

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-129-137>
УДК 577.182.26



Оригинальная статья / Research article

Исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С

А. А. Дранников^{1,2*}, И. С. Ватлин^{1,2}, М. Е. Трусова¹, А. Ди Мартино¹, С. В. Кривошеков³,
А. М. Гурьев³, М. В. Белоусов^{1,3}

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ), 634034, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

² АО «Производственная фармацевтическая компания Обновление», 630096, Россия, г. Новосибирск, ул. Станционная, д. 80

³ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, Россия, Томская обл., г. Томск, Московский тракт, д. 2

*Контактное лицо: Дранников Александр Алексеевич. E-mail: alexdr2037@gmail.com

ORCID: А. А. Дранников – <https://orcid.org/0000-0002-4839-1667>; И. С. Ватлин – <https://orcid.org/0000-0002-7663-7863>; М. Е. Трусова – <https://orcid.org/0000-0002-1761-264X>;
А. Ди Мартино – <https://orcid.org/0000-0002-2664-4483>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; А. М. Гурьев – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 07.10.2021

Статья принята в печать: 19.11.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Грамицидин С традиционно выпускается в виде таблеток буккальных. В последнее время активно ведутся разработки лекарственной формы грамицидина С в виде спрея. Разработанные составы содержат вспомогательные вещества, которые способствуют солюбилизации малорастворимого антибиотика, однако истинная структура жидких лекарственных форм грамицидина С остается неопределенной.

Цель. Определить коллоидную структуру и биофармацевтические свойства новой антибактериальной композиции грамицидина С.

Материалы и методы. Образец композиции получали в результате самоорганизации с использованием субстанции грамицидина С дигидрохлорида и вспомогательных веществ: пропиленгликоль, полисорбат-80, этиловый спирт, вода очищенная. Для определения качественного состава фаз использовалась рамановская спектроскопия. Параметры частиц в композиции устанавливали с использованием метода динамического рассеяния света. Для сравнительной оценки параметров высвобождения использовали диализ, детектируя концентрацию грамицидина С методом ВЭЖХ. Исследование антимикробного действия проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

Результаты и обсуждение. Проведены структурные исследования композиции грамицидина С: определены размер (5–50 нм), ζ-потенциал частиц (–1,1; +7,9 мВ). Проведена классификация композиции на основании данных о параметрах и особенностях формирования системы, что позволило отнести ее к классу коллоидных растворов. Показано, что исследуемая композиция обладает кинетической устойчивостью. Продемонстрирован характер высвобождения действующего вещества в сравнении с исходной субстанцией и повышенная растворимость антибиотика в воде. Подтверждено усиление антимикробных свойств пептида в составе коллоидного раствора, что связано с синергетическим действием поверхностно-активных веществ и грамицидина С.

Заключение. Установлена коллоидная структура композиции грамицидина С с содержанием 8 мг/мл. Установлено, что включение грамицидина С в состав коллоидного раствора приводит к значительному повышению эффективности антибиотика, что открывает перспективы к уменьшению дозировки действующего вещества и снижению уровня побочных эффектов при разработке лекарственного препарата.

Ключевые слова: грамицидин С, антибиотик, коллоидный раствор, мицеллы

Конфликт интересов. А. А. Дранников является автором патентов RU2659418 и EA036926 на состав исследуемой композиции. И. С. Ватлин, А. А. Дранников заявляют о трудоустройстве в АО «ПФК Обновление». Все остальные авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов.

Вклад авторов. А. А. Дранников, И. С. Ватлин разработали дизайн исследования, провели исследование. А. А. Дранников, С. В. Кривошеков, А. М. Гурьев провели анализ полученных данных. М. В. Белоусов, М. Е. Трусова осуществляли научное руководство исследованием. А. А. Дранников, И. С. Ватлин, С. В. Кривошеков, А. Ди Мартино подготовили текст статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Дранников А. А., Ватлин И. С., Трусова М. Е., Ди Мартино А., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):129–137. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-129-137>

Investigation of Colloidal Structure and Biopharmaceutical Properties of New Antibacterial Composition of Gramicidin S

Aleksandr A. Drannikov^{1,2*}, Ivan S. Vatlin^{1,2}, Marina E. Trusova¹, Antonio Di Martino¹,
Sergei V. Krivoshechekov³, Artem M. Guriev³, Mikhail V. Belousov^{1,3}

¹ The National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenina ave., Tomsk, 634034, Russia

² JSC "Industrial pharmaceutical company Obnovlenie", 80, Stantsionnaya str., Novosibirsk, 630096, Russia

³ Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moskovsky tract, Tomsk, Tomsk region, 634050, Russia

*Corresponding author: Aleksandr A. Drannikov. E-mail: alexdr2037@gmail.com

ORCID: Aleksandr A. Drannikov – <https://orcid.org/0000-0002-4839-1667>; Ivan S. Vatlin – <https://orcid.org/0000-0002-7663-7863>; Marina E. Trusova – <https://orcid.org/0000-0002-1761-264X>;
Antonio Di Martino – <https://orcid.org/0000-0002-2664-4483>; Sergei V. Krivoshechekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;
Artem M. Guriev – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 07.10.2021

Revised: 19.11.2021

Published: 25.11.2021

© Дранников А. А., Ватлин И. С., Трусова М. Е., Ди Мартино А., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В., 2021

© Drannikov A. A., Vatlin I. S., Trusova M. E., Di Martino A., Krivoshechekov S. V., Guriev A. M., Belousov M. V., 2021

Abstract

Introduction. Gramicidin S has been conventionally manufactured as buccal tablets. However, in the past decade, the interest in the development of spray formulations has been growing. Those formulations contain excipients that enhance the solubility of the antibiotic in water solutions. However, the real structure of gramicidin S containing sprays remains unrevealed.

