

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



**Скурдина Анна Алексеевна**

Молекулярные механизмы формирования комплексов включения фторхинолонов с мономерными и полимерными производными  $\beta$ -циклодекстрина как основа для регуляции свойств антибактериальных препаратов

03.01.06 БИОТЕХНОЛОГИЯ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н. проф. Кудряшова Е.В.

Москва – 2021

## Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Антибактериальные препараты фторхинолонового ряда.....	11
1.1.1. Строение и механизм действия фторхинолонов.....	11
1.1.2. Антибактериальная активность фторхинолонов.....	13
1.1.3. Фармакокинетика и фармакодинамика фторхинолонов.....	17
1.1.4. Методы регуляции физико-химических свойств фторхинолонов.....	19
1.2. Системы доставки лекарственных препаратов на основе циклодекстринов.....	22
1.2.1. Образование комплексов типа «гость-хозяин» с циклодекстринами.....	25
1.2.2. Методы исследования термодинамических параметров стабилизации комплексов «гость-хозяин» с циклодекстринами.....	29
1.2.3. Методы исследования структуры комплексов циклодекстринов с малыми лекарственными молекулами.....	32
1.2.4. Самоорганизация циклодекстринов и их комплексов.....	34
1.2.5. Фармакокинетические параметры циклодекстринов и их комплексов с лекарственными препаратами.....	40
1.2.6. Методы получения высокомолекулярных соединений на основе циклодекстринов, используемых в качестве мономера.....	42
1.3. Исследования антибактериальных свойств лекарственных форм.....	46
1.3.1. Методы определения значения минимальной ингибирующей концентрации лекарственных препаратов.....	47
1.3.2. Антибактериальные свойства незагруженных систем доставки лекарств.....	49
1.3.3. Исследование пролонгированного антибактериального действия лекарственных форм <i>in vitro</i> .....	52
Глава 2. Материалы и методы.....	56
2.1. Материалы.....	56
2.2. Методы.....	56

Глава 3. Результаты и обсуждение .....	64
3.1. Исследование механизма взаимодействия фторхинолонов с производными $\beta$ -циклодекстринов .....	64
3.1.1. Определение констант диссоциации комплексов фторхинолонов с производными $\beta$ -циклодекстрина спектроскопическими методами.....	64
3.1.2. Исследование структуры комплексов с помощью методов молекулярного моделирования .....	76
3.2. Влияние образования комплексов включения с производными $\beta$ -циклодекстрина на физико-химические и функциональные свойства фторхинолонов.....	81
3.2.1. Растворимость фторхинолонов.....	82
3.2.2. Взаимодействие производных $\beta$ -циклодекстрина с липосомальным бислоем	84
3.2.3. Кинетика высвобождения фторхинолонов из комплексов с производными $\beta$ -циклодекстрина с использованием модельной полупроницаемой мембраны	88
3.3. Влияние полимеризации производных $\beta$ -циклодекстрина на механизм формирования комплексов с фторхинолонами .....	90
3.3.1. Синтез разветвленных полимеров на основе производных $\beta$ -циклодекстрина	90
3.3.2. Физико-химические свойства полимеров на основе производных $\beta$ -циклодекстрина.....	92
3.3.3. Исследование взаимодействия полимеров на основе производных $\beta$ -циклодекстрина с моксифлоксацином.....	97
3.4. Темплатный синтез 3D-матриксных структур с квази-регулярной полимерной структурой на основе сульфобутилового эфира $\beta$ -циклодекстрина .....	100
3.4.1. Синтез частиц с инкапсулированным фторхинолоном .....	101
3.4.2. Исследование физико-химических свойств 3D-матриксных структур.....	101
3.4.3. Влияние моксифлоксацина на формирование полимерной матрицы на основе сульфобутилового эфира $\beta$ -циклодекстрина .....	105
3.5. Профили высвобождения моксифлоксацина из полимерных носителей и матриксных систем на основе производного циклодекстрина.....	113
3.6. Влияние производных $\beta$ -циклодекстрина на антибактериальную активность фторхинолонов <i>in vitro</i> .....	118

3.6.1. Определение минимальной ингибирующей концентрации фторхинолонов ..	119
3.6.2. Влияние носителей на основе $\beta$ -циклодекстрина на антибактериальные свойства фторхинолонов в течение длительного периода времени .....	122
3.6.3. Влияние носителей на основе $\beta$ -циклодекстрина на механизм антибактериального действия моксифлоксацина и ультраструктуру бактериальных клеток .....	126
3.6.4. Исследование адсорбции частиц на поверхности бактериальных клеток .....	129
3.6.5. Исследование адсорбции комплексов полимерных частиц на основе $\beta$ -циклодекстрина методом ТЕМ.....	131
Заключение.....	136
Выводы .....	138
Благодарности.....	139
Список использованной литературы .....	140

## Список сокращений

- АА – антибактериальная активность
- ГМД – 1,6-гексаметилендиизоцианат
- ГП-β-ЦД – 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин
- ГрО – грамотрицательные бактериальные клетки
- ГрП – грамположительные бактериальные клетки
- ДЗИ – диаметры зон ингибирования (отсутствия) роста бактерий
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин
- ИК-спектроскопия Фурье – инфракрасная спектроскопия Фурье
- КД-спектроскопия – спектроскопия кругового дихроизма
- $K_{дис}$  – константа диссоциации
- КЛ – кардиолипид
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- КУД – коэффициент усиления действия
- ЛФ – левофлоксацин
- М-β-ЦД – метил-β-циклодекстрин
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МФ – моксифлоксацин
- РСА – рентгеноструктурный анализ
- СБЕ-β-ЦД – сульфобутиловый эфир β-циклодекстрин
- ФФ - фенолфталеин
- ФХ – фторхинолон
- ЦД – циклодекстрин
- ЦФ – ципрофлоксацин
- ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса
- ВКС – система классификации фармацевтических препаратов
- DLS – метод динамического рассеяния света
- FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- IVIVC – подходы по оценке корреляции поведения лекарственных форм *in vitro* – *in vivo* (а ты много это используешь?) – первый раз такое сокращение вижу
- L-DOPA - дигидроксифенилаланин
- NTA – метод анализа траектории частиц
- PBS – натрий-фосфатный буфер
- PLGA – полилактид-ко-гликолида

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Фторхинолоны (ФХ) являются антибактериальными препаратами, которые применяются для лечения широкого круга инфекционных заболеваний. Однако терапия с использованием ФХ сопровождается рядом побочных эффектов, что необходимо учитывать при длительном лечении с применением высоких дозировок, например, туберкулеза легких. Для регуляции свойств лекарственных препаратов в современной биомедицине используются различные носители лекарств, среди которых наиболее перспективными являются биосовместимые природные олигомерные молекулы циклического строения - циклодекстрины (ЦД). ЦД являются продуктами ферментативной деградации полисахаридов и могут образовывать комплексы включения «гость-хозяин» со многими молекулами, содержащими ароматические гидрофобные фрагменты. Образование таких комплексов позволяет регулировать различные биофармацевтические свойства лекарств: растворимость, химическую стабильность в биологических жидкостях, биодоступность, а также способствует снижению раздражения слизистых желудочно-кишечного тракта.

Комплексы ФХ-ЦД описаны в литературе, однако механизм образования комплексов включения и структуры таких систем изучены в недостаточной степени. С появлением широкого круга производных ЦД, а также олигомерных и полимерных частиц, синтезированных на основе ЦД, появляется необходимость в более детальном изучении роли природы заместителя в ЦД и пространственной структуры полимера на основе ЦД на эффективность комплексообразования «гость-хозяин».

Отсутствие комплексных исследований о влиянии структуры лекарственной формуляции на ее антибактериальную активность ограничивает разработки высокоэффективных носителей в биомедицине и нанобиотехнологии. Таким образом, важным аспектом является поиск корреляций между основными параметрами системы ФХ-носитель (молекулярная масса и структурные особенности носителя, заряд, эффективность связывания ФХ, профиль высвобождения препарата) и ее антибактериальным действием *in vitro*. Установление данных закономерностей необходимо для выбора наиболее оптимального способа введения лекарственной формы в зависимости от локализации инфекции *in vivo*. Кроме того, результаты исследований позволят осуществлять направленную регуляцию антибактериальной активности препаратов в соответствии с особенностями штамма возбудителя (например, морфологии поверхности бактериальных клеток).

Актуальной задачей биотехнологии является изучение антибактериальной активности лекарственной молекулы *in vitro* как в свободном виде, так и в комплексе с носителем в течение относительно продолжительного периода времени, например, в течение 5-7 суток. В этой связи важным этапом для определения влияния носителя на антибактериальные свойства препарата и обнаружения пролонгированного антибактериального действия является визуализация ультратонкой структуры бактериальных клеток и механизма антибактериального действия.

**Степень разработанности темы.** В литературе были исследованы комплексы ФХ с некоторыми производными ЦД с целью улучшения растворимости лекарственных молекул. Опубликован ряд работ по изучению строения комплексов ФХ-ЦД, однако общих закономерностей, определяющих стабильность систем, исследовано не было. Экспериментально показано влияние ЦД на минимально ингибирующую концентрацию ФХ *in vitro*, но не определены возможности регуляции антибактериальных свойств ФХ *in vitro* в зависимости от физико-химических характеристик комплексов и вида бактериальных клеток.

**Цель исследования.** Целью данной работы является установление корреляции между физико-химическими свойствами комплексов включения ФХ с различными производными ЦД (как мономерными, так и полимерными) и функциональными свойствами лекарственных препаратов, в первую очередь, антибактериальной активностью.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установление механизма образования комплексов ФХ с производными ЦД; определение параметров устойчивости и структурных характеристик комплексов.
2. Определение влияния производных ЦД на свойства ФХ: растворимость, скорость растворения, взаимодействие с липидным бислоем, профиль высвобождения и антибактериальную активность на бактериальных клетках *Escherichia coli* в зависимости от заместителя в ЦД.
3. Получение полимерных соединений на основе ЦД, характеристика их физико-химических свойств и выявление влияния молекулярной архитектуры полимера на механизм и эффективность связывания ФХ, а также антибактериальное действие препарата *in vitro* на протяжении 7 дней.
4. Получение 3D-матричных структур методом темплатного синтеза (где в качестве мономера используется комплекс ФХ-ЦД), характеристика их физико-химических свойств и определение влияния инкапсуляции ФХ в матрицу полимера на антибактериальное действие *in vitro* на протяжении 7 дней.

5. Установление основных закономерностей между физико-химическими свойствами комплексов ФХ-носитель и эффективностью их антибактериального действия *in vitro* в соответствии с особенностями поверхности штамма *Escherichia coli*.

**Научная новизна.** Впервые изучены молекулярные детали формирования комплексов ФХ с ЦД в зависимости от природы заместителя ЦД. Показано, что в случае мономерных ЦД наиболее эффективное комплексообразование наблюдается для катионной формы ФХ и ЦД, имеющих гидрофобные или отрицательно заряженные заместители. В случае полимерных ЦД необходим выраженный отрицательный  $\zeta$ -потенциал (менее -13 мВ). Разработаны методики анализа структуры комплексов и определения параметров связывания для подобных систем спектроскопическими методами (УФ, ИК, КД) и методами компьютерного моделирования.

Предложена новая методика для изучения антибактериальных свойств лекарственных форм *in vitro* в течение 7-8 дней с использованием методов микробиологии и просвечивающей электронной микроскопии. Продемонстрированы возможности усиления и достижения пролонгированного антибактериального действия ФХ в соответствие с параметрами носителя (молекулярная масса, заряд, плотность полимерной матрицы,  $K_{дис}$ ). Так, образование комплексов ФХ-ЦД обуславливает усиление антибактериального действия ФХ на 20-40% для обоих штаммов. Полимерные носители ФХ способствуют проявлению пролонгированного антибактериального действия (до 7 дней).

Определен механизм усиления антибактериального действия ФХ при использовании полимерных носителей ЦД – адсорбция частиц полимера на поверхности клеток. Установлено, что различия в морфологии поверхности штамма *E. coli* (наличие фимбрий на поверхности клеток) оказывают влияние на степень адсорбции полимеров ЦД. Показано, что наличие фимбрий на поверхности *E. coli* обуславливает усиление адсорбции частиц с отрицательным  $\zeta$ -потенциалом, что приводит к 10-кратному усилению антибактериального действия ФХ *in vitro* на протяжении 5 дней. Впервые с применением оригинальной методики контрастирования проведена визуализация адсорбции частиц на основе ЦД на бактериальных клетках методом электронной микроскопии.

На основании результатов работы предложены рекомендации для разработки высокоэффективных носителей, обладающих замедленным высвобождением лекарственных препаратов и более высокой антибактериальной активностью, а также их применению в биомедицине.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Комплексное исследование систем ФХ-носитель (молекулярные механизмы формирования комплексов, структура



комплексов,  $K_{\text{дис}}$ , влияние структуры полимера на эффективность комплексообразования) спектроскопическими методами и методами компьютерного моделирования позволило определить наиболее важные характеристики системы для направленного регулирования свойств ФХ: растворимости, профиля высвобождения, взаимодействия с грамотрицательными клетками, антибактериальную активность.

С практической точки зрения, полученные результаты являются необходимыми в медицинской биотехнологии для разработки высокоэффективных лекарственных форм ФХ и других лекарственных препаратов с использованием биосовместимых производных ЦД различного строения. На основании разработанных методик и результатов предложены способы биомедицинского применения носителей ЦД в зависимости от их строения и физико-химических свойств (размера, заряда, плотности полимерной матрицы,  $K_{\text{дис}}$ ) для усиления антибактериальной активности препаратов и реализации их пролонгированного антибактериального действия.

**Методология и методы исследования.** Разработана методология на основе спектроскопических методов (ИК-, УФ-, КД-) и методов компьютерного моделирования для изучения структуры и молекулярных механизмов формирования комплексов ФХ-ЦД. Применены микробиологические методики и методы электронной микроскопии для исследования антибактериальной активности молекул лекарств *in vitro*.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Механизм образования комплексов ФХ-ЦД основан на погружении ароматического остова ФХ внутрь гидрофобной полости ЦД и формировании дополнительных взаимодействий (гидрофобных, электростатических, водородных связей) между функциональными группами ФХ и ЦД вне полости олигосахарида.
2. Образование комплексов ФХ-ЦД способствует увеличению растворимости препарата, изменяет характер взаимодействия с биомембраной. Комплексы ФХ с различными производными ЦД демонстрируют высокую антибактериальную активность *in vitro* на грамотрицательных клетках *Escherichia coli*: достигается усиление антибактериального действия ФХ на 20-40%.
3. Формирование полимерной матрицы с разветвленной структурой на основе ЦД с полярным или отрицательно заряженным заместителем приводит к усилению эффективности связывания ФХ с носителем в 10-20 раз по сравнению с мономерным ЦД. Использование полимерных носителей позволяет усиливать антибактериальное действие ФХ *in vitro* и обеспечивать пролонгированное действие.
4. 3D-матриксные структуры, полученные методом темплатного синтеза (где в качестве мономера используется комплекс ФХ-ЦД), характеризуются высокой степенью загрузки

лекарства, анизотропной структурой, наиболее низкой скоростью высвобождения ФХ. 3D-матриксные структуры позволяют усилить антибактериальное действие препарата *in vitro* до 2,2 раз на седьмой день.

5. Усиление антибактериальной активности ФХ в составе комплексов с полимерами на основе ЦД достигается за счет адсорбции частиц на поверхности бактериальных клеток; наличие фимбрий на поверхности *E.coli* приводит к предпочтительной адсорбции частиц с отрицательным  $\zeta$ -потенциалом по сравнению с нейтральными частицами.

**Личный вклад автора.** Все представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этапах комплексного исследования. Автор самостоятельно изучил литературные данные и составил литературный обзор. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты, самостоятельно обработал и проанализировал полученные результаты, принимал участие при подготовке всех публикаций по материалам работы.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по п. 8: «Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном и клеточном уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования медицинских биопрепаратов».

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные результаты диссертационной работы были представлены автором на российских и международных конференциях, в том числе XI Конкурсе работ молодых ученых в рамках выставки «Химия 2017» (2017, Москва, Россия), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2017, 2019, 2020, Москва, Россия), Школке-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (2019, 2020, Казань, Россия), Международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (2017, 2018, 2019, Москва, Россия), International Conference «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (2017 Истра, Московская область; 2019 Санкт-Петербург, Россия), XXVIII Российской конференции по электронной микроскопии (2020, Черноголовка, Московская область), XXXIII Зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2021, Москва, Россия).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 12 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 17 публикаций в сборниках материалов и тезисов докладов на конференциях и 1 патент на изобретение.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Антибактериальные препараты фторхинолонового ряда

#### 1.1.1. Структура и механизм действия фторхинолонов

Фторхинолоны (ФХ) являются антибактериальными препаратами широко спектра действия. Полученные модификацией налидиксовой кислоты, ФХ (Рисунок 1) используются в терапии различных заболеваний, в том числе инфекций верхних и нижних дыхательных путей [1,2], гинекологических [3] и офтальмологических [4] инфекций, инфекций кожи [5], костей [6] и мочевыводящих путей [7], а также внебольничной пневмонии [8]. Также было показано, что некоторые ФХ проявляют антипролиферативные свойства *in vitro*, вызывая апоптоз раковых клеток, а также усиливают поглощение других химиотерапевтических агентов [9,10].

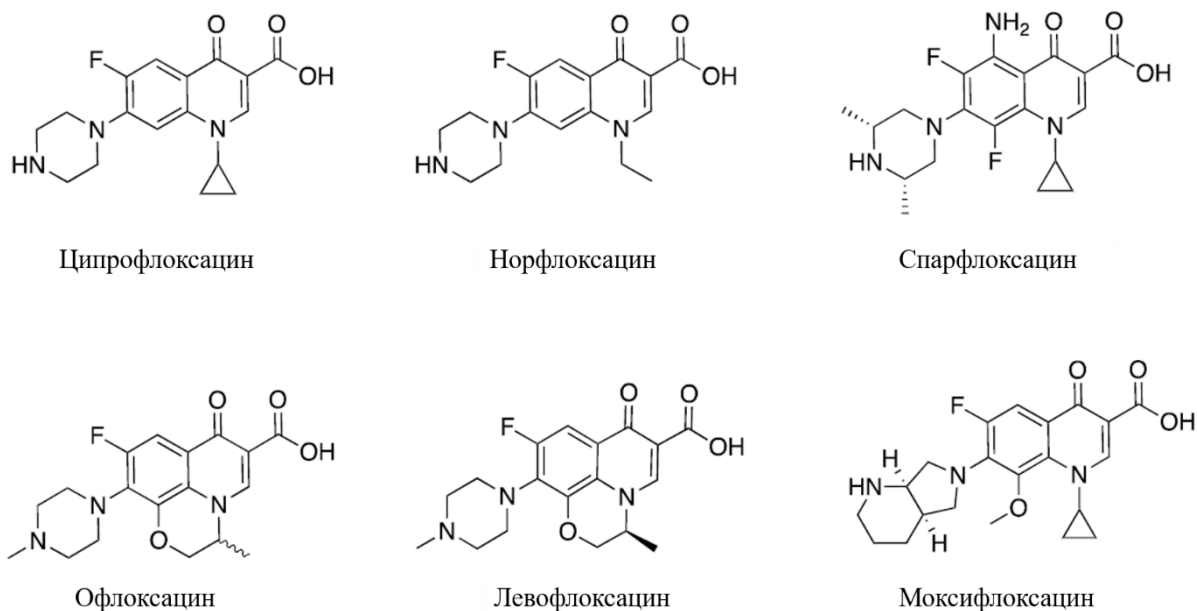


Рисунок 1. Структурные формулы некоторых представителей класса фторхинолонов [10].

