технология позволяет получить препарат с более высоким уровнем бактерицидной активности, в результате чего антибиотик приобретает свойства антисептиков, стабилизировать конформационные характеристики молекулы по сравнению с необлученным образцом.

Осуществлен выбор источника  $\gamma$ -излучения, исследовано влияние радиационной обработки на технологические, физико-химические, микробиологические и фармакологические свойства стрептомицина сульфата. Установлено, что стрептомицина сульфат после обработки  $\gamma$ -облучением дозой 7 Гр соответствует требованиям ГФУ.

Впервые на теоретическом и экспериментальном уровне обоснована потенцирующая способность  $\gamma$ -облучения повышать бактерицидные свойства стрептомицина сульфата, увеличивать регламентные сроки его хранения, что приводит к снижению потенциала в формировании антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

На модели стрептомицина сульфата исследован механизм снижения антибактериальной активности на начальных этапах «старения». Теоретически и практически определена возможная связь молекулярной структуры стрептомицина сульфата с выраженностью его антимикробного действия. Установлено, что уровень

антимикробной активности корреляционно зависит от конформационных характеристик молекулы препарата.

Разработана принципиальная схема технического комплекса для дозированной  $\gamma$ -обработки антибиотиков. Проведен расчет всех основных элементов аппарата.

На основании технологических, физико-химических и фармакологических исследований разработана технология радиационной обработки препарата стрептомицина сульфата, согласно которой  $\gamma$ -облучение следует проводить дозой 7 Гр, обеспечивающей соответствующие физико-химические и биологические эффекты в выраженности специфической активности препарата.

Фармакологические исследования стрептомицина сульфата показали, что обработка его  $\gamma$ -облучением дозой 7 Гр не изменяет показателей токсичности, а при локализованной гнойно-воспалительной инфекции способствует существенному повышению их химиотерапевтического эффекта.

Единоразовое  $\gamma$ -облучение дозой 7 Гр обеспечивает стабильность при хранении стрептомицина сульфата в течение 4 лет, что в существенно превышает срок хранения необлученного препарата.

Изучена радиологическая безвредность облученного стрептомицина сульфата. Установлено, что радиационный фон препарата после  $\gamma$ -облучения совпадает с уровнем для контрольных (необлученных) образцов, и составляет 11 мкР/ч, что совпадает с допустимыми границами для Харькова и Харьковской области – до 30 мкР/ч.

*Ключевые слова:* радиационное облучение,  $\gamma$ -излучение, технология, антимикробная активность, стабильность, стрептомицина сульфат.

## SUMMARY

**Manscy O. A. Technological aspects of the stabilizing influencing  $\gamma$ -irradiation on derivative aminoglycosides.** – The manuscript.

The thesis is submitted for the Candidate Degree in Pharmacy on speciality 15.00.01 – Drug technology and Pharmacy organization – The National Pharmaceutical university, Kharkov, 2008.

Work is devoted to development of technology of  $\gamma$ -irradiation antimicrobial preparations with the purpose of increase of stability during saving..

Research of properties of streptomycin sulfate technological, physical and chemical, microbiological and pharmacological is conducted, treated  $\gamma$ -irradiation in a dose 7 Grey.

First on theoretical and experimental levels potent ability is grounded  $\gamma$ -irradiation to promote bactericidal properties of streptomycin sulfate, to prolong the regulation terms of his saving. On the model of streptomycin sulfate the mechanism of decline of antibacterial activity is explored on initial stages „senescence”. A dose is set  $\gamma$ -irradiation in 7 Grey, that the gives proper effects at specific activity physical and chemical and biological to the

antibiotic. The chart of technical complex for dosed of principle is developed  $\gamma$ -irradiation standards of antibiotics.

*Key words:* ionizing irradiation,  $\gamma$ - irradiation, technology, antimicrobial activity, stability, streptomycin sulfate.