Aim. Investigation of colloidal structure and biopharmaceutical properties of new gramicidin S antibacterial composition.

Materials and methods. The composition sample was obtained using gramicidin S dihydrochloride, propylene glycol, polysorbate-80, ethanol and purified water. Raman spectroscopy has been performed to determine the composition of the phases. Dynamic light scattering analysis was performed to characterize the composition particles. Release of gramicidin S was performed by dialysis method and the concentration was determined by HPLC. The antimicrobial properties were investigated in accordance with the requirements of the XIV edition of the Russian pharmacopoeia.

Results and discussion. Dynamic light scattering analysis results show gramicidin S formulation particles having an average size in solution 5–50 nm and ζ -potential (–1.1: +7.9 mV). Based on the obtained data on the composition properties and formulation parameters it was classified as colloidal solution. The kinetic stability evaluation was performed. We compared the solubility in water and release parameters of the active pharmaceutical ingredient in the native state and in the micelles. The enhancement of the antimicrobial activity of the peptide in the colloidal solution was confirmed and ascribed to the synergic effect gramicidin S – surfactant.

Conclusion. We reported the colloidal type of the composition, that aggregate gramicidin S at a concentration of 8 mg/mL. We found that gramicidin S inclusion into the colloidal solution led to significant efficiency increase, which reveals the potential to reduce the drug dose and side effects level.

Keywords: gramicidin S, antibiotic, colloidal solution, micelles

Conflict of interest. Aleksandr A. Drannikov is an author of patents RU2659418 and EA036926 which reveal the content of the composition. Ivan S. Vatlin, Aleksandr A. Drannikov claim the employment at JSC "PFK Obnovlenie". The rest of the authors claim the absence of obvious and potential conflicts of interest.

Contribution of the authors. Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin developed the experimental design, held the experiment. Aleksandr A. Drannikov, Sergei V. Krivoshchekov, Artem M. Guriev, analyzed the obtained results. Mikhail V. Belousov, Marina E. Trusova were supervisors of this work. Aleksandr A. Drannikov, Ivan S. Vatlin, Sergei V. Krivoshchekov, Antonio Di Martino prepared the manuscript. All authors took part in the discussion.

For citation: Drannikov A. A., Vatlin I. S., Trusova M. E., Di Martino A., Krivoshchekov S. V., Guriev A. M., Belousov M. V. Investigation of colloidal structure and biopharmaceutical properties of new antibacterial composition of gramicidin S. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):129–137. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-129-137>

ВВЕДЕНИЕ

Грамицидин С активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также некоторых грибов [1], благодаря чему находит применение в терапии заболеваний, вызванных данными микроорганизмами, уже более 70 лет [2].

Однако ввиду отсутствия системной абсорбции пептида по причине его низкой растворимости в воде грамицидин С находит исключительно местное или наружное применение в виде буккальных таблеток или растворов для местного применения [3].

В последнее время активно ведутся разработки лекарственной формы грамицидина С в виде спрея, представляющего собой комбинированный препарат с цетилпиридиния хлоридом и оксibuпрокаином, для лечения заболеваний горла и полости рта [4–7]. Также разработан новый состав антибактериальной композиции грамицидина С на основе системы со-растворителей и поверхностно-активных веществ (ПАВ) с содержанием от 3,2 до 8,0 мг/мл, отличающейся улучшенным профилем безопасности по сравнению с прототипом [8, 9]. Общим свойством разработанных составов является использование ПАВ для повышения растворимости грамицидина С (таблица 1):

Использование ПАВ является одним из наиболее перспективных способов повышения растворимости субстанций в воде по причине возможности образования самоорганизующихся систем [10]. Дополнительная стабильность данных систем обеспечивается путем введения со-растворителей (спирт этиловый, пропиленгликоль или глицерин), обладающих более низким значением гидрофильно-липофильного баланса, за счет образования пленкоподобного комплекса на границе раздела фаз с получением частиц (рисунок 1) [11]:

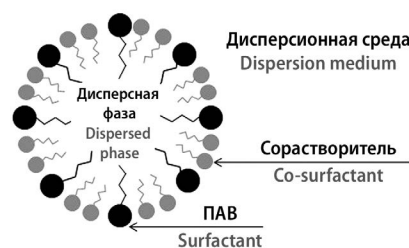


Рисунок 1. Взаимодействие ПАВ и со-растворителей в составе мицелл

Figure 1. Interaction between surfactants and co-solvents in micelles

Таблица 1. Сравнительная таблица составов композиций грамицидина С, содержащих ПАВ