Антибактериальное действие ФХ основано на ингибировании процессов репликации и транскрипции бактериальной ДНК, что приводит к гибели микроорганизмов. ФХ ингибируют активность ДНК-гиразы (топоизомеразы II) и/или препятствуют диссоциации комплекса ДНК с ДНК-гиразой. Поскольку бактериальная ДНК-гираза по своему строению отличается от ДНК-гиразы млекопитающих, ФХ в 1000 раз более избирательны по отношению к микроорганизмам. Также было обнаружено, что ФХ способны ингибировать и другой бактериальный фермент - топоизомеразу IV [11,12].

Как правило, антибактериальная активность ФХ против грамотрицательных бактерий связана с ингибированием ДНК-гиразы, а против грамположительных –

ингибированием топоизомеразы IV. Селективность связывания ФХ с бактериальными ферментами обусловлена также молекулярной структурой ФХ и особенностями штамма возбудителя [2].

Структура фармакофора ФХ (Рисунок 2) обусловлена связыванием с белком и бактериальной ДНК. Для проявления антибактериальной активности хинолоновый фрагмент ФХ содержит карбонильную и карбоксильную группы у С-3 и С-4 атомов соответственно, а также атом фтора в 6 положении. С-2 атом, как правило, не содержит заместителей, поскольку близко расположен к сайту связывания. Разработка новых ФХ основана на введении заместителей преимущественно в позицию С-7, а также С-1, С-5 и Х-8, которые влияют на эффективность антибактериального действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий.

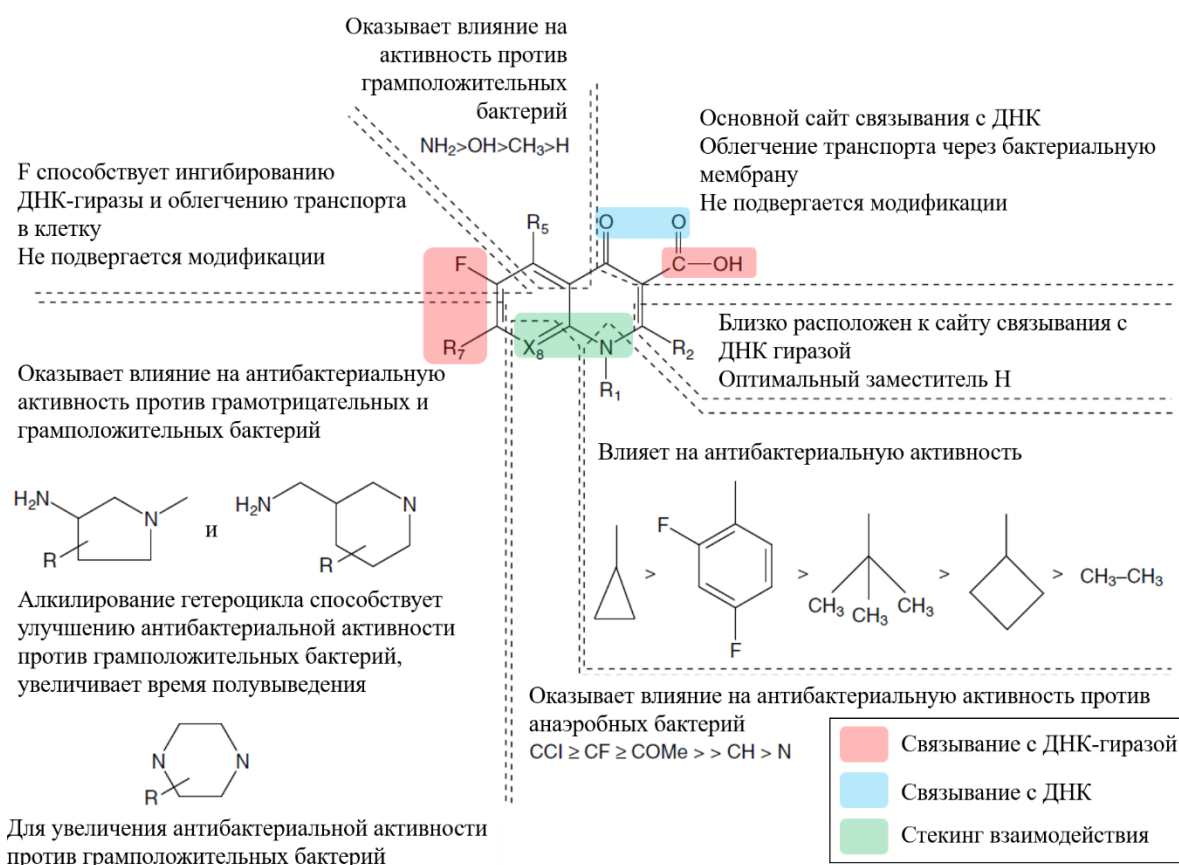


Рисунок 2. Взаимосвязь структуры и антибактериальной активности фторхинолонов [13].

До сих пор ведутся исследования для установления детального механизма действия ФХ [11]. Авторы [14] первыми предположили, что четыре лекарственные молекулы кооперативно связываются карбонильной и карбоксильной группами с азотистыми основаниями одноцепочечной ДНК через водородные связи. ФХ локализуются парами образуя стэкинг взаимодействия друг с другом.

Благодаря совершенствованию методов компьютерного моделирования и рентгеноструктурного анализа (РСА) последующие исследования установили другую структуру комплекса ДНК-ФХ-фермент: локализация двух ФХ в месте разрыва ДНК (по одной молекуле ФХ на конец одноцепочечной ДНК) или вблизи него. При этом происходит связывание С=О и СООН групп ФХ с боковыми заместителями аминокислотных остатков фермента. Типы взаимодействий в комплексе ДНК-ФХ-фермент имеют различную природу и зависят от вида и структуры фермента (ДНК-гираза или топоизомеразы IV), а также от штамма бактерии, из которого белок был получен. Так, авторы показали хелатирующий эффект иона  $Mg^{2+}$  в формировании связей между ФХ и топоизомеразой IV из *Acinetobacter baumannii*: ион магния координируется карбоксильной и карбонильной группами моксифлоксацина, а также молекулами воды, которые в свою очередь формируют водородные связи с Glu88 и Ser84 остатками фермента [15]. В то время как, авторы [16] предположили формирование Ван-дер-Ваальсовых и стэкинг взаимодействий между ФХ и ДНК в комплексе с топоизомеразой IV из *Streptococcus pneumoniae*.

### **1.1.2. Антибактериальная активность фторхинолонов**

ФХ классифицируют согласно их спектру антибактериального действия и фармакокинетического профиля (Таблица 1). К первому поколению относят налидиксовую кислоту и фторсодержащий флюмекин. Антибактериальный спектр их действия ограничен аэробными грамотрицательными бактериями.

Второе поколение ФХ обладает повышенной активностью (в 1000 раз) против как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов. Представитель второго поколения ципрофлоксацин до сих пор является одним из наиболее широко используемых ФХ, как с экономической точки зрения, так и по данным клинических исследований. Однако использование ципрофлоксацина для лечения респираторных заболеваний ограничено вследствие низкой антибактериальной активности против *Streptococcus pneumoniae*. Третье и четвертые поколения ФХ имеют более широкий спектр активности, например, в отношении *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* [10,17].

Таблица 1. Поколения фторхинолонов, их представители и некоторые данные по антибактериальной активности [10].

Поколение фторхинолона		Первое	Второе	Третье	Четвертое
Представители		Налидиксовая кислота Флюмекин	Ломефлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, ципрофлоксацин	Левифлоксацин, спарфлоксацин	Моксифлоксацин, гемифлоксацин
Антибактериальная активность	Enterobacteriaceae	+	+	+	+
	Пневмококки	-	+	+	+
	Стрептококки	-	-	+	+
	Анаэробы	-	-	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Только ципрофлоксацин	-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+

В целом ФХ имеют выраженную антибактериальную активность против *Enterobacteriaceae*, грамотрицательных бактерий и *Pseudomonas aeruginosa*, умеренную активность против стафилококков, микобактерий, хламидий, микоплазмы и уреплазмы. В меньшей степени ФХ действуют против стрептококков и анаэробных бактерий. Для некоторых бактерий, например, *E.coli*, *Klebsiella*, *Serratia* и *Pseudomonas aeruginosa*, под действием ФХ наблюдается постантибиотический эффект: после краткого воздействия препарата наблюдается продолжение подавление роста *in vitro* при удалении лекарства из среды в течение 4-8 часов [18]. Основным механизмом постантибиотического эффекта ФХ, как предполагается, является нарушение синтеза или экспрессии поверхностных мембранных белков, участвующих в адгезии бактериальных клеток. Уменьшение концентрации белков обуславливает снижение адгезии микроорганизмов к эукариотическим клеткам [19]. Так, авторы [20] показали, что при инкубировании *S.aureus* и *E.coli* в присутствии от 1/2 до 1/128 минимально ингибирующей концентрации (МИК) гатифлоксацина наблюдается снижение адгезии бактерий к буккальному эпителию человека.

Антибактериальное действие ФХ имеет концентрационную зависимость. Значения экспериментальных МИК *in vitro* различаются для каждого ФХ (Таблица 2). В среднем значения МИК варьируются в диапазоне от 0,01 до 20 мкг/мл [2].

Известны три основных механизма резистентности бактерий к действию ФХ. Наиболее часто наблюдается удаление молекул лекарства из клетки посредством активного транспорта (белковых насосов). Также были обнаружены изменения в генах, кодирующих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, вследствие мутаций. Структурные и конформационные изменения в сайтах связывания ФХ в белках могут обуславливать снижение эффективности связывания препарата и, следовательно, антибактериального действия [21].

Еще одним механизмом резистентности бактерий к ФХ является горизонтальный перенос генов. Захваченные плазмиды могут кодировать белки, которые способствуют устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам. Например, закодированный QnrA белок может связываться с ДНК-гиразой, в участках связывания ФХ, что приводит к блокированию образования комплекса лекарство-ДНК-гираза. Кроме того, были обнаружены мутантные белки аминогликозидной ацетилтрансферазы AAC(6')-Ib, которая способная ацелировать –NH– группу гетероцикла некоторых ФХ [22].

Снижение активности ФХ вследствие модификации в бактериальной среде было также продемонстрировано в результате отщепление атома фтора и/или модификации гетероцикла (разрыв цикла, окисление, образование N-ацетил и N-нитрозо соединений). Модифицированные производные ФХ имеют более высокие значения МИК (в 2 и более раз) по сравнению с исходными ФХ [23,24].

Таблица 2. Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК, мкг/мл) для некоторых фторхинолонов *in vitro* против аэробных бактерий [2].

Микроорганизм	Ципрофлоксацин		Гатифлоксацин		Левифлоксацин		Моксифлоксацин	
	МИК <sub>50</sub>	МИК <sub>90</sub>	МИК <sub>50</sub>	МИК <sub>90</sub>	МИК <sub>50</sub>	МИК <sub>90</sub>	МИК <sub>50</sub>	МИК <sub>90</sub>
<i>Грамположительные</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	1	0,12	0,12	0,015	0,03	0,06	0,12
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,12	0,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12	0,25
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2	0,25	0,5	1	1	0,12	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	16	0,5	2	1	4	0,25	4
<i>Грамотрицательные</i>								
<i>Acinetobacter spp.</i>	0,25	2	0,12	0,5	0,25	0,5	0,12	4
<i>Escherichia coli</i>	0,015	0,25	0,02	0,1	0,03	0,12	0,06	0,05
<i>Burkholderia cepacia</i>	4	32	2	16	4	16	2	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,25	4	2	8	0,5	8	2	16
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	16	1	4	1	4	0,5	2
<i>Salmonella spp.</i>	0,015	0,03	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,12



### 1.1.3. Фармакокинетика и фармакодинамика фторхинолонов

Помимо повышенной антибактериальной активности новые представители ФХ также характеризуются улучшенными фармакокинетическими параметрами (Таблица 3). В среднем при однократном приеме ФХ объем распределения составляет 1,2 – 2,5 л/кг, период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) - от 5 до 20 часов. При многократном приеме значения фармакокинетических параметров (максимальная концентрация лекарственного средства в плазме ( $C_{max}$ ), время достижения  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) и площадь под фармакокинетическим профилем (AUC)) почти не изменяются.

Таблица 3. Фармакокинетические характеристики фторхинолонов при многократном приеме [25].

Фторхинолон	Биодоступность <sup>п</sup> , %	Доза, мг	$C_{max}$ , мг/л	$t_{max}$ , мин	$t_{1/2}$ , ч	AUC <sub>12</sub> , мг/мл × ч	AUC <sub>24</sub> , мг/мл × ч
Ципрофлоксацин	55 – 88	500 <sup>п</sup>	2,3	90	2,5	9,6	-
		400 <sup>в</sup>	4,6	-	3,5	12,9	-
Левифлоксацин	95	500 <sup>п</sup>	5,7	66	6,8	-	47,5
		500 <sup>в</sup>	6,4	-	6,8	-	64,6
Моксифлоксацин	86	400 <sup>п</sup>	4,5	-	12,0	-	48

<sup>п</sup> – препарат введен перорально, <sup>в</sup> – препарат введен внутривенно.

По сравнению с ципрофлоксацином третье и четвертое поколения ФХ имеют более длительный период полураспада и более высокую биодоступность, благодаря чему возможно однократное ежедневное применение препарата. Однако восприимчивость бактериальных организмов к ФХ и их локализация *in vivo* также оказывает влияние на схему приема лекарств. Согласно данным по распределению ФХ в живых организмах, лекарственные молекулы хорошо проникают в кожу, ткани простаты, а также в органы дыхания в концентрациях, превышающих концентрацию в сыворотке крови. ФХ удаляются из организма преимущественно почками в неизменном виде. Однако некоторые ФХ могут подвергаться химической модификации в печени [25].

На сегодняшний день наиболее часто используемые ФХ: ципрофлоксацин, левифлоксацин и моксифлоксацин. Некоторые их антимикробные свойства и фармакокинетические параметры превосходят характеристики других препаратов, используемых в антибактериальной терапии. Так, левифлоксацин и моксифлоксацин демонстрирует лучшую активность против *U.urealyticum* по сравнению с азитромицином и эритромицином [26]. Кроме того, согласно исследованиям [27] концентрация в плазме крови левифлоксацина превышает концентрацию азитромицина в течение 24 часов после введения препарата внутривенно.

ФХ активны в отношении широкого спектра патогенных организмов *in vitro* и демонстрируют эффективность терапии *in vivo*. Однако терапия с применением ФХ также связана с некоторыми рисками.

ФХ способствуют возникновению различных побочных эффектов. Наиболее часто терапия ФХ сопровождается возникновением расстройства желудочно-кишечного тракта (диарея, диспепсия, тошнота) и нарушением центральной нервной системы (состояния беспокойства и нервозности, бессонница, судороги). Реже наблюдаются нарушения в сердечно-сосудистой и костно-мышечных системах, работе почек, а также кожные высыпания [28].

Для некоторых представителей ФХ были зафиксированы редкие, но серьезные побочные эффекты: гемолитический уремический синдром, гепатотоксичность, гипогликемия, выраженная фототоксичность. Так, в исследованиях у 2/3 пациентов, принимавших темафлоксацин, развилась почечная недостаточность, а у 1/2 были обнаружены изменения в гепатобилиарной системе. Частота возникновения побочных эффектов для темафлоксацина в постклинических исследованиях составляла 1 на 3500 пациентов, в то время как ципрофлоксацин показывал значительно меньшее значение для 280 млн. пациентов. В результате темафлоксацин был отозван с фармацевтического рынка спустя полгода после одобрения Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) [29].

Для многих лекарственных препаратов существует зависимость влияния дозы на риск возникновения побочных эффектов. Оценка данной зависимости для ФХ осложнена тем, что схема приема каждого ФХ часто формируется индивидуально в зависимости от анамнеза [30]. Однако в литературе описаны случаи возникновения побочных эффектов, связанных с передозировкой ФХ [31].

Таким образом, использование ФХ в длительной терапии, например, для лечения тяжелых форм респираторных заболеваний и туберкулеза [1], с применением высоких дозировок может способствовать ухудшению состояния пациента и нарушению комплаентности (соблюдение режима приема лекарств). Выраженность побочных эффектов можно снизить за счет регуляции физико-химических свойств ФХ посредством специальных добавок или разработки высокоэффективных систем доставки.

#### **1.1.4. Методы регуляции физико-химических свойств фторхинолонов**

Перспективным подходом к улучшению эффективности действия существующих препаратов является регуляция их физико-химических свойств посредством использования различных добавок или систем доставки. Так, инкапсулирование лекарства в различные носители может способствовать изменению фармакокинетики лекарства, степени его адсорбции и распределения в организме, метаболизма, продолжительности терапевтического эффекта, а также степени токсичности. Кроме того, возможно осуществить доставку в целевой орган и достигнуть локальной терапевтической концентрации в заданное время [32].

Одним из подходов к регуляции свойств ФХ является получение металлокомплексов лекарственных молекул с различными ионами переходных металлов ( $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и др.) [33–35]. Описанные металлокомплексы характеризуются различной стехиометрией и геометрией, обладают улучшенным антибактериальным действием по сравнению со свободным препаратом. Усиление антибактериальной активности, как считают авторы [34,36], связано со снижением полярности иона металла из-за частичного распределения заряда и возможной делокализацией  $\pi$ -электрона по хелатному кольцу, что усиливает липофильный характер иона металла, и впоследствии может способствовать проникновению через липидный слой клеточной мембраны. Однако вследствие высокой токсичности некоторых металлов данный подход не нашел широкого применения.

Чаще всего используются различные биосовместимые носители, которые характеризуются низкой иммуногенностью и высоким процентом включения лекарства в систему доставки. Таким требованиям отвечают липидные системы, природные олигомеры и полимеры, а также некоторые синтетические высокомолекулярные соединения.

В литературе описаны липидные формы ФХ различного состава [37,38]. Наибольшую популярность среди липидных систем имеют липосомы – сферические везикулы, образованные из ионогенных поверхностно-активных веществ (как правило, фосфолипидов). Благодаря различным методам получения липосом и использованию специфических добавок, возможно увеличение степени включения ФХ в везикулы до 90% (по сравнению с добавленным) [37,39,40]. Загрузка ФХ внутрь липосом обуславливает замедленное высвобождение препарата [41], кроме того возможно снижение значений МИК [39]. Однако липосомы являются нестабильными системами, для которых необходимо использовать стабилизирующие агенты [42]. Также одним из недостатков липосом является ограниченность способов введения в организм.