Table 1. Comparative table of gramicidin S compositions containing surfactants

Номер документа Document №	Патент RU 2627423 Patent RU 2627423	Патент RU 2604575 Patent RU 2604575	Патент RU 2604576 Patent RU 2604576	Патент RU 2749902 Patent RU 2749902	Патент RU 2659418 Patent RU 2659418
Состав в масс. % Content in wt. %					
Грамицидин С Gramicidin S	0,027–0,2	0,027–0,033	0,027–0,033	0,002–0,1	0,32–0,80
Оксибупрокаина гидрохлорид Oxybuprocaine hydrochloride	0,067–0,2		0,067–0,083		
Цетилпиридиния хлорид Cetylpyridinium chloride	0,045–0,2	0,045–0,055	0,045–0,055	0,05	
Метилпарабен Methylparaben	0,0736–0,1104	0,0736–0,1104	0,0736–0,1104	0,092	
Пропилпарабен Propylparaben	0,0080–0,0120	0,0080–0,0120	0,0080–0,0120	0,01	
Этанол Ethanol	7,3–10,9	7,3–10,9	7,3–10,9	9,1–9,5	16,00–40,00
Сукралоза Sucralose	0,09–0,11	0,09–0,11	0,09–0,11	0,1	
Глицерол Glycerol	14,9–18,2	14,9–18,2	14,9–18,2	14,3–16,95	
Пропиленгликоль Propylene glycol					10,00–12,00
Ароматизатор мятный Mint aromatizer	0,37–0,44	0,37–0,44	0,37–0,44	0,41	
Лимонной кислоты моногидрат Citric acid monohydrate	0,026–0,032	0,026–0,032	0,026–0,032	0,029	
Натрия цитрат Sodium citrate	0,0099–0,012	0,0099–0,012	0,0099–0,012	0,011	
Полисорбат-80 Polysorbate-80	0,18–0,22	0,18–0,22	0,18–0,22	0,2	0,90–1,10
Вода очищенная Purified water	остальное rest	остальное rest	остальное rest	остальное rest	остальное rest

Таким образом, есть основания полагать, что представленные в литературе композиции являются коллоидными растворами [12].

В настоящей работе приведено исследование коллоидной структуры и биофармацевтических свойств новой антибактериальной композиции грамицидина С, представленной в патенте RU 2659418 [8], в составе которой содержатся грамицидин С в качестве действующего вещества, ПАВ и система сорастворителей субстанции, что исключает влияние других вспомогательных веществ на результаты измерения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали грамицидин С дигидрохлорид (ТУ 9348-023-47509455-2012, АО «ПФК Обновление», Россия), вспомогательные вещества – пропиленгликоль, EP/USP (Ineos Group Ltd, Великобритания), полисорбат-80, EP/NF (Croda International plc, Великобритания), этиловый спирт 95 % (ГФ РФ XIV, ФС.2.1.0036.15) и вода очищенная (ГФ РФ XIV, ФС.2.2.0020.18). Реактивы – хлорная

кислота, ч.д.а. (ООО «Камхимком», Россия), ацетонитрил для хроматографии, ос.ч. (АО «ЛенРеактив», Россия).

Приготовление композиции осуществляли по технологии, описанной в [8, 9]. В 75,0 г воды очищенной при перемешивании последовательно загружали 16,0 г этилового спирта, 10,0 г пропиленгликоля и полисорбат-80 в количестве 1,0 г, перемешивали в течение 10 минут, после чего вносили в полученный раствор грамицидина С дигидрохлорида в количестве 0,8 г. Перемешивали смесь до получения однородного раствора, который затем фильтровали через шприцевой фильтр рейтингом 0,45 мкм (ООО «Глювекс», Россия).

Формирование мицелл подтверждали с использованием метода рамановской спектроскопии на портативном спектрофотометре комбинационного рассеяния Bruker BRAVO Raman spectrometer (Bruker Corporation, Германия) в спектральном диапазоне 3200–400 см⁻¹ с разрешением 10 см⁻¹. Регистрацию спектров для каждого объекта проводили

трижды в целях обеспечения воспроизводимости результата и отсутствия изменения положений полос и интенсивностей.

Определение размера и величины поверхностного заряда частиц коллоидного раствора проводили с использованием метода динамического рассеяния света. Для работы использовали прибор Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания). Образцы анализировали непосредственно после приготовления.

Кинетическую стабильность коллоидного раствора определяли с использованием центрифуги Frontier 5000 FC5706 (Ohaus Corporation, Германия). Образцы подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 15 минут и проверяли на предмет разделения фаз.

Антимикробное действие композиции грамицидина С определяли в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18 ГФ РФ XIV. Определение pH проводили с использованием pH-метра MettlerToledo™ FiveEasyPlus™ FEP20 (Thermo Fisher Scientific Inc, США).

Высвобождение грамицидина С из композиции проводили с использованием следующей последовательности: образец коллоидного раствора в количестве 18,75 мл помещали в полупроницаемую мембрану Spectra/Por® 7 (Thermo Fisher Scientific Inc, США) с размером пор 3,5 кДа, исключая протекание, которую затем помещали в колбу, содержащую 100 мл фосфатного забуференного физиологического раствора с pH=7,4 (ГФ РФ XIV, ОФС.1.3.0003.15). В качестве образца сравнения использовали грамицидина С дигидрохлорид в количестве 150 мг. Образцы перемешивали с использованием орбитального шейкера (ООО «Био-Рус», Россия), периодически отбирая пробы и добавляя в колбу буферный раствор для поддержания объема.

Количественное определение грамицидина С проводили методом ВЭЖХ, в качестве подвижной фазы использовали следующие растворы:

- *Подвижная фаза А.* В 1000 мл воды помещали 6,0 мл хлорной кислоты 70 % и 10,0 мл фосфорной кислоты раствора 25 %, перемешивали, доводили pH полученного раствора до $2,50 \pm 0,05$ с помощью раствора натрия гидроксида 50 %.
- *Подвижная фаза В.* Ацетонитрил для хроматографии.

В качестве испытуемого раствора использовали коллоидный раствор грамицидина С, профильтрованный через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтра. Объем пробы 20 мкл.

В качестве стандартного использовали раствор, который готовили путем растворения навески 25 мг СОП грамицидина С дигидрохлорида (грамицидина С дигидрохлорид, субстанция-порошок, содержание грамицидина С дигидрохлорида 99,9 %, АО «Производственная фармацевтическая компания Обновление», Россия, серия 10719, годен до 31.07.2024) в 25 мл спирта этилового 95 %.

Хроматографические условия: колонка Luna C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, Phenomenex, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 25 °С, детектор УФ, 210 нм. Программа градиента представлена в таблице 2.

Таблица 2. Программа градиента

Table 2. Gradient program

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза В, % Mobile phase B, %
0–7	85	15
7–8	85–50	15–50
8–25	50	50
25–26	50–40	50–60
26–35	40	60
35–65	40–20	60–80
65–70	20	80
70–71	20–85	80–15
71–80	85	15

Содержание грамицидина С дигидрохлорида $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10} \cdot 2HCl$ в одном миллилитре коллоидного раствора в миллиграммах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot 25 \cdot 100}, \quad (1)$$

где S – площадь пика грамицидина С дигидрохлорида на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика грамицидина С дигидрохлорида на хроматограмме раствора стандартного образца; a_0 – навеска стандартного образца грамицидина С дигидрохлорида, в миллиграммах; P – содержание основного вещества в стандартном образце грамицидина С дигидрохлорида, в процентах.

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения структуры композиции грамицидина С дигидрохлорида, ПАВ и соразтворителей приготовлен образец следующего состава (таблица 3):

Таблица 3. Состав коллоидного раствора, содержащего грамицидина С дигидрохлорид, ПАВ и соразтворители

Table 3. Composition of colloidal solution containing gramicidin S hydrochloride, surfactant and co-solubilizers

Наименование компонента Component name	Содержание, г Content, g
Грамицидина С дигидрохлорид Gramicidin S dihydrochloride	0,8
Спирт этиловый, 95 % Ethanol, 95 %	16,0
Пропиленгликоль Propylene glycol	10,0
Полисорбат-80 Polysorbate-80	1,0
Вода очищенная Purified water	до 100 up to 100

Результаты анализа полученной композиции методом рамановской спектроскопии представлены на рисунке 2:

Результаты анализа методом рамановской спектроскопии (рисунок 2, б) демонстрируют наличие характеристических полос спирта этилового и пропиленгликоля в области $1500\text{--}500\text{ см}^{-1}$ [14], что подтверждает присутствие данных веществ в составе дисперсионной среды. В то же время характеристические полосы Амид I грамицидина С, находящиеся в области $1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ [15] и 1000 см^{-1} , обусловленные ароматической структурой D-фенилаланина [16] (рисунок 2, а), отсутствуют, а наличие данных сигналов на спектре высушенной дисперсной фазы (рисунок 2, в) подтверждает факт нахождения действующего вещества в ее составе. При этом на спектре дисперсной фазы дополнительно наблюдаются сигналы 850 и 1100 см^{-1} , характерные для полисорбата-80 [17].

Таким образом, в составе дисперсионной среды полученного коллоидного раствора находятся вода, спирт этиловый и пропиленгликоль, в составе дисперсной фазы – грамицидин С и полисорбат-80.

Полученный образец коллоидного раствора грамицидина С проанализирован с использованием метода динамического рассеяния света для установления наличия частиц, определения их размера и поверхностного заряда (рисунок 3).

Согласно данным (рисунок 3), размер частиц коллоидного раствора находится в пределах от 5 до 50 нм . Значение поверхностного заряда (ζ -потенциала) частиц коллоидного раствора находится в диапазоне $(-1,1; +7,9)\text{ мВ}$.

Малая величина ζ -потенциала в случае разработанной композиции объясняется неионогенной природой ПАВ – полисорбата-80, так как данное вспомогательное вещество обеспечивает устойчивость