Среди синтетических биodeградируемых полимеров в качестве систем доставки ФХ в основном используются сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) [43]. По сравнению с липосомальными системами PLGA характеризуется вариабельностью способов введения в организм (внутривенно, перорально, ингаляционно и др. [44]). Так, в работе [45] были получены PLGA частицы, загруженные левофлоксацином, в качестве офтальмологической лекарственной формы. По сравнению со свободным ФХ система характеризовалась пролонгированным действием, более длительной ретенцией и лучшей переносимостью на роговице в месте нанесения препарата.

Авторы [46] исследовали систему PLGA-левофлоксацин *in vivo* (на мышах) в качестве пероральной формуляции. Свободный левофлоксацин полностью удаляется из организма в течение 24 часов, в то время как система доставки увеличила время циркуляции лекарства в плазме крови до четырех дней. Кроме того, частицы PLGA-левофлоксацин не показали каких-либо существенных побочных эффектов у мышей. Однако, несмотря на все достоинства синтетических полимеров, важно отметить, что для них характерна высокая стоимость, а также невысокая эффективность загрузки [45,47].

Наиболее привлекательными являются системы доставки на основе природных полимеров и олигомеров. Неоспоримым преимуществом природных соединений является их доступность и биосовместимость. В литературе описаны различные нано-, микро-частицы и гели на основе декстрана, хитозана, альгинатов и др., загруженные ФХ [47]. Однако на сегодняшний день все больше внимания привлекают комбинированные системы, которые состоят из нескольких полимерных носителей и обладают преимуществами каждого компонента [48,49]: так, хитозан обладает двухэтапным профилем высвобождения лекарственного препарата [50], а также мукоадгезивными свойствами, что обуславливает повышение степени всасываемости лекарственного препарата через слизистые [51]; пектин может придать системе замедленное высвобождение препарата в кислых средах [52]. Авторы [49] получили полимерные пленки посредством модификации бактериальной целлюлозы высокометоксилированным пектином (степень этерификации –COOH групп составляет более 60%). Введение пектина способствовало увеличению степени включения левофлоксацина в систему доставки (в 2 раза), а также обуславливало значительное замедление высвобождения лекарства.

Разнообразие физико-химических свойств и вариабельность параметров выделяют природные полимеры среди других систем доставки. Однако в связи с высокими значениями молекулярной массы и различиями состава соединений в зависимости от источника получения для них также характерны сложности при очистке и стандартизации [53]. Поэтому все больше внимания привлекают природные олигомерные носители, в

частности, семейство циклических олигомеров глюкозы – циклодекстринов, которые могут образовывать комплексы включения типа «гость-хозяин» с гидрофобными лекарственными молекулами, тем самым улучшая физико-химические свойства препарата. Кроме того, модификация природных циклодекстринов позволяет придать системе необходимые свойства [54,55].

Выбор метода регуляции свойств ФХ обусловлен рядом факторов (Таблица 4). Помимо доступности носителя необходимо учитывать методическую сложность получения лекарственной формы и ее стабильность при хранении. Кроме того, важными характеристиками являются способ введения в организм и вариабельность параметров носителя с целью регуляции физико-химических свойств лекарственного препарата.

Таблица 4. Сравнение различных подходов к регуляции физико-химический свойств фторхинолонов [33,34,37,47].

	Металло-комплексы	Полисахариды	Циклодекстрины	Синтетические полимеры	Липидные системы
Стоимость	Средняя	Низкая	Низкая	Высокая	Высокая
Сложность получения	Средняя	Средняя	Низкая	Высокая	Высокая
Стабильность при хранении	Средняя	Средняя	Высокая	Высокая	Низкая
Биосовместимость	Низкая	Высокая	Высокая	Средняя	Высокая
Биодеградируемость	Низкая	Высокая	Высокая	Средняя	Высокая
Эффективность загрузки*	-	До 90%	До 90%	15-85%	До 90%
Токсичность	Высокая	Низкая или отсутствует	Низкая или отсутствует	Средняя	Низкая или отсутствует
Возможность регуляции свойств	Низкая	Возможна	Возможна	Возможна	Возможна

\* - 100% соответствует включению всего добавленного фторхинолона в систему доставки

Всем вышеупомянутым критериям соответствуют циклодекстрины, для которых характерны разнообразные способы введения в организм, высокая степень загрузки и возможность регуляции свойств носителя.

## 1.2. Системы доставки лекарственных препаратов на основе циклодекстринов

Циклодекстрины (ЦД) принадлежат к семейству природных и синтетических циклических олигосахаридов, состоящих из D-глюкопиранозных звеньев, соединенных между собой  $\alpha(1-4)$  гликозидными связями. Существует три типа природных ЦД, состоящие из шести, семи или восьми звеньев (n):  $\alpha$ -ЦД,  $\beta$ -ЦД и  $\gamma$ -ЦД соответственно (Рисунок 3).

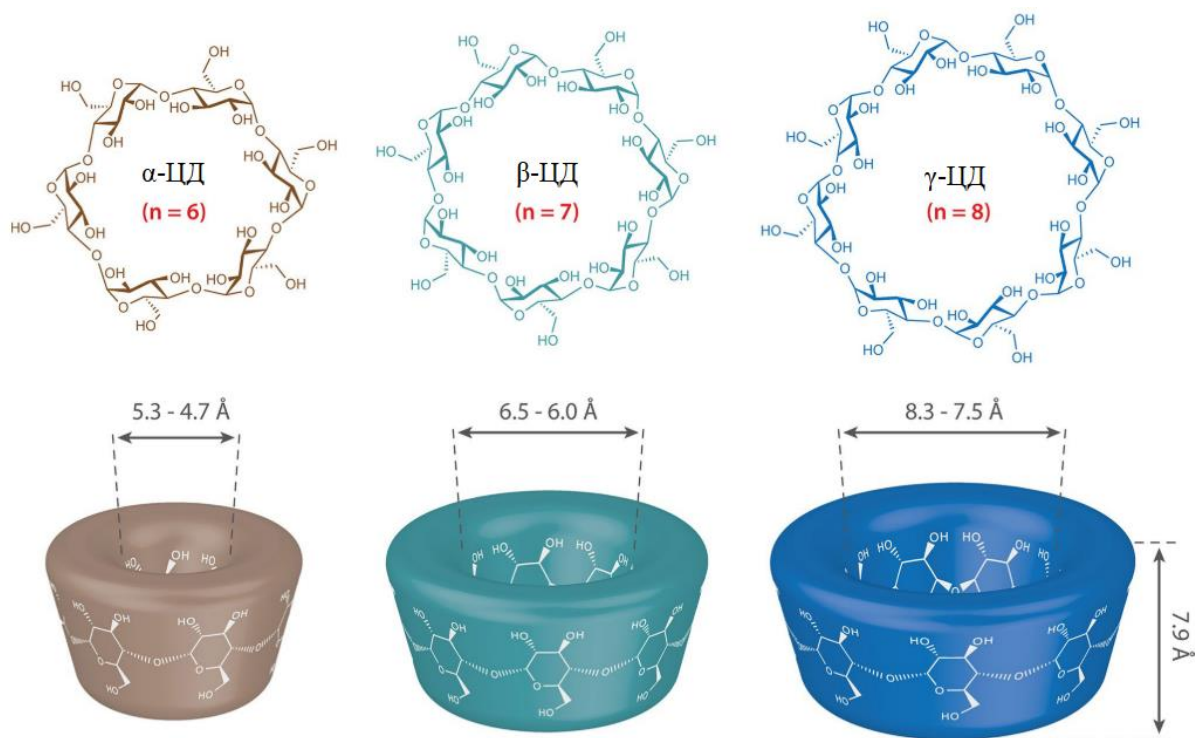


Рисунок 3. Химические и пространственные структуры  $\alpha$ -циклодекстрина,  $\beta$ -циклодекстрина и  $\gamma$ -циклодекстрина [56].

В молекуле ЦД шестичленные гетероциклы находятся в конформации  ${}^4C_1$ -кресло. Вследствие затруднительного вращения звеньев относительно друг друга молекулы ЦД имеют форму «усечённого конуса» или «тора». Подвижные первичные гидроксильные группы располагаются со стороны меньшего диаметра тора и способны к частичному блокированию внутренней полости ЦД. Вторичные гидроксильные группы расположены со стороны бóльшего диаметра и участвуют в поддержании формы ЦД за счет формирования сети водородных связей с  $-OH$  группами соседних D-глюкозных звеньев. Вследствие особенностей строения и большого количества гидроксильных групп ЦД имеют внешнюю гидрофильную поверхность и внутреннюю гидрофобную полость, объем которой зависит от количества D-глюкозных звеньев [56].

Природные ЦД являются продуктами ферментативной деградации крахмала, амилозы и других полисахаридов. Гидролиз связей вблизи разветвлений цепей

биополимеров сопровождается внутримолекулярной циклизацией под действием гликозилтрансферазы. В промышленном производстве ЦД используются ферменты CGTase и  $\alpha$ -амилаза, полученные из бактерий рода *Bacillus* [57]. В связи со стерическими затруднениями в структуре олигосахаридов образование ЦД с количественным выходом возможно в узком диапазоне числа D-глюкопиранозных звеньев: от 6 до 8.

Природные ЦД имеют невысокую растворимость в воде: 145, 18,5 и 232 мг/мл для  $\alpha$ -ЦД,  $\beta$ -ЦД и  $\gamma$ -ЦД соответственно [58]. Таким образом, олигосахариды менее растворимы в воде, чем линейные и разветвленных декстрины, что обусловлено образованием внутримолекулярных водородных связей между вторичными –ОН группами. Это особенно характерно для  $\beta$ -ЦД, обладающим наименьшей растворимостью, по-видимому, за счет оптимальной геометрии для формирования большого количества внутримолекулярных Н-связей. Кроме того, невысокая растворимость ЦД обусловлена относительно сильным связыванием молекул в кристаллическом состоянии (относительно высокой энергией кристаллической решетки) [59]. При увеличении температуры растворимость ЦД в воде увеличивается: в среднем на каждые 5<sup>o</sup>C на 40-70 мг/мл для  $\alpha$ -ЦД и  $\gamma$ -ЦД и на 5-10 мг/мл для  $\beta$ -ЦД (в диапазоне от 20 – 50<sup>o</sup>C) [60].

Для улучшения физико-химических свойств ЦД, в том числе их растворимости, а также расширения сферы применения ЦД, на сегодняшний день получают производные ЦД вследствие модификации гидроксильных групп природных ЦД. Всего известно более 10 тысяч различных производных ЦД, различающихся по химической природе (полярные, неполярные, заряженные) и размеру заместителя (Рисунок 4).

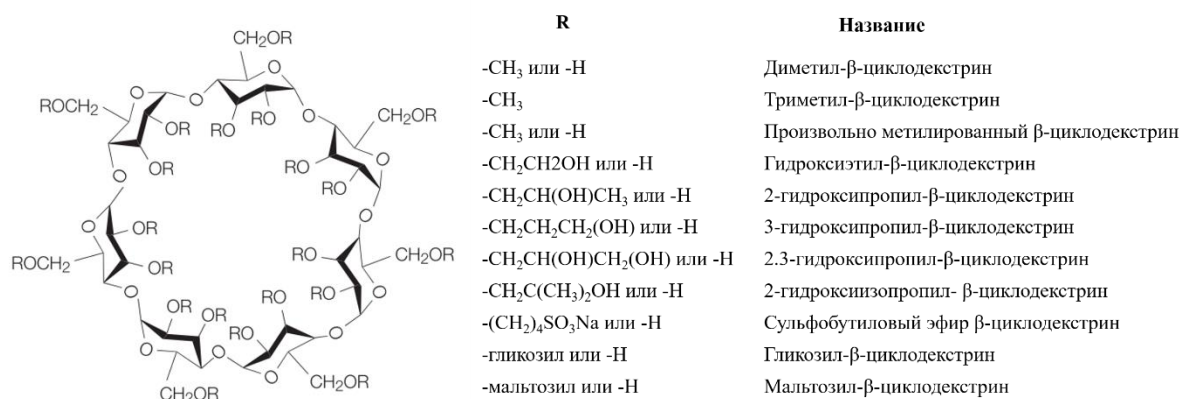


Рисунок 4. Примеры производных  $\beta$ -циклодекстрина [61].

Синтез производных ЦД происходит за счет модификации гидроксильных групп. Поскольку -ОН группы являются нуклеофилами, реакция протекает через электрофильную

атаку различными агентами, среди которых наиболее часто используются алкилы, галогенангидриды, изоцианаты [55,62]. Селективное замещение циклодекстринов затруднительно вследствие конкуренции гидроксильных групп. Наиболее доступными являются первичные –ОН группы у С-6 атомов D-глюкопиранозных звеньев. Модификация по вторичным группам происходит при защите первичных –ОН или при высоких концентрациях модифицирующего агента. Как правило, получают монозамещенные ЦД или замещенные случайным образом. В среднем степень замещения в одном D-глюкопиранозном звене ЦД составляет от 0,5 до 2 [55,63].

Введение заместителей в молекулу ЦД способствует расширению сферы их применения, поскольку новая функциональная группа приводит к изменению физико-химических свойств ЦД: растворимости, типа кристаллической решетки, размера гидрофобной полости и др. Так, метилированный β-ЦД характеризуется бóльшей растворимостью (Таблица 5) и размером гидрофобной полости, чем природный β-ЦД. Основная причина повышения растворимости (даже при введении гидрофобных заместителей) заключается в том, что заместитель переводит ЦД из кристаллического состояния в аморфную смесь изомерных производных [59]. Заместитель также может принимать участие в молекулярном узнавании, что важно при разработке новых селективных сорбентов и адресных систем доставки лекарств.

Таблица 5. Растворимость природных и некоторых производных циклодекстринов [54,59,64].

<b>Циклодекстрины и их производные</b>	<b>Растворимость в воде, мг/мл 25°C</b>
<b>α-ЦД</b>	<b>145</b>
Триметил-α-циклодекстрин	200
<b>β-ЦД</b>	<b>18,5</b>
Триметил-β-циклодекстрин	310
Произвольно метилированный-β-циклодекстрин	>500
2-гидроксипропил-β-циклодекстрин	>600
Сульфобутиловый эфир-β-циклодекстрин	>500
<b>γ-ЦД</b>	<b>232</b>
Гидроксипропил-γ-циклодекстрин	>500
Триметил-γ-циклодекстрин	480



### 1.2.1. Образование комплексов типа «гость-хозяин» с циклодекстринами

Подобно другим макроциклам (краун-эфирам [65], каликсаренам [66], кукурбитурилам [67] и пиллараренам [68]) ЦД способны образовывать комплексы с другими веществами посредством помещения всей молекулы или ее фрагмента во внутреннюю полость ЦД. Процесс не сопровождается разрушением или образованием ковалентных связей [69], такие комплексы относят к нековалентным комплексам включения типа «гость-хозяин».

Образование комплекса является энергетически выгодным процессом, поскольку из полости ЦД высвобождаются молекулы воды, что приводит к увеличению энтропии системы (Рисунок 5). Возникновение гидрофобных взаимодействий между «гостем» и полостью ЦД, приводит к снижению деформаций D-глюкопиранозных звеньев ЦД и способствует более выгодному энергетическому состоянию включаемой молекулы. Заместитель ЦД также может участвовать в формировании дополнительных взаимодействий с «гостем» (гидрофобные, электростатические, Ван-дер-Ваальсовы и водородные связи) [70,71].

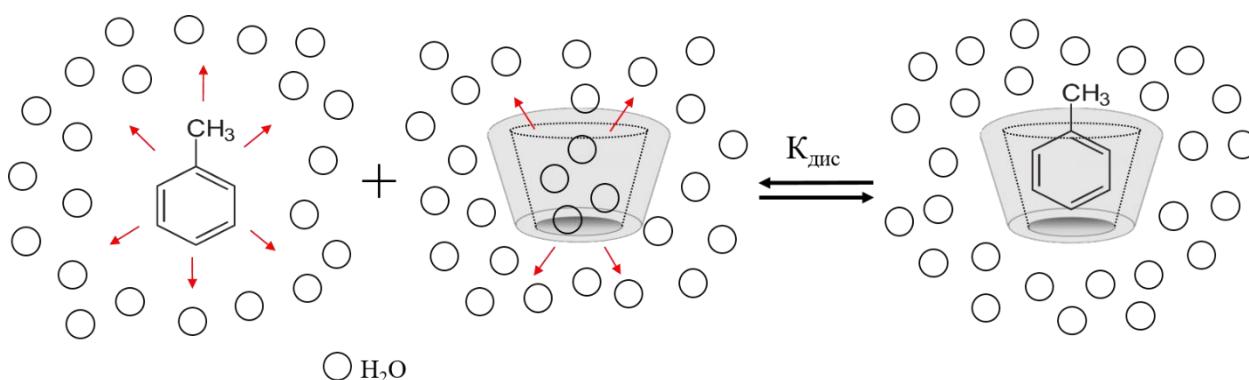


Рисунок 5. Высвобождение молекул воды из полости ЦД при образовании комплекса «гость-хозяин» с толуолом.

Процесс образования комплекса представляет собой равновесную систему, которая характеризуется константой связывания или константой диссоциации ( $K_{\text{дис}}$ ). Время достижения равновесия зависит от условий образования комплекса, а также необходимых конформационных изменений и количества формируемых взаимодействий между «гостем» и «хозяином» [70].

Сила взаимодействий между «гостем» и «хозяином» зависит от нескольких факторов, в первую очередь от соответствия размера неполярного фрагмента «гостя» объему липофильной полости ЦД. Поскольку глубина полости ( $\sim 8 \text{ \AA}$ ) является одинаковой

для всех ЦД, выбор соответствующего лиганда обусловлен количеством D-глюкопиранозных звеньев.

$\alpha$ -ЦД с наименьшим объемом полости образует комплексы в основном с веществами небольшого размера [72];  $\beta$ -ЦД включает в гидрофобную полость более крупные органические вещества с ароматическими фрагментами, в том числе и малые лекарственные молекулы (эвгенол [73], гемфиброзил [74], пиностробин [75] и др.);  $\gamma$ -ЦД образует комплексы с более крупными органическими молекулами, например, стероидами. Известно, что ЦД образуют комплексы с большим количеством как неорганических, так и органических веществ с линейной и разветвленной структурой [70].

Помимо стерических факторов, значительное влияние на  $K_{\text{дис}}$  оказывает количество и природа дополнительных взаимодействий между «гостем» и «хозяином» [70,71,76].

Комплексы могут образовываться как в растворе, так и при смешивании сухих реагентов [77]. Чаще всего комплексы получают смешением водных растворов, поскольку данный метод является наиболее простым. Кроме того, в данных условиях наибольшее число молекул ЦД доступно в качестве лиганда. Для получения комплексов в виде порошка используется выпаривание растворителя, сублимация, сушка в печи, лиофильная сушка, а также сверхкритические флюидные технологии [70,71,78].