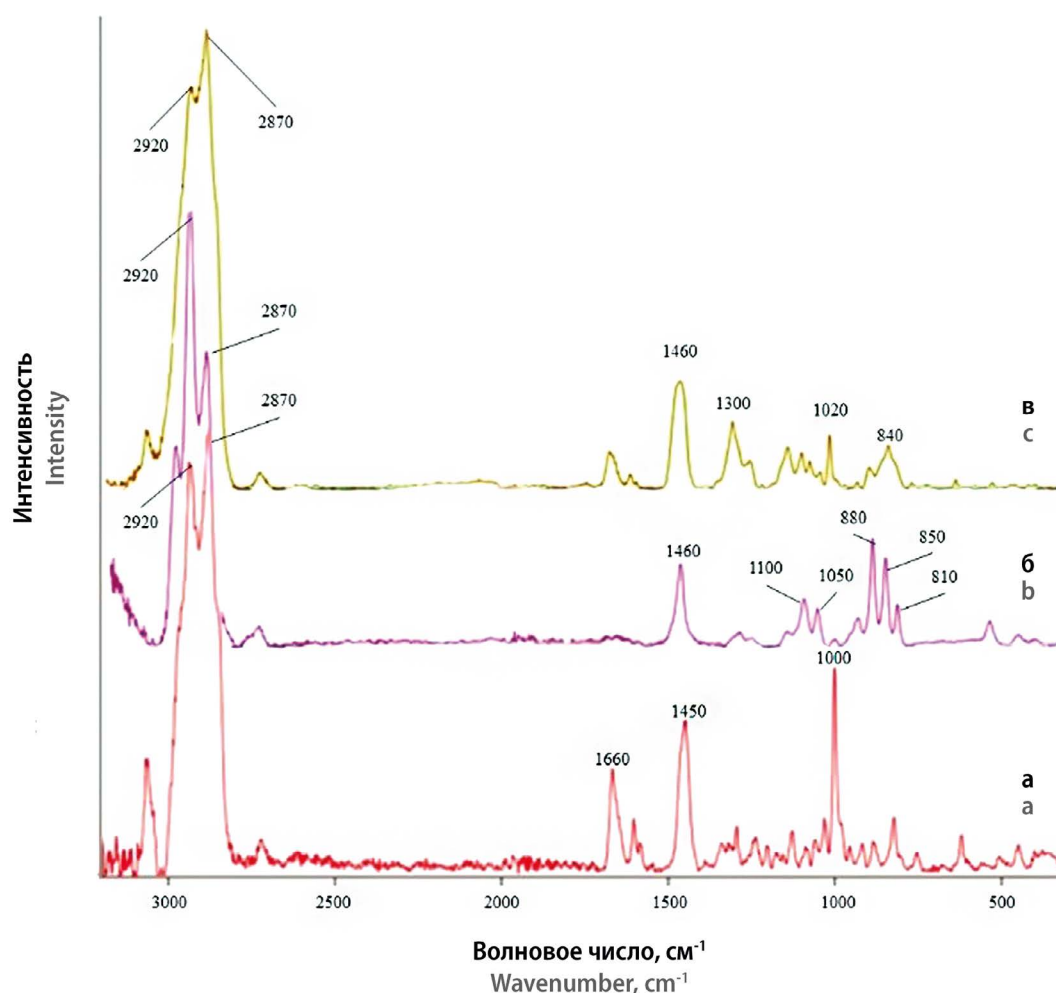


Рисунок 2. Рамановские спектры:

а – грамицидина С дигидрохлорида; б – коллоидного раствора грамицидина С дигидрохлорида; в – дисперсной фазы коллоидного раствора грамицидина С

Figure 2. Raman spectra:

а – gramicidin S dihydrochloride; б – gramicidin S dihydrochloride colloidal solution; в – dispersed phase of gramicidin S colloidal solution

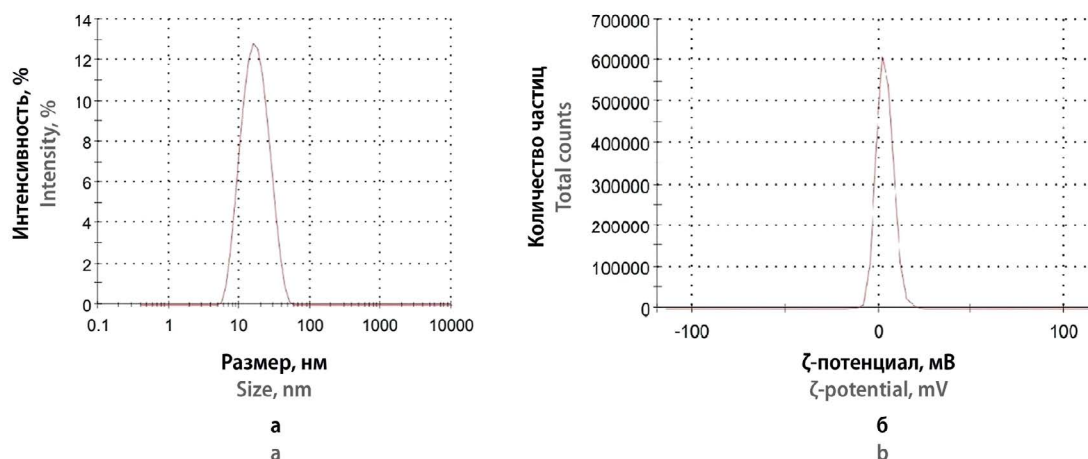


Рисунок 3. Данные исследования коллоидного раствора грамицидина С методом динамического рассеяния света:
а – размер частиц; б – поверхностный заряд

Figure 3. Gramicidin S colloidal solution analysis by dynamic light scattering:
a – particle size; b – surface charge

коллоидного раствора за счет стерических факторов, провоцирующих отталкивание частиц, сохраняя структуру [18]. Отличный от нулевого значения заряд частиц, характерный для мицелл неионогенных ПАВ, свидетельствует о наличии в структуре коллоидного раствора заряженных частиц, среди которых могут быть ионогенные примеси полисорбата-80 в виде свободных жирных кислот [19].

В то же время известно, что мицеллы на основе полисорбата-80, как правило, несут отрицательный заряд [20]. Принимая во внимание химическую природу пропиленгликоля, влияние данного компонента на сдвиг значения заряда в область положительных значений крайне мало, на основании чего можно сделать вывод о роли грамицидина С, обладающего свойствами катиона.