При низкой растворимости «гостя» в воде или невысокой эффективности комплексообразования требуются относительно высокие концентрации ЦД. Для решения этой проблемы возможно использование различных дополнительных веществ: хлорида натрия, буферных солей, поверхностно-активных веществ и органических растворителей. Однако в зависимости от физико-химических свойств добавок и их концентрации наблюдается разное влияние на эффективность комплексообразования. Например, этанол и пропиленгликоль снижают эффективность образования комплексов ЦД с тестостероном и ибупрофеном в водных растворах в низких концентрациях, действуя в качестве конкурирующих молекул «гостя» [79].

В зависимости от особенностей структуры и размера молекулы «гостя» возможно образование комплексов ЦД с различным мольным соотношением (Рисунок 6). Как правило, комплекс представляет собой один тор ЦД с помещенным в его полость молекулой «гостя» или ее фрагмента. Однако также существуют комплексы других составов: в один тор ЦД может помещаться несколько низкомолекулярных веществ, а для высокомолекулярных соединений, наоборот, на одну молекулу «гостя» может приходиться несколько молекул ЦД [70].

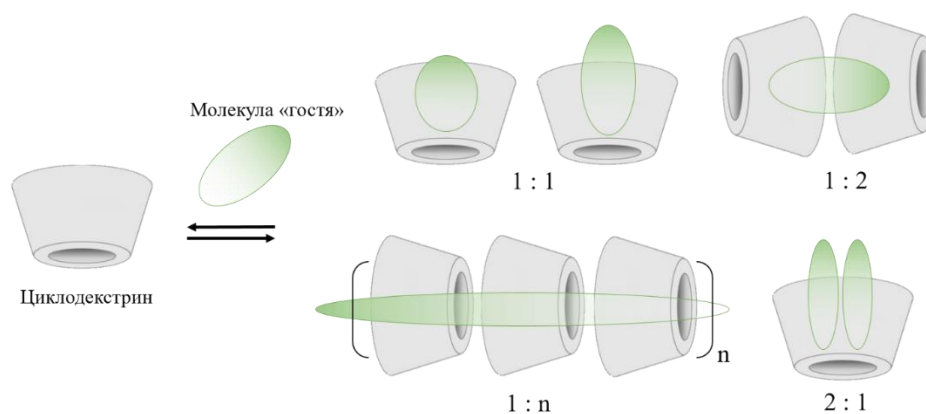


Рисунок 6. Образование комплексов циклодекстринов с молекулами «гостя» различного состава.

Важно отметить, что образование комплекса является равновесным процессом, поэтому в растворе одновременно присутствуют и свободные молекулы «гостя» и ЦД. Помимо комплексообразования, отдельные молекулы могут также принимать участие в образовании связей вне полости ЦД. Так, было показано связывание дикарбоновых кислот и лекарственных молекул гидроксильными группами ЦД через водородные связи, т.е. в растворе наблюдается одновременное сосуществование двух форм взаимодействия (образование комплекса и взаимодействия вне полости при участии заместителей ЦД). Кроме того, наличие взаимодействий вне полости ЦД подтверждаются данными, полученными при исследовании физико-химических свойств молекул «гостя» в присутствии линейных аналогов ЦД [58,80].

Включение вещества в полость ЦД в значительной степени влияет на физические и химические свойства «гостя». В первую очередь, наблюдается значительное увеличение растворимости «гостя». Поскольку многие лекарственные препараты имеют низкую растворимость, ЦД активно используется в фармацевтической промышленности для разработки лекарственных формуляций. Кроме того, включение в полость ЦД приводит к увеличению стабильности веществ относительно окисления и действия УФ-излучения, температуры и биodeградации. Известно, что ЦД также способствуют снижению летучести веществ, маскированию горьких вкусов и запахов [64,70].

Таким образом, ЦД имеют широкое применение в различных сферах деятельности человека: аналитической химии, сельском хозяйстве, пищевой и текстильной промышленности, а также в медицине (Таблица 6).

Таблица 6. Использование циклодекстринов в различных сферах длительности человека [56,70].

Сфера применения	Цель использования циклодекстринов
Аналитическая химия	Селективные сорбенты изомеров и энантиомеров Адсорбенты отходов производств Адсорбенты загрязняющих веществ
Косметика и личная гигиена	Повышение стабильности ингредиентов Уменьшение летучести парфюмерии, комнатных освежителей, моющих средств за счет медленной диссоциации комплексов
Текстильная промышленность	Отделка текстильных материалов (крашение, белиние и др.) для улучшения защиты от УФ-лучей
Пищевая промышленность	Маскирование горького вкуса и запахов Удаление холестерина из молока, масла, яиц для продуктов с низким содержанием жиров Стабилизация эмульсий
Сельское хозяйство	Замедленное высвобождение инсектицидов, гербицидов и регуляторы роста в почве

В последнее время ЦД также активно используются в органическом синтезе для получения новых перспективных материалов или регуляции физико-химических свойств существующих веществ. Так, возможно получение разнообразных привитых полимеров (графт полимеров) с участием ЦД. В работе [81] авторы провели модификацию хитозана молекулами  $\beta$ -ЦД (Рисунок 7).

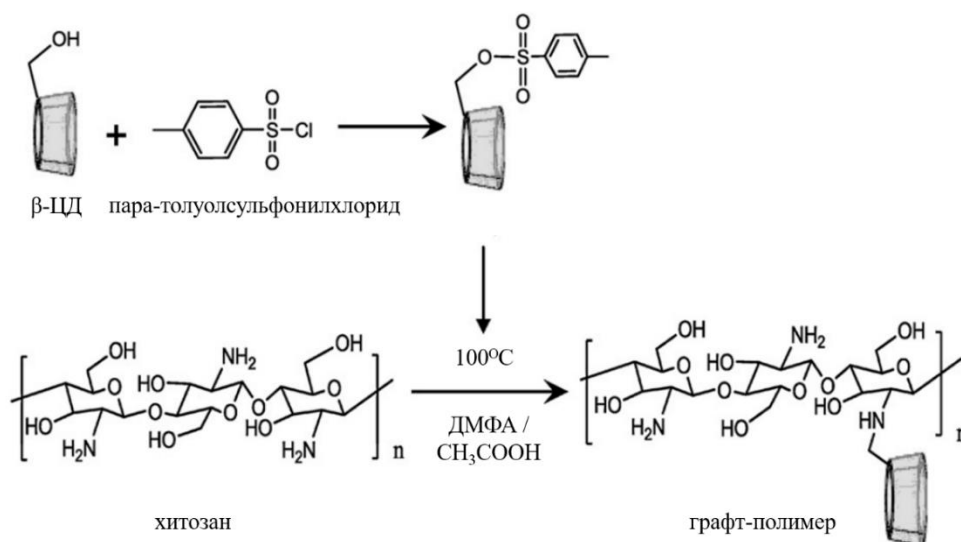


Рисунок 7. Схема синтеза привитого полимера при модификации хитозана  $\beta$ -циклодекстрином [81].

Полученные соединения характеризовались различной степенью замещения, а также более высокой стабильностью и степенью включения кетопрофена (на 20%) по сравнению с немодифицированным хитозаном.

Кроме того, ЦД используются для получения новых материалов. Авторы [82] модифицировали  $\alpha$ -ЦД линейными и разветвленными цепями олигоэтиленimina различной длины. Полученные «звездчатые» структуры могут связываться с плазмидной ДНК с образованием наночастиц 100-200 нм. Синтез наночастиц приводит к повышению эффективности трансфекции генов в эукариотические клетки HEK293 и Cos7, что указывает на перспективность таких систем в качестве высокоэффективных векторов доставки генов с низкой цитотоксичностью.

На сегодняшний день получен широкий спектр материалов, содержащих ЦД, с различной супрамолекулярной архитектурой: наночастицы, мицеллы и нановезикулы. Активным направлением является получение олигомеров и полимеров, где ЦД используется в качестве основного мономера [56]. Подробнее наиболее значимые соединения будут рассмотрены далее.

### **1.2.2. Методы исследования термодинамических параметров стабилизации комплексов «гость-хозяин» с циклодекстринами**

При изучении системы «гость-хозяин» используются различные аналитические методы, позволяющие исследовать состояние молекулы «гостя». Комплексы характеризуют константой диссоциации, стехиометрией и пространственной структурой.

Наиболее распространенным типом комплекса ЦД является система в мольном соотношении 1:1, т.е. одна молекула «гостя» (М) образует комплекс (ЦД – М) с одной молекулой циклодекстрина. При этом молекулы ЦД рассматриваются, как независимые идентичные центры связывания. Такой равновесный процесс можно представить в виде:



По сравнению со свободным состоянием молекула «гостя» изменяет свое микроокружение в комплексе с ЦД, что обуславливает изменение различных физико-химических свойств «гостя», таких как растворимость, реакционная способность, химическая и биологическая стабильность, а также проницаемость через искусственные и биологические мембраны. Большинство методов определения значений  $K_{\text{дис}}$  комплекса основаны на титровании «гостя» различными концентрациями ЦД и последующим анализе изменений химического или физического свойства включаемой молекулы (Таблица 7).

Таблица 7. Некоторые комплексы циклодекстринов, их параметры и методы исследования.

Циклодекстрин	Молекула «гостя»	Стехиометрия комплекса	Метод исследования стехиометрии комплекса	$K_{дис}$ , М	Метод определения $K_{дис}$	Расчёт $K_{дис}$	Ссылка
$\alpha$ -ЦД	Бутил изотиоцианат	1:1	ЯМР	-	-	-	[83]
$\beta$ -ЦД	Ибупрофен	2:3	-	$9,3 \times 10^{-5}$	УФ	Уравнение Бенеши-Гильдельбранда	[84]
	Ванилин	1:1	ЯМР	$1,1 \times 10^{-2}$	ЯМР	-	[85]
	Флуконазол	1:1	-	$1,5 \times 10^{-2}$	ЯМР	Уравнение Скотта	[86]
	Рокурония бромид	1:1	Остромысленского-Жоба	$3 \times 10^{-4}$	ЯМР	Уравнение Бенеши-Гильдельбранда	[87]
	Телмисартан	1:2	Р*	$1,4 \times 10^{-3}$	Р*	Р*	[88]
	5-амино-6-метил-2-бензимидазол	1:1	Остромысленского-Жоба	$3,9 \times 10^{-4}$	Флуоресценция	-	[89]
Гидроксипропил- $\beta$ -ЦД	Офлоксацин	1:1	Остромысленского-Жоба	$9,7 \times 10^{-5}$	УФ	Уравнение Бенеши-Гильдельбранда	[90]
	Телмисартан	1:2	Р*	$4,2 \times 10^{-4}$	Р*	Р*	[88]
	Дарифенацин	1:1	Р*	$2,1 \times 10^{-3}$	Р*	Р*	[91]
Метил- $\beta$ -ЦД	5-амино-6-метил-2-бензимидазол	1:1	Остромысленского-Жоба	$5,7 \times 10^{-4}$	Флуоресценция	-	[89]
$\gamma$ -ЦД	Рокурония бромид	1:1	Остромысленского-Жоба	$5 \times 10^{-5}$	ЯМР	Уравнение Бенеши-Гильдельбранда	[87]
	Амилсуприд	1:1	Остромысленского-Жоба	$8,5 \times 10^{-4}$	УФ	Уравнение Бенеши-Гильдельбранда	[92]
Меркаптопропионат $\gamma$ -ЦД (Org 25969)	Рокурония бромид	1:1	Остромысленского-Жоба	$\sim 10^{-5}$	ЯМР	Уравнение Бенеши-Гильдельбранда	[87]

Р\* - определение стехиометрии и  $K_{дис}$  комплекса рассчитывалось из кривой растворимости по формуле (2).

Одним из таких аналитических подходов является метод фазовой растворимости, описанный Хигучи и Коннорсом [93]. Так, при исследовании влияния образования комплекса на растворимость «гостя» строится кривая зависимости растворимости «гостя» от концентрации ЦД. Далее для расчётов  $K_{\text{дис}}$  используется следующее уравнение:

$$K_{\text{дис}} = \frac{\text{tg}\alpha}{S_0(1 - \text{tg}\alpha)} \quad (2)$$

где  $\text{tg}\alpha$  – тангенс угла наклона кривой,  $S_0$  – это растворимость свободного «гостя».

Однако чаще всего используют спектроскопические методы анализа свойств «гостя»: поглощение в УФ- и видимой области, а также эмиссию флуоресценции. Так, в работах [90,94] было показано, что образование комплексов офлоксацина с ЦД приводит к увеличению интенсивности флуоресценции и поглощения в УФ-области лекарства. При увеличении концентрации ЦД данные изменения становятся более выраженными с выходом на плато при высоких концентрациях ЦД. Анализ полученных зависимостей позволяет рассчитать  $K_{\text{дис}}$ .

Для обработки полученных экспериментальных данных, как правило, используют уравнение Бенеши-Гильдельбранда [90,92,95,96]:

$$\frac{1}{(I - I_0)} = \frac{K_{\text{дис}}}{(I_\infty - I_0)[\text{ЦД}]} + \frac{1}{(I_\infty - I_0)} \quad (3)$$

где  $I_0$  – значение интенсивности поглощения (или флуоресценции) «гостя» в отсутствие ЦД;  $I$  и  $I_\infty$  – интенсивности поглощения (или флуоресценции) «гостя» при определенной концентрации ЦД ( $[\text{ЦД}]$ ) и при выходе значений  $I$  на плато соответственно. Линеаризация уравнения в координатах  $1/(I - I_0)$  от  $1/[\text{ЦД}]$  позволяет определить  $K_{\text{дис}}$  по тангенсу угла наклона. Некоторые авторы предпочитают использовать уравнение Скотта, которое является модификацией уравнения Бенеши-Гильдельбранда [86,97].

Для определения значения  $K_{\text{дис}}$  возможно также применение линеаризационной модели в координатах Скэтчарда [98,99], которая также является распространенным методом определения  $K_{\text{дис}}$ :

$$\frac{[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}}{[\text{ЦД}]_{\text{свободный}}} = \frac{n}{K_{\text{дис}}} - \frac{[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}}{K_{\text{дис}}} \quad (4)$$

где параметр  $n$  указывает на количество независимых сайтов связывания. Значение  $K_{\text{дис}}$  определяют при построении графика в координатах  $[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}/[\text{ЦД}]_{\text{свободный}}$  от  $[\text{ЦД}]_{\text{связанный}}$ . При образовании комплекса 1 : 1 прямая пересекает ось абсцисс в 1 ( $n=1$ ). Возможно и отклонение от линейной зависимости (более сложной схемы комплексообразования, чем один «хозяин» - один «некооперативный «гость»»).

Таким образом, обработка данных в координатах Скэтчарда не только позволяет получить значение  $K_{дис}$ , но и сделать выводы о стехиометрии комплекса.

Наиболее распространенным методом исследования стехиометрии комплексов является метод Остромысленского-Жоба (Таблица 7). Согласно данному методу проводят исследование растворов с различными мольными соотношениями «гостя» и «хозяина» при постоянной суммарной концентрации компонентов. При образовании комплекса наблюдается максимум физико-химического параметра при исследуемом стехиохимическом соотношении. Так, для комплекса 1:1 максимум наблюдается при значении абсциссы 0,5.

### **1.2.3. Методы исследования структуры комплексов циклодекстринов с малыми лекарственными молекулами**

Методы РСА, ЯМР и ИК спектроскопии являются более информативными, чем УФ спектроскопия и флуоресценция, поскольку позволяют более детально исследовать сложные многокомпонентные системы. РСА используется для анализа пространственного расположения и типа упаковки ЦД и их комплексов в кристаллах; спектроскопии ЯМР и ИК предоставляют информацию о состоянии отдельных атомов или функциональных групп как молекулы «гостя», так и лиганда. Таким образом, эти методы могут быть применены для получения информации о структуре и механизме комплексообразования.

Так, в работе [100] показано что ИК-спектр смеси глабридина (изофлаavin, обладающий противовоспалительным и антиоксидантным действием) с производным ЦД отличается от ИК-спектра комплекса: в отличие от физической смеси в ИК-спектре комплекса наблюдается отсутствие полос поглощения  $1520\text{ см}^{-1}$  и  $1480\text{ см}^{-1}$ , соответствующие поглощению ароматического фрагмента «гостя», что указывает на погружение данного фрагмента в полость производного ЦД.

На основании изменений в положениях полос в ИК- и ЯМР- спектрах свободной ионной жидкости (1-децил-3-тетрафторборат метилимидазолия) и ее комплекса с  $\beta$ -ЦД авторы [96] показали, что «гость» заглубляется в полость лиганда алифатическим концом, при этом возможно образование Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и водородных связей между гетероциклом «гостя» и вторичными –ОН группами  $\beta$ -ЦД.

В последнее время также все больше внимания привлекают к себе методы компьютерного моделирования, которые позволяют визуализировать структуры комплексов и оценить термодинамические параметры систем, например, общую



потенциальную энергию и энергии различных типов межмолекулярных взаимодействий [101].

С помощью методов компьютерного моделирования также можно сделать предположения о причинах в различии стабильности комплексов. Так, авторы [102] провели молекулярную динамику комплексов гидроксипропил- $\beta$ -ЦД и сульфобутилового эфира- $\beta$ -ЦД с 2-(2-нитровинил)фураном в водной капле. Было показано, что молекула «гостя» может загибаться в полость ЦД ароматическим фрагментом как со стороны меньшего, так и со стороны большего диаметра лиганда. Кроме того, 2-(2-нитровинил)фуран имеет возможность вращения вдоль своей оси в полости ЦД. При этом наблюдаются «флуктуационные» (относительно нестабильные) гидрофобные взаимодействия между «гостем» и различными D-глюкопиранозными звеньями ЦД. Подвижность 2-(2-нитровинил)фурана в полости производных ЦД, по-видимому, обусловлена небольшим размером молекулы, которая не «плотно» локализована в полости ЦД и, кроме того, небольшим объемом «гостя» не препятствует взаимодействию молекул воды с полостью ЦД и его заместителями. Вследствие подвижности «гостя» комплексы характеризуются относительно высокими значениями экспериментально полученных констант связывания: 48,7 и 79,2 М<sup>-1</sup> для гидроксипропил- $\beta$ -ЦД и сульфобутилового эфира- $\beta$ -ЦД соответственно.

Для исследования различий в эффективности комплексообразования «гостя» с двумя разными производными ЦД (почти в 2 раза) авторы также провели моделирование свободных лигандов. Для гидроксипропил- $\beta$ -ЦД отмечено искажение тора вследствие взаимодействия небольших гибких заместителей с полостью ЦД. Такие изменения не наблюдались для сульфобутилового эфира  $\beta$ -ЦД, что, по-видимому, обусловлено высокой гидратацией сульфо- групп, которые отталкиваются друг от друга, не оказывая влияния на форму тора. Таким образом, различия в значениях  $K_{\text{дис}}$  обусловлены доступностью полости ЦД для взаимодействия с «гостем»: небольшие гидроксипропильные заместители блокируют полость ЦД, в то время как сульфобутиловый эфир  $\beta$ -ЦД характеризуется более доступной полостью для образования комплекса.

Особенно информативен метод моделирования для сложных молекул «гостя», например, содержащих несколько гидрофобных фрагментов. В таком случае только на основании значений  $K_{\text{дис}}$  и стехиометрии не всегда возможно установить, каким фрагментом «гость» загибается в полость ЦД.

В работе [95] были получены данные по моделированию комплексов органических лекарственных молекул физетина и гаралдола (флавоноидов, которые обладают антинейродегенеративной и противоопухолевой активностями) с  $\beta$ -ЦД и диметил- $\beta$ -ЦД

(Рисунок 8). Исследовались комплексы двух типов: погружение в полость ЦД флавоноидов «хромофорной» частью (тип I) или фенильным кольцом (тип II). Согласно полученным данным по молекулярной динамике и значениям энергии образования комплексов,  $\beta$ -ЦД преимущественно образует комплексы типа I, а для комплексов с диметил- $\beta$ -ЦД характерен тип II. Такой результат, вероятно, связан с различными энергиями сольватации хромофорных и фенильных групп флавоноидов, а также с различной степенью гидрофобности полостей лигандов.

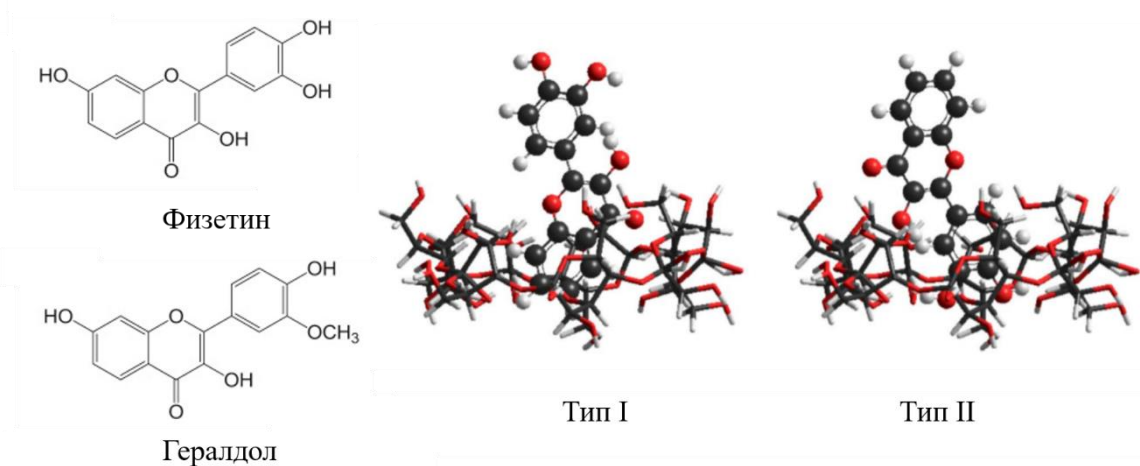


Рисунок 8. Структуры флавоноидов и компьютерные модели их комплексов с  $\beta$ -циклодекстрином и диметил- $\beta$ -циклодекстрином двух типов [95].

Авторы [86] провели молекулярную динамику комплекса флуконазола с  $\beta$ -ЦД в качестве дополнительного метода исследования структуры комплекса. Минимальным значением энергии характеризовался комплекс, в котором *m*-дифторфенильное кольцо флуконазола заглублялось в полость  $\beta$ -ЦД со стороны большего диаметра, при этом триазольные кольца ориентированы в сторону меньшего диаметра тора. Также была обнаружена водородная связь между -ОН группой флуконазола и гидроксильной группой  $\beta$ -ЦД, расположенной у С-3. Данные компьютерного моделирования подтверждают предположения о структуре комплекса, основанные на результатах ЯМР-спектроскопии.

#### 1.2.4. Самоорганизация циклодекстринов и их комплексов

Как и другие олиго – и полисахариды, ЦД склонны к самоорганизации в более крупные системы в водных растворах. Наиболее известным примером самоорганизации молекул ЦД и образования агрегатов является опалесценция водных растворов  $\gamma$ -ЦД с

последующим осаждением, которое происходит даже при низких концентрациях  $\gamma$ -ЦД [103].

В водном растворе система находится в динамическом равновесии с молекулами воды: происходит разрушение и образование водородных связей между гидроксильными группами сахаров и водой. При растворении ЦД каждое D-глюкопиранозное звено в среднем связывает 6 молекул воды, что снижает подвижность молекул растворителя и приводит к увеличению вязкости среды. При низких концентрациях ЦД и других углеводов наблюдается линейная зависимость вязкости раствора от концентрации сахаров, однако при высоких концентрациях зависимость имеет положительное отклонение от линейности вследствие перекрытия гидратационных оболочек углеводов и образования кластеров (Рисунок 9).

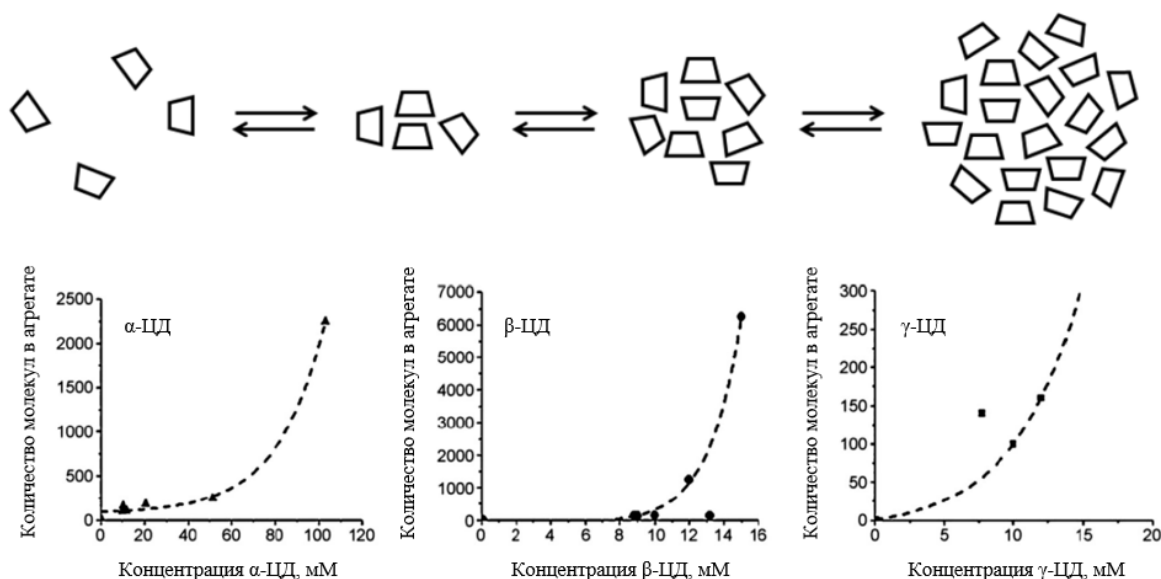


Рисунок 9. Схематическое представление образования агрегатов циклодекстринов в водных растворах и зависимость размеров агрегатов от концентрации и типа циклодекстрина [104,105].

Размер образующихся частиц зависит от типа ЦД и его концентрации. В зависимости от размеров частиц выделяют четыре типа агрегатов ЦД, образующихся в водных растворах (Таблица 8). Важно отметить, что все типы являются неустойчивыми и разрушаются при разбавлении раствора. Низкая стабильность самоорганизующихся структур обусловлена вращательными степенями свободы D-глюкопиранозных звеньев и общей молекулярной подвижностью ЦД. Кроме того, агрегаты стабилизируются слабыми Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями и водородными связями. Неустойчивость самоорганизующихся

структур и сложности в их дифференциации в растворе ограничивают исследования подобных систем.

Таблица 8. Классификация агрегатов циклодекстринов в зависимости от размера частиц [105].

Тип агрегата	Диаметр*, µм	Свойства	Типы циклодекстринов и условия получения агрегатов
Нанокластеры	< 0,5	Неустойчивы, нестабильны, разрушаются при перемешивании и фильтрации	Водные растворы природных ЦД, производных ЦД и их комплексов (ГП-α-ЦД, ГП-β-ЦД, СБЕ-β-ЦД)
Наночастицы	< 0,5	Относительно стабильные частицы, выдерживают центрифугирование и фильтрацию, разрушаются при разбавлении раствора	Водные растворы природных ЦД при низких концентрациях и их комплексы
Микрочастицы	0,5 – 10	Стабильные частицы, которые могут осаждаться из водного раствора	Водные растворы комплексов природных ЦД с плохо растворимыми лекарственными молекулами при высоких концентрациях ЦД
Макрокластеры	> 1000	Крайне неустойчивые скопления молекул, видны визуально, разрушаются при фильтровании	Водные парентеральные растворы, содержащие относительно высокую концентрацию высокорастворимых ЦД (ГП-β-ЦД, γ-ЦД)

\* - агрегаты имеют, как правило, сферическую форму.

Примечательно, что при большом разнообразии семейства ЦД и его комплексов образованные агрегаты характеризуются всего несколькими типами форм и структур. Авторы [106] продемонстрировали образование сферических, ромбовидных, листовидных и «древовидных» агрегатов β-ЦД. Согласно микрофотографиям (ТЕМ) частицы имеют размеры от 20 нм до 1 мкм в зависимости от концентрации и времени перемешивания в растворе. В среднем при концентрации β-ЦД ~ 3 мМ образуются сферические частицы со средним диаметром 6 нм, которые взаимодействуют друг с другом и образуют более крупные агрегаты. При более высоких концентрациях β-ЦД (> 6 мМ) преимущественно

образуются листовидные домены, которые можно преобразовать в волокна и сложенные ламели под действием ультразвука.

Производные ЦД, как правило, менее склонны к агрегации по сравнению с природными ЦД. Однако введение небольшого гидрофобного заместителя, который может встраиваться в полость «соседней» молекулы ЦД, приводит к образованию димеров, спиралей и колец. Формирование определенного типа агрегата зависит от положения гидрофобного заместителя в ЦД. Так, авторы [107] с помощью метода ЯМР-спектроскопии показали, что в зависимости от положения 3-фенил-акриламидного заместителя в ЦД (у С-3 или С-6 атомов D-глюкопиранозных остатков) возможно образование либо колец, либо димеров (Рисунок 10).

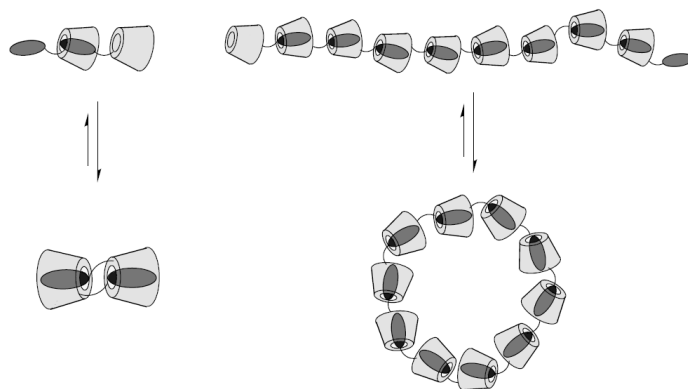


Рисунок 10. Самоорганизация молекул  $\alpha$ -циклодекстрина с 3-фенил-акриламидом в качестве заместителя [107].

Особое внимание привлекают молекулы ЦД с длинными гидрофобными или амфифильными заместителями со стороны большего и/или меньшего диаметра «тора». Синтезированные моно- или полизамещенные конъюгаты представляют собой амфифильные соединения, которые могут самоорганизовываться в растворе с образованием мицеллоподобных структур, слоев Лэнгмюра-Блоджет или бислоев [108].

Образование комплексов «гость-хозяин» увеличивает способность к агрегации как природных ЦД, так и их производных. Например, для высокомолекулярных соединений, используемых в качестве «гостя», наблюдается самоорганизация в супрамолекулярные гидрогели. Большое внимание привлекли псевдополиротаксаны, которые представляют из себя линейную полимерную цепь с несколькими «нанизанными» молекулами ЦД. Водородные связи, образуемые между ЦД, способствуют гелеобразованию, которое можно регулировать под действием различных стимулов, например температуры. Так, для

псевдополиротаксонов на основе полиэтиленгликоля и  $\alpha$ -ЦД были показаны «золь-гель» переходы в водном растворе: нагревание гидрогеля приводит к образованию однородного раствора, а при охлаждении наблюдается образование геля [109].

Исследование агрегатов комплексов низкомолекулярных веществ с ЦД осложнено нестабильностью супрамолекулярных систем. Так, авторы [85] показали, что комплекс ванилина с  $\beta$ -ЦД при высоких концентрациях лиганда (3-65 мМ) образуют димеры и другие олигомерные структуры с константой агрегации  $9,8 \text{ M}^{-1}$ . При этом самоорганизация свободного  $\beta$ -ЦД не была обнаружена. Поскольку константа связывания ванилин- $\beta$ -ЦД почти на порядок выше, чем константа ассоциации, то суммарный процент агрегатов составляет менее 10%.

Если рассматривать механизм самоорганизации ЦД в растворе, как процесс образования зародыша при переходе в кристаллизованное состояние, тогда супрамолекулярная структура агрегатов могла бы быть сходна со структурой ЦД и его комплексов в твердом виде.

При исследовании трехмерной структуры ЦД и его комплексов методом РСА было установлено три основных типа кристаллической упаковки (Рисунок 11).

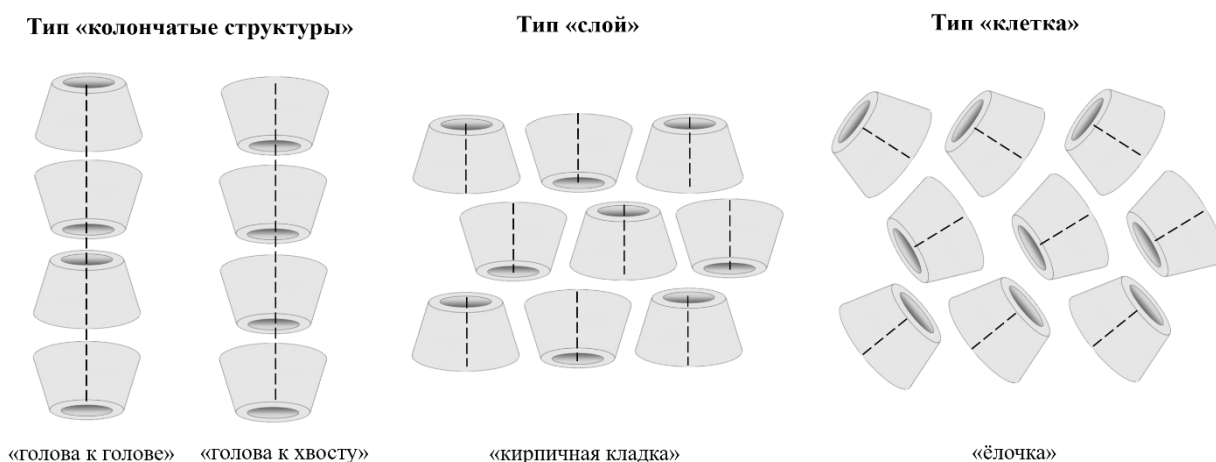


Рисунок 11. Расположение молекул циклодекстрина в различных кристаллических типах упаковки. Пунктиром выделено ось полости циклодекстринов [60,110].

1. Тип «колончатая (channel-type) структура: молекулы ЦД располагаются друг за другом, образуя длинные прямые, зигзагообразные или спиралевидные колонны. Возможно формирование таких структур двух видов: «голова к голове» и «голова к хвосту»; последний реализуется для монозамещенных производных ЦД с небольшим гидрофобным заместителем. В комплексах молекула «гостя» располагается в «бесконечном» туннеле из

полостей ЦД. Если размер «гостя» больше, чем глубина одной полости, то он может быть включен в две и более молекулы ЦД.

2. Тип «клетка» (cage-type): полость ЦД блокируется другими молекулами ЦД с обоих концов, что обуславливает «изоляцию» каждой полости ЦД. Упаковка молекул представляет собой «ёлочку». Для реализации такого типа структуры комплекса необходимо, чтобы молекула «гостя» полностью располагалась в одной полости ЦД.

3. Тип «слой» (layer-type) является промежуточным типом между двумя вышеописанными типами кристаллической упаковки: состоит из слоев молекул ЦД, которые сдвинуты относительно друг друга на половину молекулы ЦД. При этом полости ЦД открыты в межмолекулярное пространство с обоих концов, что позволяет фрагменту молекулы «гостя» участвовать в образовании межмолекулярных связях с «соседними» молекулами ЦД и их «гостями».

В зависимости от условий кристаллизации, типа ЦД, а также структуры комплекса, возможно получение различных кристаллических структур (Таблица 9) [60,110,111]. Так, быстрая рекристаллизация  $\alpha$ -ЦД и  $\gamma$ -ЦД способствует образованию колончатых структур. Индуцированный цикл сорбции-десорбции воды приводит к фазовому превращению с промежуточным аморфным состоянием: молекулы ЦД подвергаются медленной перегруппировке (продолжительностью около 100 часов для  $\alpha$ -ЦД и 192 часа для  $\gamma$ -ЦД) с образованием кристаллической структуры типа «клетка» с определенным содержанием воды. Эти наблюдения показывают, что гидратная оболочка в значительной степени влияет на структуру самоорганизующихся молекул ЦД [104].

Таблица 9. Кристаллические структуры некоторых комплексов циклодекстринов [60,110,111].

Примеры	Тип кристаллической структуры		
	«Колончатые структуры»	«Слой»	«Клетка»
$\alpha$ -ЦД + <i>m</i> -нитроанилин	$\alpha$ -ЦД + <i>n</i> -нитрофенол	Диметил- $\alpha$ -ЦД + йод	
$\beta$ -ЦД + рацемат флурбипрофена	$\beta$ -ЦД + сульфатиазол	Диметил- $\alpha$ -ЦД + <i>m</i> -нитроанилин	
$\beta$ -ЦД + кармофур		$\beta$ -ЦД + никотинамид	

### 1.2.5. Фармакокинетические параметры циклодекстринов и их комплексов с лекарственными препаратами.

Как и другие вещества, молекулы ЦД подвергаются воздействию различных веществ при введении в организм. Биологические свойства ЦД сходны с их линейным аналогами (Таблица 10), однако из-за своей циклической структуры ЦД менее восприимчивы к ферментативной деградации при пероральном введении в организм [77]. ЦД являются гидрофильными (коэффициент распределения октанол/вода ниже 0) и относительно большими (~1 – 2 кДа) веществами, которые плохо адсорбируются в желудочно-кишечном тракте. В среднем биодоступность природных ЦД составляет менее 4% [112].  $\gamma$ -ЦД полностью деградирует в желудочно-кишечном тракте, а  $\alpha$ -ЦД,  $\beta$ -ЦД и производные ЦД подвергаются частичной биодеградации под действием бактериальной флоры в толстом кишечнике.

Таблица 10. Физико-химические свойства  $\beta$ -циклодекстрина и его линейного аналога, мальтогептанозы [77].