Таким образом, полученное значение ζ -потенциала не противоречит условию стабильности коллоидного раствора, образованного неионогенным ПАВ.

Для оценки стабильности коллоидного раствора проведена оценка его кинетической устойчивости, центрифугирование не привело к оседанию дисперсной фазы, что свидетельствует о кинетической устойчивости композиции.

Для оценки количественного содержания грамицидина С использовали метод ВЭЖХ. Результаты валидационных испытаний разработанной методики представлены в таблице 4:

Результаты исследования кинетики высвобождения грамицидина С из композиции в сравнении с исходной субстанцией представлены на рисунке 4:

Из графиков (рисунок 4) видно, что грамицин С не обладает растворимостью в среде, имитирующей полость рта, однако в составе композиции антибиотик высвобождается с высокой скоростью (более 75 % за 1 ч), что способно обеспечить более высокое антимикробное действие.

Таблица 4. Результаты валидационных испытаний методики количественного определения грамицидина С

Table 4. Results of validation tests for Gramicidin S quantification method

Параметр Criteria	Результат Result
Специфичность Specificity	На хроматограмме раствора «плацебо» отсутствует пик со временем удерживания грамицидина С (46,38 мин) A peak with the retention time of gramicidin S (46.38 min) is absent on the chromatogram of «placebo»
Линейность Linearity	$R = 0,9997$ Уравнение линейной зависимости $y = 28495,6x - 17781,2$ $R = 0,9997$ Linear dependence equation $y = 28495,6x - 17781,2$
Воспроизводимость Repeatability	RSD = 0,85 %
Внутрилабораторная прецизионность Intra-labprecision	$F_{\text{факт.}} = 2,893$ $F_{\text{табл.}} = 10,967$ $F_{\text{факт.}} = 2,893$ $F_{\text{табл.}} = 10,967$
Правильность Accuracy	$RSD \leq 2,0 \%$ (0,85 %) Отклик 97,5–102,5 % (99,8 %) Доверительный интервал включает значение 100 % (99,8 $\pm$ 0,9) $RSD \leq 2,0 \%$ (0,85 %) Response 97.5–102.5 % (99.8 %) The confidence interval includes meaning 100 % (99.8 $\pm$ 0.9)
Аналитическая область Analytical area	1–140 %

Антимикробную активность композиции исследовали в сравнении с водной суспензией грамицидина С. Результаты данного исследования представлены на рисунке 5.

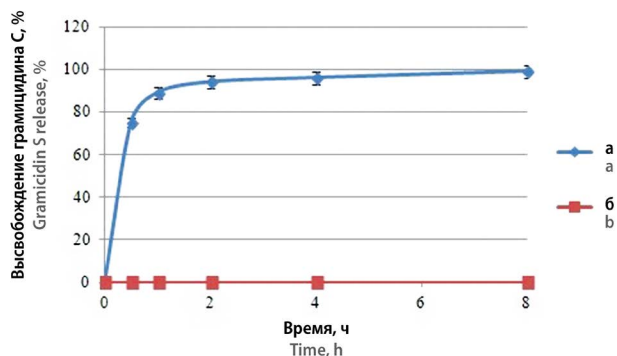


Рисунок 4. Параметры высвобождения грамицидина С из композиции (а) в сравнении с растворением грамицидина С дигидрохлорида (б)

Figure 4. Release parameters of gramicidin S from the composition (a) in comparison with the dissolution of gramicidin S dihydrochloride (b)

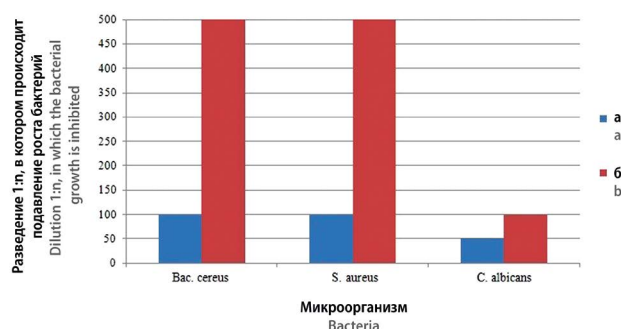


Рисунок 5. Антимикробное действие суспензии (а) и коллоидного раствора (б) грамицидина С дигидрохлорида

Figure 5. Antimicrobial action of gramicidin S hydrochloride in suspension (a) and in colloidal solution (b)

Из результатов, представленных на рисунке 5, следует, что грамицидин С в составе коллоидного раствора проявляет более высокий уровень антимикробной активности в 2–5 раз по отношению к тест-штаммам. Дополнительный вклад в наблюдаемый эффект может внести присутствие ПАВ. Известно, что ПАВ способны повышать активность различных антимикробных агентов за счет влияния на клеточную стенку бактерий [21]. А с учетом того, что грамицидин С имеет схожий механизм активности, оказывая поверхностно-активное воздействие на оболочку микроорганизмов, возможно, наблюдается синергетическое взаимодействие пептида, ПАВ и системы соразтворителей, входящих в состав композиции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования определена структура жидкой композиции, содержащей грамицидин С в системе соразтворителей, что позволило охарактеризовать ее как коллоидный раствор.