Свойство	$\beta$ -циклодекстрин	Мальтогептаноза
Формула	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$
Структура	Макроцикл	Линейный олигомер
Молекулярная масса, г/моль	1135	1153
$\text{Log}P_{\text{октанол/вода}}$	-14	-14
Растворимость в воде, мг/мл	18,5	~50
Гидролиз под действием человеческой $\alpha$ -амилазы	-	+
Биодеградация в желудочно-кишечном тракте под действием микроорганизмов	+	+

Как и другие низкомолекулярные декстрины, при парентеральном введении ЦД преимущественно выводятся почками в неизменном виде (90%). Остальные 10% удаляются из организма другими путями экскреции: в результате метаболизма печени и желчевыводящих путей. 90% введенного ЦД выводится из организма в течение первых шести часов, и 99,9% - уже через сутки. В среднем период полувыведения из плазмы крови человека составляет от полутора до двух часов, объем распределения составляет 0,2 л/кг [113].

Диссоциация комплексов лекарство-ЦД происходит довольно быстро, процесс обусловлен большим количеством молекул воды в растворе, что смещает равновесие к свободным состояниям «гостя» и «хозяина». В сильно разбавленных системах, например, в плазме крови человека, диссоциация комплекса происходит быстро [70]. Вследствие



разрушения комплекса ЦД не оказывают значительного влияния на связываемость лекарственных препаратов с белками плазмы крови, в частности человеческим сывороточным альбумином. Поэтому все больше внимания привлекают исследования пероральных лекарственных формуляций.

Пероральная адсорбция молекул «гостя» ограничена присутствием избытка молекул ЦД. Так, было показано, что высокие дозы  $\alpha$ -ЦД (1000 мг в таблетке) образуют комплексы с триглицеридами и препятствуют их всасыванию в желудочно-кишечном тракте [112]. Таким образом, при разработке лекарственной формуляции важно подобрать содержание ЦД, достаточное для увеличения растворимости лекарства без ухудшения степени его адсорбции.

Система классификации фармацевтических препаратов (Biopharmaceutics Classification System, BCS) разделяет пероральные лекарственные препараты на четыре класса по их растворимости и способности всасываться в желудочно-кишечном тракте (Таблица 11). Согласно BCS лекарство считается хорошо растворимым, если его наибольшая доза растворима в 250 мл воды при pH 1,0 – 7,5 при 37°C, и обладающим высокой проницаемостью, если степень перорального всасывания составляет больше 90% от введенной дозы человеку. ЦД, как правило, способствуют увеличению растворимости лекарственных препаратов без значительного влияния на их способность проникать сквозь биологические барьеры. Поэтому, ЦД используются в качестве лигандов преимущественно для II класса лекарств.

Таблица 11. Классификация лекарственных препаратов перорального применения согласно BCS и влияние образования комплекса лекарства с циклодекстринами [112].

<b>Класс лекарственного препарата</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>Растворимость лекарства</b>	Высокая	Низкая	Средняя	Низкая
<b>Проницаемость</b>	Высокая	Средняя	Низкая	Низкая
<b>Влияние образования комплекса с ЦД</b>	Не оказывают воздействия или ухудшают действие лекарства	Увеличение биодоступности	Почти не оказывают воздействия	-

Было показано, что за счет увеличения растворимости ЦД способствуют значительному увеличению биодоступности лекарств II класса (увеличение до 3х раз) при

пероральном введении [112]. Изменение биодоступности не было отмечено для карбамазепина, который характеризуется низкой растворимостью и хорошей проницаемостью. Однако образование комплекс карбамазепина с гидроксипропил-ЦД характеризуется повышенной адсорбции препарата в желудочно-кишечном тракте и высокой  $C_{\max}$  в плазме [114].

На сегодняшний день существует большое количество пероральных лекарственных формуляций на основе ЦД [61,115]. Авторы [116] провели детальное исследование взаимосвязи ЦД с их влиянием на свойства лекарства при пероральном применении. В первую очередь, образование комплекса лекарство-ЦД оказывает большее воздействие на параметры лекарства *in vivo*, чем физическая смесь компонентов. Кроме того, наблюдается увеличение биодоступности преимущественно гидрофобных препаратов с коэффициентом распределения октанол/вода  $> 2,5$  с низкой растворимостью в воде (обычно менее 1 мг/мл). При этом комплекс лекарство-ЦД должен характеризоваться  $K_{\text{дис}} < 2 \times 10^{-4}$  М.

Как правило, константы диссоциации комплексов  $\beta$ -ЦД и его производных с лекарственными молекулами составляет от  $10^{-2}$  до  $10^{-4}$  М (Таблица 7). Следовательно, ЦД не будет обуславливать значительного изменения параметров препарата *in vivo*. Для снижения значения  $K_{\text{дис}}$  и разработки систем доставки пролонгированного действия в последнее время используются олигомеры и полимеры на основе ЦД.

### **1.2.6. Методы получения высокомолекулярных соединений на основе циклодекстринов, используемых в качестве мономера**

В последнее время все больше внимания привлекают различные высокомолекулярные соединения, полученные с использованием ЦД в качестве основного мономера. Такие вещества получают с образованием новых ковалентных связей путем связывания молекул ЦД через линкер. Основными методами получения таких олигомерных и полимерных соединений являются депротонирование в присутствии сильного основания и последующий синтез по  $SN_2$  механизму; образование простых или сложных эфиров с диолами или дикарбоновыми кислотами в кислых условиях; или конденсация - непосредственная реакция с бифункциональными сшивающими агентами (например, изоцианатами) [108].

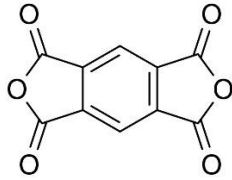
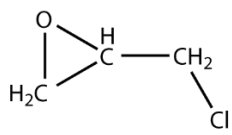
Олигомеры и полимеры ЦД представляют особый интерес, поскольку наблюдается адсорбция «гостя» не только в порах разветвленного полимера, но и в полостях ЦД [117]. Полимеры на основе производных ЦД с плотной структурой относят к классу материалов «наногубки». Инкапсуляция лекарственных молекул в такой носитель с большим

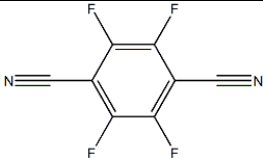
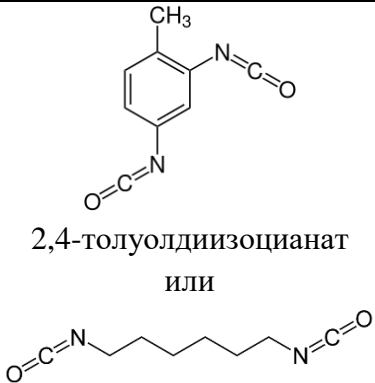
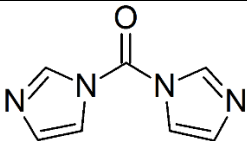
количеством ковалентных внутримолекулярных связей может обуславливать более выраженные изменение свойств препарата по сравнению с простыми комплексами лекарство-ЦД. Так, в работе [118] был синтезирован полимер на основе  $\beta$ -ЦД и пиромеллитового диангидрида, который выдерживали в растворе лекарственного препарата имиквимода. Было показано, что «наногубки» обуславливают более выраженное замедление высвобождения лекарства по сравнению с простыми комплексами ЦД-имиквимод: 35% и 80% свободного препарата за 24 часа, соответственно.

Растворимость в воде высокомолекулярных соединений на основе ЦД уменьшается с увеличением числа связанных мономеров. Растворимость также зависит от типа и реакционной способности сшивающего агента, заместителей и времени реакции, условий синтеза. Как правило, для получения нерастворимых полимеров используются линкеры, содержащие небольшие гидрофобные или ароматические фрагменты (Таблица 12). При этом синтез проводят в органическом растворителе при нагревании, и используется высокий мольный избыток сшивающего агента ( $\geq 8$ ).

Полученные полимеры представляют собой нерастворимые порошки, которые нашли применение в качестве адсорбентов, как неорганических, так и органических веществ. Молекула адсорбата локализуется как в торах ЦД, так и порах самого полимера, образуя нековалентные связи с линкером. Такие полимеры являются перспективными для применения в аналитических целях в качестве сорбентов тяжелых металлов и загрязняющих веществ [108,119,120].

Таблица 12. Примеры синтезированных полимеров на основе циклодекстринов, используемых в качестве адсорбентов.

Тип ЦД	Сшивающий агент	Условия синтеза	Адсорбат	Ссылка
$\alpha$ -ЦД	 Пиромеллитовый диангидрид	ДМСО 25°C 24 часа	Кислород	[72]
$\beta$ -ЦД $\alpha$ -ЦД / $\beta$ -ЦД	 эпихлоргидрин	25°C/50°C	Тирозол и кофейная кислота	[121]
$\alpha$ -ЦД ГП- $\alpha$ -ЦД	эпихлоргидрин	50°C	Азокраситель	[122]

β-ЦД	 Тетрафтортерефталонитрил	ТГФ/ДМФА 85°C 48 часов	Ионы тяжелых металлов (Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> )	[119]
β-ЦД	 2,4-толуолдиизоцианат или 1,6-гексаметилен диизоцианат	ДМФА 80°C 24 часа	2,4-динитрофенол	[123]
β-ЦД γ-ЦД	 карбонилдиимидазол	ДМФА 70°C 24 часа	Пимавансерин	[124]

Водорастворимые олигомеры и полимеры на основе ЦД чаще всего относят к гидрогелям, которые являются перспективными для разработок новых систем доставки лекарств [125,126]. Как правило, для синтеза водорастворимых частиц и гидрогелей используются вышеперечисленные сшивающие агенты в мольном избытке не больше 5. Для использования таких полимеров ЦД в качестве систем доставки препаратов полученные высокомолекулярные соединения выдерживают в растворе лекарства.

Так, авторы [127] синтезировали гидрогель на основе γ-ЦД с использованием диглицидилового эфира этиленгликоля в качестве сшивающего агента. Полученный высушенный полимер выдерживали в растворе дексаметазона в течение 1 недели. При исследовании высвобождения лекарства, было установлено, что полимерный носитель способен высвобождать дексаметазон в течение трех дней. Кроме того, по сравнению с гидрогелем из гидроксипропилметилцеллюлозы полимер на основе ЦД характеризуется большей степенью загрузки лекарственным препаратом.

Таким образом, при добавлении «гостя» к водорастворимым и водонерастворимым полимерам на основе ЦД, наблюдается распределение молекул не только в порах самого полимера, но и торах ЦД, что способствует более сильному удерживанию «гостя» и замедленному высвобождению лекарственно препарата из носителя.

Особое внимание привлекают полимеры ЦД, полученные вследствие так называемого «темплатного» синтеза, в котором процесс полимеризации происходит в присутствии другой органической молекулы (например, лекарственного вещества) – темплата. Поскольку инкапсулирование темплата в полимер происходит на первоначальном этапе синтеза, то выдерживание полимера в растворе препарата не требуется. Кроме того, присутствие темплата в процессе синтеза может обуславливать изменение сайтов присоединения линкера вследствие ассоциации комплексов темплат-ЦД, что впоследствии приводит к формированию специфической полимерной сетки, обладающей свойствами, не характерными для полимеров, синтезированных без темплата [109,128].

Инкапсуляция препарата вследствие темплатного синтеза может также обеспечивать равномерное распределение лекарства в носителе не только на его поверхности, но и внутри частицы, а также более высокий процент эффективности загрузки на 20-30% [129]. Так, авторы [130] показали 90% эффективность включения дигидроксифенилаланина (L-DOPA) в полимер на основе  $\beta$ -ЦД и N, N'-карбонилдимидазола в результате темплатного синтеза (Рисунок 12). При этом система характеризовалась выраженным замедленным высвобождением лекарства - 60% за 48 часов.

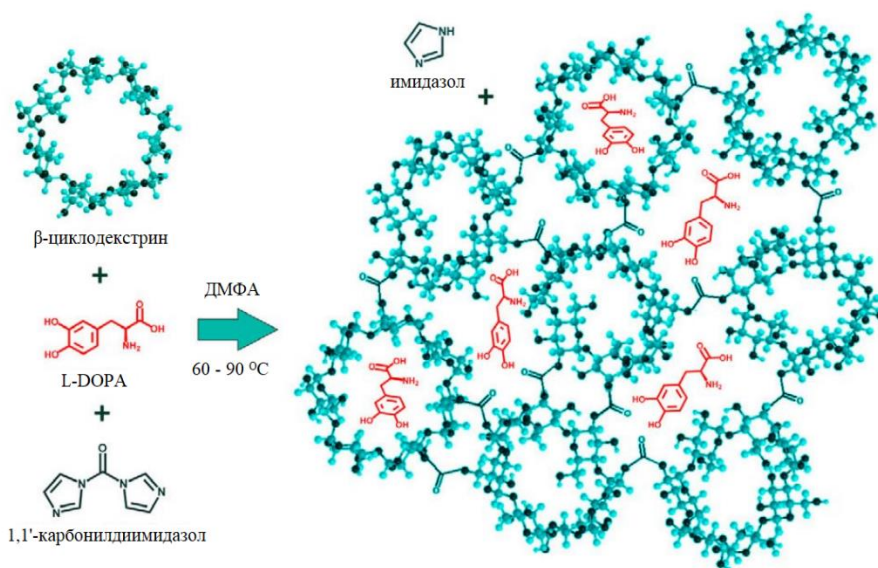


Рисунок 12. Схематическое представление синтеза полимера на основе  $\beta$ -циклодекстрина в присутствии L-DOPA вследствие темплатного синтеза [130].

Важно отметить, что авторы также исследовали степень включения L-DOPA в комплекс с ЦД с помощью диффузионно-упорядоченной спектроскопии DOSY. Согласно отличиям в диффузионных коэффициентах свободного L-DOPA и его комплекса (на первоначальной стадии темплатного синтеза) включение L-DOPA в гидрофобные полости

ЦД составляет не более 10. Таким образом, введение сшивающего агента в раствор, где доля комплекса небольшая, приводит к локализации L-DOPA как в полостях ЦД, так и внутри полимерной матрицы частицы (Рисунок 12).

### 1.3. Исследования антибактериальных свойств лекарственных форм

Разработки новых лекарственных форм сопряжены не только с исследованиями физико-химических свойств препарата, но и его непосредственным действием: антибактериальной активностью и поведением *in vivo*. Поскольку исследования *in vivo* являются дорогостоящими и сопряжены с высокими рисками все больше внимания в биомедицине привлекает область исследований по взаимосвязи лекарственных формуляций *in vitro-in vivo*. Корреляция *in vitro – in vivo* (IVIVC) позволяет прогнозировать эффективность препарата *in vivo* на основе его физико-химических свойств *in vitro* таких как его растворимость, коэффициент распределения окстанол-вода, профиль высвобождения в модельных условиях и др. Сложные математические модели в конечном итоге могут быть использованы для оптимизации рецептур, установления пределов растворения, снижения числа исследований биоэквивалентности при разработке формуляции. На сегодняшний день IVIVC включает в себя построение функциональной зависимости между входом (параметром *in vitro*) и выходом (параметром *in vivo*) и параметризация неизвестных в математической модели [131,132].

Авторы [133] провели анализ работ, опубликованных за 1998-2018 гг. по исследованию пероральных препаратов с помощью подходов IVIVC. На основании обобщенных данных можно выделить несколько важных аспектов, которые наиболее применимы в IVIVC:

1. Лекарственные препараты I и II класса по BCS
2. Лекарственная форма с медленным профилем высвобождения (замедленным, поддерживаемый на определенном уровне и др.).
3. Изучение IVIVC в большинстве случаев проводится на животных модельных объектах (мыши, кролики, собаки и др.) в рамках научных исследований или для ранней разработки препаратов.
4. Почти в 50% случаев используется математическая модель Вагнера-Нельсона.
5. 2/3 исследований используют данные профиля растворения, в частности растворенную фракцию.

Несмотря на высокий интерес к данной области, к сожалению, до сих пор нет четких критериев оценки IVIVC. Авторы отмечают, что 78% исследований не показали никаких

валидационных данных и/или доказательств предсказуемости IVIVC, т.е. на сегодняшний день подходы IVIVC являются недостаточно изученными для надежного предсказания поведения лекарственных формуляций *in vivo* с высокой точностью.

Таким образом, в связи с отсутствием четких корреляций IVIVC, прежде чем переходить к длительным и дорогостоящим исследованиям *in vivo* необходимо оценить антибактериальное действие лекарственной формуляции *in vitro*.

### **1.3.1. Методы определения значения минимальной ингибирующей концентрации лекарственных препаратов**

Основными параметрами антибактериальной активности являются минимальная ингибирующая концентрация (МИК), определяющая наименьшую концентрацию препарата, которая подавляет видимый рост клеток, и минимальная бактерицидная концентрация, соответствующая наименьшей концентрации препарата, которая полностью подавляет рост микроорганизмов. Как правило, для оценки антибактериальной активности лекарств чаще всего используют МИК. Существует несколько методов определения МИК вещества *in vitro* как в жидких, так и на твердых питательных средах.

Для определения значения МИК в жидких питательных средах часто используют метод серийных разведений. Метод основан на инкубировании образцов, содержащих различные концентрации лекарственного препарата, с бактериальной культурой в течение 12 – 24 часов (35 - 37°C). Далее проводят измерение оптической плотности на длине волны 600 или 630 нм [134–136], что соответствует общему количеству клеток (как живых, так и мертвых). МИК соответствует значению наименьшей концентрации, при которой отсутствуют изменения плотности по сравнению с исходным образцом [137].

Более строгий метод заключается в количественной оценке живых клеток после инкубации бактерий с антибактериальным препаратом. Для этой цели из образцов, инкубируемых в жидкое среде, отбирают аликвоты и производят высев на твердую питательную среду с последующим подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) [138].

Для определения значений МИК на твердых питательных средах (Рисунок 13) также используют метод серийных разведений: производят высев бактериальной культуры на чашки Петри с твердой питательной средой, содержащий лекарственный препарат в различных концентрациях. После инкубации оценивают видимый рост бактерий на чашках. Поскольку градиент концентраций имеет широкий диапазон значений с большим шагом то, как правило, возможно определить диапазон МИК, но не точное ее значение. Кроме того,

для проведения данного эксперимента необходим большой расход материала и реагентов: на каждое значение концентрации лекарства необходима чашка Петри.

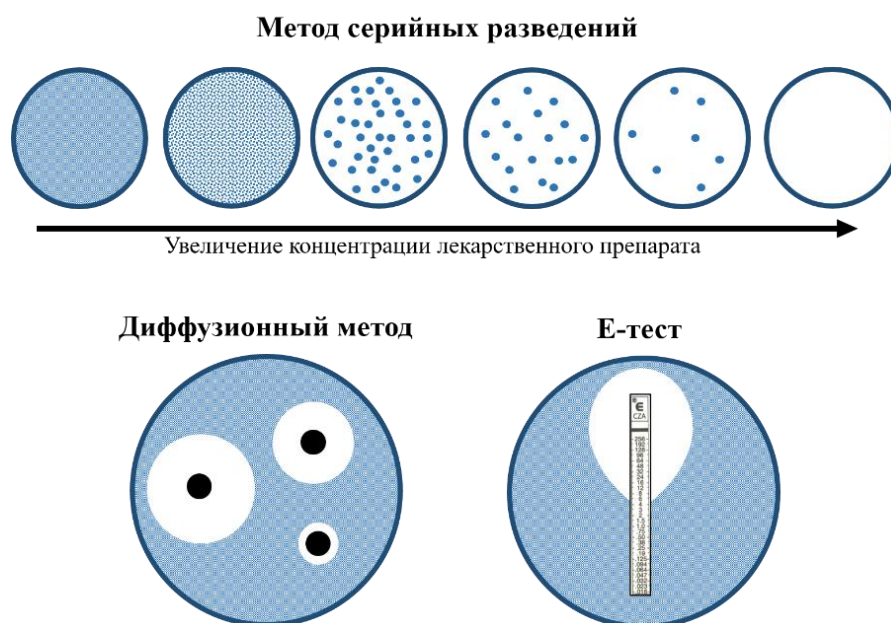


Рисунок 13. Графическое изображение методов исследования минимальной ингибирующей концентрации лекарственного препарата на твердых средах (чашках Петри). Синим цветом показана бактериальная культура, белым – зоны ингибирования (отсутствия) роста клеток.

Одновременный анализ большего количества концентраций лекарства возможен с помощью диффузионного метода (метода Кирби-Бауэра), который основан на диффузии образца из носителя (чаще всего диска), пропитанного раствором лекарства. Диск помещается на твердую питательную среду с распределенной бактериальной культурой на чашке Петри. После инкубации оцениваются диаметры зон ингибирования (отсутствия) роста микроорганизмов. Данным методом можно косвенно определить МИК и отнести штамм к чувствительному, промежуточному или резистентному [137,139].

Е-тест схож с диффузионным методом. Основное отличие заключается в том, что вместо диска используется полоска полимера с нанесенным градиентом концентраций лекарства. После инкубации на твердой питательной среде с нанесенной бактериальной культурой образуется каплевидная зона ингибирования роста. Значение МИК определяют по значению концентрации лекарства, соответствующей начальному участку зоны ингибирования [137]. Таким образом, Е-тест является более точным методом определения значений МИК.

Метод диффузии в агаре заключается в удалении дисков агара из твердой питательной среды диаметром 8-10 мм с нанесенной бактериальной культурой. Далее в полученную лунку помещают образец с определённой концентрацией лекарственного



препарата. Спустя 24 часа инкубации при температуре 37°C оценивают возникшие диаметры ингибирующего действия [140–142]. Метод диффузии в агаре аналогичен методам Кирби-Бауэра и E-теста, однако диффузия образца преимущественно происходит в самом агаре, а не на его поверхности. Такие условия в наибольшей степени соответствуют реальным условиям, поскольку материал диска или полимера может удерживать лекарство на своей поверхности, что может привести к более замедленной диффузии.

Выбор метода определения МИК обусловлен растворимостью лекарственного препарата и скоростью его диффузии с диска или в агаре. Наиболее доступными и быстрыми методами являются метод Кирби-Бауэра, а также метод диффузии в агаре, которые позволяют одновременно исследовать несколько концентраций на одной чашке Петри, что позволяет минимизировать количество реактивов и материалов.

### **1.3.2. Антибактериальные свойства незагруженных систем доставки лекарств**

При исследовании влияния системы доставки на антибактериальную активность лекарственной молекулы, важно изучить и антибактериальное действие самого носителя. Так, авторы [138] показали антибактериальные свойства наночастиц, полученных посредством сшивания карбоксиметилхитина хлоридами кальция и железа (III). В качестве основного метода исследования был использован метод серийных разведений в жидкой среде с последующим высевом и подсчетом КОЕ.

Антибактериальное действие носителей может быть обусловлено адсорбцией частиц на клетки микроорганизмов, что приводит к изменению состояния поверхности клеток.

Физико-химические свойства поверхности бактериальных клеток определяются строением клеточной стенки и, как следствие, дифференциации на грамположительные (ГрП) и грамотрицательные (ГрО) клетки. Клеточная стенка ГрП клеток находится поверх клеточной мембраны и состоит из толстого слоя пептидогликана (30-40 нм), который образован полисахаридными цепями, ковалентно соединенных пептидными сшивками. Еще одним компонентом клеточной стенки являются тейхоевые кислоты, формирующие полианионную поверхность, частично нейтрализованную бивалентными ионами магния и кальция, которые также участвуют в поддержании сложной структуры пептидогликана.

У ГрО клеток слой пептидогликана тоньше (2-2,5 нм). Кроме того, поверх него располагается дополнительная наружная мембрана, которая по своему строению и составу отличается от внутренней клеточной мембраны. В первую очередь, для наружной мембраны характерна асимметричность: внутренний монослой (направленный в сторону

пептидогликана) состоит из фосфолипидов, а внешний монослой (направленный во внешнюю среду) содержит липополисахариды, которые стабилизированы межмолекулярными гидрофобными и электростатическими взаимодействиями (между фосфатными группами липополисахаридов и бивалентными катионами кальция и магния).

Клеточная стенка создает дополнительный барьер, препятствуя проникновению многих веществ внутрь клетки. Лекарственные препараты ( $\beta$ -лактамы, тетрациклины, хинолоны и др.) проникают в цитоплазму ГрП клеток преимущественно за счет пассивной диффузии через слой пептидогликана и клеточной мембраны. Для проникновения лекарств в ГрО клетки необходимо сначала преодолеть наружную мембрану. Проникновение веществ через наружный бислой осуществляется посредством диффузии гидрофобных веществ непосредственно через липидный бислой и/или через образованные группой белков (поринов) каналы. Наличие дополнительного барьера у ГрО бактерий может обуславливать меньшую чувствительность к некоторым антибактериальным препаратам [143,144].

Поверхность бактериальной клетки имеет отрицательный  $\zeta$ -потенциал, который обусловлен суммой всех отрицательных и положительных зарядов поверхностных функциональных групп пептидогликана в случае ГрП клеток и липополисахаридов в случае ГрО клеток. В среднем значение  $\zeta$ -потенциала клеток составляет около  $-30 \div -40$  мВ (рН 7,4). Некоторыми авторами было показано, что значения  $\zeta$ -потенциала у ГрО клеток несколько ниже, чем у ГрП клеток: так  $\zeta$ -потенциал ГрП *S.aureus* больше  $\zeta$ -потенциала ГрО *E.coli* на 10 мВ. Как считают авторы, столь значимая разница обусловлена особенностями структуры и зарядов компонентов клеточной стенки [145,146].

Многие виды ГрП и ГрО клеток поверх клеточной стенки имеют множественные белковые выросты – фимбрии (или пили). Фимбрии характеризуются размерами от нескольких нанометров до микрометров, их основные функции заключаются в прикреплении бактерий к поверхности и передачи генетической информации (конъюгации). Также белковые структуры участвуют в образовании бактериальной биопленки, фаговой трансдукции и особой форме движения бактериальных клеток [147].

Механизм адсорбции частиц на поверхность бактериальных клеток обусловлен преимущественно электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженной поверхностью клеток и частицами. Сродство частиц к поверхности клеток зависит не только от величины заряда исследуемого соединения, но и от типа (ГрО или ГрП) и штамма бактерии, т.е. особенностей строения клеточной стенки и мембраны [148].

Положительно заряженные частицы, такие как дендримеры и хитозан, способны сорбироваться на анионную поверхность клеток [149,150], вследствие чего происходит

постепенное сокращение клеточной мембраны, изменение проницаемости бислоя, вытягивание различных компонентов из цитоплазмы, что может привести к гибели микроорганизмов [151].

Так, авторы [152] наглядно продемонстрировали действие хитозана (78 кДа) на клеточную мембрану методом просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 14).

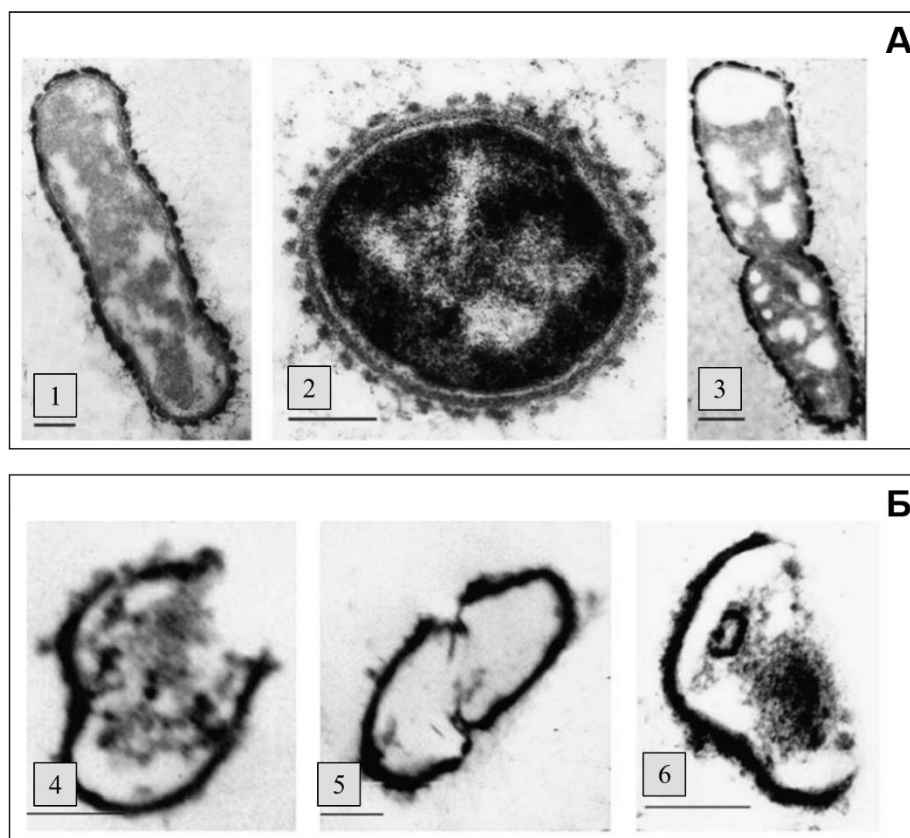


Рисунок 14. Микрофотографии клеток *E.coli* (А) и *S.aureus* (Б) после воздействия 0,5% раствора олигохитозана в течение 20 минут 37°C. Масштабный отрезок 200 нм [152].

Адсорбция хитозана на поверхности ГрО клеток *E.coli* обуславливает полное разрушение наружной мембраны. При этом значительные дефекты внутренней мембраны не наблюдаются. Для ГрII клеток *S.aureus* мембрана делящихся клеток была нарушена в области образования перегородки между дочерними клетками с потерей клеточного содержимого. Кроме того, новые клетки имели неправильную форму, с разорванными мембраной или клеточной стенкой. Из дефектов в неделящихся клетках визуально наблюдалось только утоньшение клеточной стенки. Таким образом, положительно заряженные частицы (незагруженные лекарственными молекулами) могут обладать собственной антибактериальной активностью.

Анионные частицы также способны адсорбироваться на поверхности клеток, однако в меньшей степени (до 20-30%), поскольку их взаимодействие с поверхностью более слабое

[148]. Например, частицы PLGA, имеющие отрицательный  $\zeta$ -потенциал (с средним от -5 до -20 мВ [43,46,148]), сами не проявляют антибактериальной активности, однако отрицательный заряд носителя может способствовать увеличению чувствительности бактерий к гидрофобным лекарствам. Аналогичный эффект обнаружен для других анионных хелатирующих агентов, например, нитрилоуксусной кислоты, гексафосфата, этилендиаминтетраацетата и др. Механизм действия таких агентов, как предполагается, основан на взаимодействии частиц с дивалентными катионами магния и кальция, которые стабилизируют отрицательно заряженные компоненты клеточные стенки ГрО и ГрП бактерий – тейхоевых кислот и липополисахаридов соответственно. Хелатирование ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  частицами PLGA может приводить к дестабилизации клеточной стенки и лучшему проникновению лекарственных молекул в цитоплазму [142,153].

Так, в работе [141] авторы исследовали антибактериальную активность PLGA частиц, загруженных кларитромицином, методом диффузии в агаре на штаммах *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *S. typhi*, *S. aureus* и *S. pneumoniae*. Согласно полученным данным, лекарственная форма характеризовалась отрицательным  $\zeta$ -потенциалом (от -4мВ до -15мВ) и более выраженной антибактериальной активностью по сравнению со свободным кларитромицином. Данный эффект был наиболее выражен для ГрП бактериальных клеток, что, по-видимому, обусловлено менее выраженной барьерной функцией у ГрП клеток по сравнению с ГрО клетками из-за особенностей строения клеточной стенки, что было рассмотрено ранее.

### **1.3.3. Исследование пролонгированного антибактериального действия лекарственных форм *in vitro***

Исследование антибактериальной активности лекарства в системе доставки (PLGA, производных ЦД, хитозана и др.) проводят на различных штаммах ГрП и ГрО бактериях, чаще всего на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [136,139,154].

Производные ЦД являются нетоксичными носителями, которые не проявляют антибактериальных свойств. Однако комплексообразование лекарственных препаратов с производными ЦД может способствовать уменьшению МИК на 60 – 74%, что, по-видимому, обусловлено увеличением растворимости лекарственных молекул и, как следствие, большей эффективностью их действия [135,155].

Многие носители, в том числе и производные ЦД, также обеспечивают замедленное высвобождение лекарства, т.е. могут придавать лекарственной форме длительное антибактериальное действие. Пролонгированное действие может способствовать

увеличению эффективности терапии за счет поддержания необходимой концентрации препарата в плазме крови. Кроме того, возможно снижение вероятности возникновения побочных эффектов и отсутствие передозировки.

В литературе описаны системы с замедленным высвобождением лекарственного препарата от нескольких часов до 50 дней в модельных условиях с использованием диализной мембраны [154,156,157]. Такие системы являются востребованными для создания высокоэффективных лекарственных форм для перорального и парентерального применения, а также покрытий имплантатов [158–160].

Одним из преимуществ полимеров на основе ЦД по сравнению с другими носителями является возможность использования лекарственных молекул различного размера и структуры: препарат может включаться как в торы ЦД, так и взаимодействовать с функциональными группами самого полимера и спейсера [123,157].

При изучении антибактериальных покрытий или скаффолдов, которые характеризуются замедленным высвобождением лекарства, используют метод Кирби-Бауэра, который заключается в помещении образца на поверхность твердой питательной среды с распределенной бактериальной культурой и последующей оценкой возникающих диаметров ингибирования (отсутствия) роста микроорганизмов [139]. Так, авторы [161] предложили модифицировать поверхность гидроксиапатита, нанесенного на титановый материал, полимером на основе М-β-ЦД и линкера 1,2,3,4-бутанететракарбоновой кислоты. Было обнаружено, что покрытие импланта полимером на основе М-β-ЦД способствовало двукратному и семикратному улучшению сорбционной способности материала по отношению к лекарственным препаратам рифампицину и тобрамицину, соответственно. Для проведения комплексного исследования антибактериальной активности трехкомпонентной системы титан-гидроксиапатит-полимер М-β-ЦД образцы в форме дисков инкубировались в фосфатном буфере (37°C). Через определенные промежутки времени антибактериальной действие самих дисков и аликвот супернатанта исследовали методом Кирби-Бауэра. Было доказано достижение ежедневной концентрации лекарства, необходимой для проявления антибактериальной активности в течение 7-21 дня.

Важно отметить, что исследование антибактериальной активности проводилось ежедневно на бактериальной культуре, которая находилась в одной и той же фазе роста. То есть авторами не было продемонстрировано пролонгированное антибактериальное действие образца в динамике роста микроорганизмов (в течение нескольких дней), что более соответствует реальным условиям. Кроме того, исследования на твердых средах не позволяет проводить эксперимент более 24 часов, в то время как системы доставки могут замедлять высвобождение лекарства до 50 дней. Таким образом, длительное изучение

антибактериальной активности предпочтительнее проводить в жидких питательных средах. Такая система наиболее близка к реальным условиям.

Для оценки антибактериальной активности в жидких средах лекарственную форму инкубируют с бактериальной культурой в течение 12-24 часов с последующим высевом на твердую среду с подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ). По результатам эксперимента возможно определить значение МИК, определить концентрационную зависимость влияния лекарства на бактериальную культуру, а также рассчитать антибактериальную активность по следующей формуле [138,154]:

$$AA(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad (5)$$

где  $AA$  – антибактериальная активность (%),  $A$  – КОЕ в контроле и  $B$  – КОЕ в образце, содержащем лекарственный препарат в системе доставки.

Зависимость антибактериальной активности от времени является важным инструментом для оценки пролонгированности действия лекарственной формуляции. Однако согласно литературным данным расчет антибактериального действия проводится в течение 12-24 часов, в то время как носитель способен высвободить лекарственный препарат до 50 суток в условиях, приближенных к реальным (рН 7,4 37°C). Таким образом, не существует методики изучения влияния носителя на антибактериальные свойства лекарства в системе доставки в течение длительного периода времени. Кроме того, не найдено исследований по поиску корреляции между степенью замедления высвобождения лекарства и *in vitro* антибактериальной активностью.

Таким образом, обзор литературных данных показал, что наиболее перспективными носителями лекарств являются доступные продукты биотехнологического производства ЦД и их производные, которые позволяют регулировать физико-химические свойства лекарственных молекул. Однако недостаточно изучены механизмы формирования комплексов Ф-ЦДХ и, в частности, влияние свойств заместителя в β-ЦД (химической природы, размера, заряда и др.), а также структуры полимера в случае олигомерных и полимерных носителей на основе ЦД на структуру образующегося комплекса и на вовлеченность различных функциональных групп в стабилизацию таких систем.

В литературе отсутствуют закономерности во влиянии физико-химических свойств носителя на основе ЦД и/или комплексов ФХ-носитель на антибактериальное действие ФХ *in vitro*. Кроме того, для установления влияния свойств системы доставки на пролонгированную антибактериальную активность ФХ необходимо разработать новую методику исследования действия препарата *in vitro* в течение длительного периода времени.

В качестве объектов исследования были выбраны ципрофлоксацин, левофлоксацин и моксифлоксацин - три наиболее широко используемых ФХ, которые имеют ряд структурных особенностей фармакофора, т.е. могут оказывать значительное влияние на механизм и эффективность образования нековалентных комплексов с лигандами. Среди производных  $\beta$ -ЦД были выбраны олигосахариды с разной природой заместителя: 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин с полярным незаряженным заместителем, метил- $\beta$ -циклодекстрин с неполярным заместителем и сульфобутиловый эфир  $\beta$ -циклодекстрин с отрицательно заряженным заместителем. В зависимости от типа заместителя в  $\beta$ -ЦД возможна различная эффективность связывания с ФХ, а также возможно формирование различных надмолекулярных архитектур при синтезе полимерной сетки, что впоследствии будет оказывать влияние на возможности регулирования функциональных свойств ФХ.