Установлено, что включение грамицидина С в состав мицеллы коллоидного раствора приводит к значительному повышению эффективности антибиотика, что открывает перспективы к уменьшению дозировки действующего вещества и, как следствие, снижению уровня побочных эффектов при применении лекарственного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

- Gause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944;154(3918):703–703. DOI: 10.1038/154703a0.
- Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H., Zaitseva E., Laubscher W. E., van Rensburg W., Behrends J. C., Bechinger B., Hamoen L. W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). DOI: 10.1128/mBio.00802-18.
- Государственный реестр лекарственных средств. Грамицидин С. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%BD&m=mnp>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Сыров К. К., Нестерук В. В. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний местного применения и способ ее получения и применения. Патент РФ на изобретение № RU 2627423 C1. 08.08.2017. Доступно по: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/627/423/%D0%98%D0%97-02627423-00001/document.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Сыров К. К., Нестерук В. В. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний местного применения и способ ее получения и применения. Патент РФ на изобретение № RU 2604575 C1. 10.12.2016. Доступно по: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/575/DOCUMENT.PDF>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Сыров К. К., Нестерук В. В. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний местного применения и способ ее получения и применения. Патент РФ на изобретение № RU 2604576 C1. 10.12.2016. Доступно по: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/576/DOCUMENT.PDF>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Переверзев А. П. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний. Патент РФ на изобретение № RU 2749902 C2. 18.06.2021. Доступно по: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/749/902/%D0%98%D0%97-02749902-00001/document.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Калустов В. Б., Бирюкова Е. А., Измestьева Е. В., Дранников А. А. Антибактериальная композиция для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ приготовления антибактериальной композиции для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления. Патент РФ на изобретение № RU 2659418 C1. 02.07.2018. Доступно по: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/659/418/%D0%98%D0%97-02659418-00001/document.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Калустов В. Б., Бирюкова Е. А., Измestьева Е. В., Дранников А. А. Антибактериальная композиция для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ приготовления антибактериальной композиции для доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления, способ доставки Грамицидина С к очагу местного воспаления. Евразийский патент на изобретение

- № EA 036926 B1. 15.01.2021. Доступно по: <http://www.eapatis.com/Data/EATXT/eapo2021/PDF/036926.pdf>. Ссылка активна на 12.11.2021.
- Solomonov A. V., Marfin Y. S., Romyantsev E. V., Ragozin E., Zahavi T. S., Gellerman G., Tesler A. B., Muench F., Kumagai A., Miyawaki A. Self-assembled micellar clusters based on Triton-X-family surfactants for enhanced solubilization, encapsulation, proteins permeability control, and anticancer drug delivery. *Materials Science and Engineering*. 2019;99:794–804. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.016.
 - Kassem A. A., Mohsen A. M., Ahmed R. S., Essam T. M. Self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;218:219–232. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.02.081.
 - Glatter O., Salentinig S. Inverting structures: From micelles via emulsions to internally self-assembled water and oil continuous nanocarriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2020;49:82–93. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.05.003.
 - Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/276/#zoom=z>. Ссылка активна на 12.11.2021.
 - Le M. L. P., Tran N. A., Ngo H. P. K., Nguyen T. G. Liquid electrolytes based on ionic liquids for lithium-ion batteries. *Journal of Solution Chemistry*. 2015;44(12):2332–2343. DOI: 10.1007/s10953-015-0408-z.
 - Ogawa K., Oshima Y., Etoh T., Kaisyakuji Y., Tojigamori M., Ohno Y., Shiraishi N., Inomata M. Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2021;56(7):1150–1156. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2021.03.040.
 - Zhang L., Yuan W.-L., Zhang Z., Zhang G.-H., Chen H., Zhao N., He L., Tao G.-H. Self-assembly ionic nanofibers derived from amino acid for high-performance particulate matter removal. *Journal of Materials Chemistry A*. 2019;7(9):4619–4625. DOI: 10.1039/c8ta11382c.
 - Mitsutake H., Castro S. R., de Paula E., Poppi R. J., Rutledge D. N., Breitzkreitz M. C. Comparison of different chemometric methods to extract chemical and physical information from Raman images of homogeneous and heterogeneous semi-solid pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;552(1–2): 119–129. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.058.
 - Friedrich R. B., Kann B., Coradini K., Offerhaus H. L., Beck R. C., Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;78:204–213. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.07.018.
 - Espinosa-Olivares M. A., Delgado-Buenrostro N. L., Chirino Y. I., Trejo-Márquez M. A., Pascual-Bustamante S., Ganem-Rondero A. Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: physico-chemical characterization, in vitro release, ex vivo skin penetration, stability and antioxidant activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;155:105533. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105533.
 - Prabhakar K., Afzal S. M., Surender G., Kishan V. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013;3(5):345–353. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.08.001.
 - Guo L., Fang Y., Liang X., Xu Y., Chen J., Li Y., Fang S., Meng Y. Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119939. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119939.
 - Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H., Zaitseva E., Laubscher W. E., van Rensburg W., Behrends J. C., Bechinger B., Hamoen L. W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). DOI: 10.1128/mBio.00802-18.
 - Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv. Gramitsidin S. [State register of medicines. Gramicidin S]. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%BD&m=mn>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Syrov K. K., Nesteruk V. V. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy mestnogo primeneniya i sposob ee polucheniya i primeneniya* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases of local use and method for its preparation and use]. Patent RUS № 22627423 C1. 08.08.2017. Available at: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/627/423/%D0%98%D0%97-02627423-00001/document.pdf> Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Syrov K. K., Nesteruk V. V. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy mestnogo primeneniya i sposob ee polucheniya i primeneniya* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases of local use and method for its preparation and use]. Patent RUS № 2604575 C1. 10.12.2016. Available at: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/575/DOCUMENT.PDF>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Syrov K. K., Nesteruk V. V. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy mestnogo primeneniya i sposob ee polucheniya i primeneniya* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases of local use and method for its preparation and use]. Patent RUS № 2604576 C1. 10.12.2016. Available at: <https://new.fips.ru/Archive4/PAT/2016FULL/2016.12.10/DOC/RUNWC1/000/000/002/604/576/DOCUMENT.PDF>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Pereverzev A. P. *Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya infektsionno-vospalitel'nykh zabolevaniy* [Pharmaceutical composition for the treatment of infectious and inflammatory diseases]. Patent RUS № 2749902 C2. 18.06.2021. Available at: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/749/902/%D0%98%D0%97-02749902-00001/document.pdf>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Kalustov V. B., Biryukova E. A., Izmet'eva E. V., Drannikov A. A. *Antibakterial'naya kompozitsiya dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob prigotovleniya antibakterial'noy kompozitsii dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya* [Antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, method of producing an antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, and method of delivering gramicidin C to a site of local inflammation]. Patent RUS № 2659418 C1. 02.07.2018. Available at: <https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/659/418/%D0%98%D0%97-02659418-00001/document.pdf>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
 - Kalustov V. B., Biryukova E. A., Izmet'eva E. V., Drannikov A. A. *Antibakterial'naya kompozitsiya dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob prigotovleniya antibakterial'noy kompozitsii dlya dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya, sposob dostavki Gramitsidina S k ochagu mestnogo vospaleniya* [Antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, method of producing an antibacterial composition to deliver gramicidin C to a site of local inflammation, and method of delivering gramicidin C to a site of local inflammation]. Patent EA № 036926 B1. 15.01.2021. Available at: <http://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/659/418/%D0%98%D0%97-02659418-00001/document.pdf>

REFERENCES

- Gause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944;154(3918):703–703. DOI: 10.1038/154703a0.

- eapatis.com/Data/EATXT/eapo2021/PDF/036926.pdf. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
10. Solomonov A. V., Marfin Y. S., Rumyantsev E. V., Ragozin E., Zahavi T. S., Gellerman G., Tesler A. B., Muench F., Kumagai A., Miyawaki A. Self-assembled micellar clusters based on Triton-X-family surfactants for enhanced solubilization, encapsulation, proteins permeability control, and anticancer drug delivery. *Materials Science and Engineering*. 2019;99:794–804. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.016.
11. Kassem A. A., Mohsen A. M., Ahmed R. S., Essam T. M. Self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*. 2016;218:219–232. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.02.081.
12. Glatzer O., Salentinig S. Inverting structures: From micelles via emulsions to internally self-assembled water and oil continuous nanocarriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2020;49:82–93. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.05.003.
13. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. 14-e izd. OFS.1.1.0012.15. Validatsiya analiticheskikh metodik [State Pharmacopoeia of Russian Federation. 14th ed. OFS.1.1.0012.15. Validation of analytical procedures]. Available at: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/276/#zoom=z>. Accessed: 12.11.2021. (In Russ.)
14. Le M. L. P., Tran N. A., Ngo H. P. K., Nguyen T. G. Liquid electrolytes based on ionic liquids for lithium-ion batteries. *Journal of Solution Chemistry*. 2015;44(12):2332–2343. DOI: 10.1007/s10953-015-0408-z.
15. Ogawa K., Oshima Y., Etoh T., Kaisyakuji Y., Tojigamori M., Ohno Y., Shiraishi N., Inomata M. Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2021;56(7):1150–1156. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2021.03.040.
16. Zhang L., Yuan W.-L., Zhang Z., Zhang G.-H., Chen H., Zhao N., He L., Tao G.-H. Self-assembly ionic nanofibers derived from amino acid for high-performance particulate matter removal. *Journal of Materials Chemistry A*. 2019;7(9):4619–4625. DOI: 10.1039/c8ta11382c.
17. Mitsutake H., Castro S. R., de Paula E., Poppi R. J., Rutledge D. N., Breitzkreitz M. C. Comparison of different chemometric methods to extract chemical and physical information from Raman images of homogeneous and heterogeneous semi-solid pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;552(1–2): 119–129. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.058.
18. Friedrich R. B., Kann B., Coradini K., Offerhaus H. L., Beck R. C., Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;78:204–213. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.07.018.
19. Espinosa-Olivares M. A., Delgado-Buenrostro N. L., Chirino Y. I., Trejo-Márquez M. A., Pascual-Bustamante S., Ganem-Rondero A. Nanostructured lipid carriers loaded with curcuminoids: physico-chemical characterization, in vitro release, ex vivo skin penetration, stability and antioxidant activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;155:105533. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105533.
20. Prabhakar K., Afzal S. M., Surender G., Kishan V. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013;3(5):345–353. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.08.001.
21. Guo L., Fang Y., Liang X., Xu Y., Chen J., Li Y., Fang S., Meng Y. Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119939. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119939.