Для детального изучения молекулярных механизмов формирования комплексов лекарственных молекул с различными носителями, а также изучения надмолекулярной архитектуры полимерных систем, в работе использован комплекс спектроскопических методов (ЯМР, ИК, УФ и флуоресценция), которые позволяют получить информацию о микроокружении каждого структурного фрагмента молекулы. Кроме того, сочетание экспериментальных методов с расчетными современными технологиями (компьютерным моделированием), позволяет объяснить наблюдаемые эффекты с точки зрения пространственного взаимного расположения молекул «гостя» и носителя.

Для исследования поведения лекарственных форм *in vitro* впервые предложено изучать поведение препарата в течение длительного периода времени (в течение 7 дней) с визуальным контролем состояния клеток и изучением механизмом антибактериального действия системы ФХ-носитель. Разработка комплексной методики исследования является важной задачей биотехнологии и биомедицины для разработки высокоэффективных лекарственных формуляций с улучшенным антибактериальным действием и пролонгированной антибактериальной активностью.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Материалы

2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, метил- $\beta$ -циклодекстрин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, 1,6-гексаметилендиизоцианат, диметилсульфоксид, фенолфталеин, паратрет-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля (Тритон-X100) – Sigma-Aldrich (США); натриевая соль сульфобутилового эфира  $\beta$ -циклодекстрина – Zibo Qianhui Biotechnology Co Ltd (Китай); моксифлоксацин – Канон Фарма (РФ); соляная кислота (все ч.д.а.) – Реахим (РФ); таблетки для приготовления 0,02 М натрий-фосфатного буферного раствора (рН 7,4) – ЭкоСервис (РФ); D<sub>2</sub>O – Cambridge Isotope Laboratories (США); дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и кардиолипин (1',3'-бис[1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо]-глицерол, КЛ), растворы в хлороформе – Avanti Polar Lipids (США).

### 2.2. Методы

*Получение комплексов фторхинолонов с производными  $\beta$ -циклодекстрина.* К раствору 3 мг/мл фторхинолона (0,1 мМ HCl, рН 4,0) добавляли раствор одного из производных  $\beta$ -циклодекстрина (рН 4,0) и буферный раствор для достижения итогового объема образца 0,5 мл. Концентрация фторхинолона (1 мг/мл) поддерживалась постоянной, при этом мольное соотношение лиганд : фторхинолон варьировался от 0,25 до 10. Полученные растворы инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) при 150 об/мин при заданной температуре.

*Синтез полимеров производных  $\beta$ -циклодекстрина.* Раствор производного  $\beta$ -циклодекстрина (5 мг/мл или 32 мг/мл) в дистиллированной воде выдерживали при температуре 37°C в течение 20 мин. Далее добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) при активном перемешивании в количестве, необходимом для получения итогового раствора с 50% содержанием ДМСО по объему. Через 2 мин добавляли раствор 1,6-гексаметилендиизоцианата в ДМСО (17 мг/мл) при активном перемешивании смеси реагентов. Финальный объем сшивающего агента варьировался для получения мольного соотношения линкера по отношению к мономеру равного 0,25; 0,5; 0,75; 1; 3 или 5. рН образцов доводили до 4,0 раствором 5 мМ HCl. Смесь реагентов инкубировали в течение 3 часов при активном перемешивании, затем помещали на 12 часов в холодильную камеру при 4°C. Очистка от органической фазы проводилась методом диализа с использованием диализной мембраны (Serva MWCO 3 кДа) в течение 6 часов с периодической сменой внешнего раствора. Полученный раствор продавливался через ручной (шприцевой) экструдер Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar lipids, США) со средним диаметром пор



мембраны 200 нм (число интераций составило не менее 31) и далее подвергался лиофильной сушке.

*Лиофильная сушка.* Образец объемом 1,5 – 3 мл помещался в холодильную камеру (-70°C) на 24 часа, после чего образец лиофилизовали в течение двух суток при -60°C (Edwards 5, ВОС Edwards, Великобритания).

*Синтез 3D-матричных структур на основе β-циклодекстрина* проводили аналогично синтезу полимеров (при концентрации циклодекстрина 32 мг/мл), однако в качестве исходного раствора использовался комплекс моксифлоксацина с сульфобутиловым эфиром β-циклодекстрина.

*Получение комплексов фторхинолонов с полимерами и полимерами на основе производных β-циклодекстрина* проводили аналогично получению комплексов фторхинолонов с мономерами, однако концентрация лиганда варьировалась для достижения мольного избытка один тор ЦД : фторхинолон в интервале от 0,25 до 7. Полученные комплексы подвергались лиофильной сушке.

*Исследование кинетики высвобождения фторхинолона из различных производных β-циклодекстрина:* 1,0 мл исследуемого образца помещали в мешок для диализа Serva MWCO 3кДа (для комплексов фторхинолонов с производными β-циклодекстрина) или Serva MWCO 14кДа (для комплексов фторхинолона с полимерами на основе производных β-циклодекстрина, а также 3D-матричных структур). Мешок помещали во внешний раствор объемом 1,0 мл с тем же рН. Систему инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) при 150 об/мин 37°C, периодически отбирая аликвоты 50-100 мкл из внешнего раствора для регистрации УФ-спектров (и ИК-спектров в случае изучения кинетики в присутствии трипсина).

*Исследование растворимости фторхинолонов:* 10 мг фторхинолона суспендировали в 250 мкл солянокислого буферного раствора (0,1 М HCl, рН 4,0) или натрий-фосфатного буфера (PBS, рН 7,4). Образцы инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) при 200 об/мин 37°C. Далее аликвоты (50 мкл), отобранные через заданные промежутки времени, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 15 мин. Анализ содержания фторхинолона в супернатанте проводили методом УФ-спектроскопии после разбавления пробы соответствующим буфером в 1000 – 2000 раз.

*Исследование скорости растворимости фторхинолонов:* Растворы левофлоксацина и его комплекса с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином инкубировались при 100 об/мин) 37°C (Слф=1 мг/мл) в PBS рН 7,4. Аликвоты, отобранные через заданные промежутки времени, анализировались на микроскопе PZO Warszawa (Polskie Zakady Optyczne, Polish Optical

Industries). Образец помещался на предметное стекло, после чего регистрировали микрофотографии при 40-кратном увеличении.

*Получение моноламеллярных липосом.* Раствор 25 мг/мл смеси липидов в хлороформе ДПФХ/КЛ (80%/20% по масс.) высушивался на вакуумном роторном испарителе при 55°C. Тонкую липидную пленку диспергировали в 0,02 М натрий-фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7,4) объемом, необходимым для достижения конечной концентрации липидов 5 мг/мл. Раствор подвергали воздействию ультразвука (22 кГц) трижды в течение 200 с в непрерывном режиме на диспергаторе 4710 «Cole-Parmer Instrument» (США) при температуре 50-55°C.

*Загрузка липосом фенолфталеином.* Загрузка липидных везикул фенолфталеином проводилась методом пассивной загрузки: после получения тонкой липидной пленки ее диспергировали в 0,01 М растворе индикатора (0,02 М PBS, pH 7,4). Далее суспензию подвергали воздействию ультразвука (22 кГц) трижды в течение 200 с в непрерывном режиме на диспергаторе 4710 «Cole-Parmer Instrument» (США) при температуре 50-55°C. Далее раствор помещался в диализный мешок (MWCO 3,5 кДа) и в 1 л PBS (pH 7,4). Систему инкубировали в течение 1 часа с трехкратной сменой внешнего буферного раствора.

*Исследование кинетики высвобождения фенолфталеина из липосом.* В диализный мешок (MWCO 3,5 кДа) помещали 1 мл липосом ( $C_{\text{липидов}} = 5$  мг/мл), загруженных фенолфталеином (PBS, pH 7,4) и в 1 мл 0,02 М натрий-боратного буферного раствора с pH 10,7. К липосомам добавляли 40 мкл водного раствора 100 мг/мл производного  $\beta$ -циклодекстрина или Тритона-X100 (10% по масс.). Системы инкубировались 2 часа в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) при 100 об/мин 37°C. Через определенные промежутки времени проводили регистрацию УФ-спектров внешнего раствора.

*Исследование взаимодействия левофлоксацина и его комплексов с производными  $\beta$ -циклодекстринами с поверхностью липосом:* к 1 мл суспензии липосом ( $C_{\text{липидов}} = 5$  мг/мл) добавляли раствор левофлоксацина или его комплекса с производным  $\beta$ -циклодекстрина (мольное соотношение лекарство:липиды варьировалось в диапазоне от 0,5 до 10). Системы инкубировали в течение часа в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) при 100 об/мин 37°C, далее регистрировали спектры кругового дихроизма растворов.

*УФ-спектры* растворов регистрировали на приборе AmerSharm Biosciences UltraSpec 2100 pro (США) трижды в диапазоне 200 – 650 нм в кварцевой кювете Hellma 100-QS с оптическим путем 10 мм.

*ИК-спектры* регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 Bruker (Германия), оснащенном МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом Huber (США).

40 мкл образца помещали на кристалл однократного отражения (ZnSe) термостатируемой ячейки (НПВО, BioATR-II, Bruker, Германия). Измерения проводили при постоянной скорости продувки сухим воздухом (Jun-Air (Германия)). ИК-спектры фона и образцов регистрировали трижды в интервале от 4000 до 950  $\text{см}^{-1}$  с разрешением 1  $\text{см}^{-1}$ , далее производили 70-кратное сканирование и усреднение в программе Opus 7.0.

*ИК-микроскопия.* Микрофотографии и ИК-спектры в заданных областях регистрировали с помощью ИК-микроскопа Bruker LUMOS (Германия) трижды в интервале от 4000 до 950  $\text{см}^{-1}$  с разрешением 2  $\text{см}^{-1}$ , далее производили 70-кратное сканирование и усреднение в программе Opus 8.2.28.

*Спектры кругового дихроизма* регистрировали с помощью спектрометра Jasco J-815 (Япония), оснащенного генератором азота NiGen HF-1 (Claind, Италия) и термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 200 – 400 нм при комнатной температуре в кварцевой кювете Hellma 100-QS с оптическим путем 1 мм. Спектры получали пятикратным сканированием с шагом в 2 нм.

*ЯМР-спектроскопия:* 7-10 мг образца растворяли в 700 мкл  $\text{D}_2\text{O}$ .  $^1\text{H}$  -пектры растворов регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 (Германия) с рабочей частотой 400 МГц. Химические сдвиги ( $\delta$ ) в м.д. рассчитывались относительно остаточных сигналов  $\text{D}_2\text{O}$  (4,79 м.д.).

*Спектры эмиссии флуоресценции* регистрировали на флуоресцентном спектрометре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) при длине волны возбуждения 289 нм в интервале от 400 нм до 550 нм. Определяли интенсивность пика моксифлоксацина на длине волны 465 нм.

*Константы диссоциации комплексов* рассчитывали по данным УФ-спектроскопии с помощью линеаризации уравнения Бенеша-Гильдебранда (3); по данным ИК-спектроскопии - линеаризацией в координатах Скэтчарда (4).

*Молекулярное моделирование комплексов фторхинолонов с производными  $\beta$ -циклодекстринов.* Пространственные структуры молекул фторхинолонов и производных  $\beta$ -циклодекстрина были построены в программе ChemBio3D («CambridgeSoft», PerkinElmer). Параметризация молекул в соответствии с силовым полем CHERRM27 была осуществлена с помощью сервиса «SwissParam». Исходные структуры комплексов были получены вследствие ручного докинга (помещение молекулы лекарства в полость циклодекстрина), далее комплексы помещались в центр сольватационной сферы, заполненной молекулами воды (радиус сферы выбирался таким образом, чтобы система была покрыта слоем воды толщиной не менее 20 Å). Для сохранения неизменного количества молекул воды в сфере в процессе молекулярной динамики, при пересечении молекулами границы сферы на них

начинала действовать сила, возвращающая молекулы в сферу. Положение одного из атомов ароматического кольца фторхинолона фиксировалось в пространстве для сохранения центрального положения комплекса в сфере. После нейтрализации полного заряда системы (рН 4,0 или 7,0) была проведена энергетическая минимизация (1000 шагов) с последующей молекулярной динамикой при постоянной температуре (300 К) на протяжении 2 нс. Координаты атомов сохранялись через 2 пс для последующего анализа.

Построение исходной структуры комплексов, подготовка пространственных структур молекул для молекулярной динамики, сольватация и нейтрализация заряда системы, энергетическая минимизация, молекулярная динамика и визуальный анализ полученных траекторий выполнялись с помощью пакета программ VMD-NAMD, разработанного группой теоретической и вычислительной биофизики в Бекмановском институте University of Illinois at Urbana-Champaign (<http://www.ks.uiuc.edu>).

*Определение гидродинамического диаметра синтезированных полимеров* проводили методом анализа траектории частиц НТА (Nanoparticle Tracking Analysis) с использованием прибора Nanosight LM10-HS (Великобритания). Образцы частиц разводили в 10 – 1000 раз очищенной водой MilliQ до концентрации частиц  $10^7$  –  $10^9$  частиц/мл и выдерживали на ультразвуковой бане в течение 30 с. Гидродинамический диаметр определялся по уравнению Стокса-Эйнштейна вследствие анализа траектории броуновского движения частиц. Измерение каждого образца проводили три раза. Гидродинамический диаметр частиц также определялся методом динамического светорассеяния.

*Определение молекулярной массы ( $M_r$ ) полимеров* осуществлялось по формуле

$$M_r = \frac{[\text{ЦД}] \times N_A}{n} \times M_{r_m} \quad (6)$$

где  $[\text{ЦД}]$  – концентрация торов ЦД (моль/мл) в соответствии с разведением, необходимым для метода НТА (первоначальная концентрация ЦД определялась по интенсивности полосы, соответствующей колебаниям С-О-С связи, в ИК-спектре полимера);  $N_A$  – число Авогадро;  $n$  – концентрация частиц полимера (частиц/мл) в соответствии с данными НТА;  $M_{r_m}$  – молекулярная масса мономера (ЦД и количество спейсеров в соответствии со степенью сшивки).

*Определение  $\zeta$ -потенциала полимеров* осуществлялось методом динамического светорассеяния (DLS). Измерения проводили на оборудовании Zetasizer Nano S «Malvern» (Англия) (4 мВт He–Ne-лазер, 633 нм) в термостатируемой ячейке при 25°C. Автокорреляционные функции флуктуации интенсивности светорассеяния были получены с использованием корреляционной системы Correlator K7032-09 «Malvern» (Англия).

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Zetasizer Software». Измерение каждого образца проводили три раза.

*Культивирование клеточных (бактериальных) культур.* Колонии штаммов *Escherichia coli* JM109 (J.Messing, США [162]) или МН1 (M. Hall, США [163]) помещали в 5 мл жидкой среды (Luria-Bertani (рН 7,4) в термостат при 37°C. За 24 часа до экспериментов 500  $\mu$ л клеточной культуры помещали в 8 мл жидкой питательной среды (Luria-Bertani (рН 7,4) и далее в термостат при 37°C без перемешивания (ночная культура).

*Исследование антибактериального действия фторхинолонов на твердых средах* проводили с использованием ночной бактериальной культуры. 500  $\mu$ л второго разведения культуры равномерно распределяли по твердой питательной среде (Luria-Bertani, рН 7,4) на чашке Петри. Спустя 20 мин (после того, как суспензия полностью впитывается в агар) из чашки были удалены диски агара диаметром 9 мм и в образовавшиеся лунки были помещены 50  $\mu$ л исследуемых образцов. Через 30 мин чашки Петри помещали в термостат 37°C. Спустя 24 часа были измерены диаметры зон ингибирования (отсутствия) роста и оценены минимальные ингибирующие концентрации. Эксперименты проводили независимо трижды, полученные значения усреднены и представлены со стандартным отклонением.

*Исследование антибактериального действия фторхинолонов в жидких средах* проводили с использованием ночной бактериальной культуры. Суспензию клеток разбавляли в два раза жидкой средой Luria-Bertani (рН 7,4). К 1,8 мл культуры добавляли 200  $\mu$ л образца. Полученные системы инкубировали при температуре 37°C и перемешивании 100 об/мин в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) в течение 7 дней. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты для измерения поглощения на 600 нм. Для определения числа жизнеспособных клеток (КОЕ) отбирались аликвоты по 50  $\mu$ л, которые разбавляли в  $10^6$  или  $10^7$  раз и высевались на чашках Петри (по три чашки на один образец). Чашки Петри помещались в термостат 37°C на 24 часа, далее производили подсчет КОЕ. Эксперименты проводили независимо трижды, полученные значения усреднены и представлены со стандартным отклонением.

*Просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ).* Микрофотографии суспензии частиц (рН 4,0) были получены с использованием микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония) и напряжением 100 кВ. Оценку размеров частиц проводили путем обработки полученных микрофотографий с помощью программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0.

Для ультраструктурных исследований бактерий 1 мл ночной культуры осаждали центрифугированием (Eppendorf Minispin, 7000 об/мин, 5 мин). Полученные осадки зафиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на 100 мМ растворе какодилата

натрия при слабом перемешивании в течение 24 часов при +4°C с последующей постфиксацией 1% раствором тетроксидом осмия на 100 мМ растворе какодилата натрия в течение 1 часа при +4°C. Далее клетки обезвоживали, проводя через серию растворов этанола с повышающейся концентрацией (50% - 70% - 96%). Для дополнительного контрастирования в 70% спирт добавляли 2% уранилацетата и выдерживали в течение 24 часов при +4°C. Этанол заменяли на ацетон, а затем переводили образцы в смесь ацетона с эпоксидной смолой (Spi-pon 812, SPI Inc., США), постепенно повышая содержание смолы. После замены на чистую эпоксидную смолу (Spi-pon 812, SPI Supplies) проводили полимеризацию смолы при температуре +70°C в течение 48 часов. Ультратонкие срезы с номинальной толщиной 80 нм готовили с использованием ультрамикротомом Reichert – Jung Ultracut E (США), оснащенного алмазным ножом Diatome Ultra 45. Срезы монтировали на медные сетки с пленкой-подложкой из поливинилформальдегида (формвара). Полученные срезы дополнительно контрастировали 2% раствором уранилацетата (40 мин) и цитратом свинца по Рейнольдсу (3 мин). Образцы бактериальных клеток анализировали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) (ускоряющее напряжение 80 кВ), оснащенном цифровой камерой OSIS Quemesa (Olympus Soft Imaging Systems, Германия).

Для исследования поверхности бактериальных клеток 40 мкл ночной культуры наносили на медную сетку с формваровой подложкой на 45-60 с. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Затем образец быстро промывали PBS (pH 7,4) и наносили 20 мкл 3% раствора фосфовольфрамовой кислоты на 60 с. Жидкость удаляли фильтровальной бумагой и высушивали образец на воздухе. Образцы анализировали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) (ускоряющее напряжение 80 кВ), оснащенном цифровой камерой OSIS Quemesa (Olympus Soft Imaging Systems, Германия) .

Для получения микрофотографии высушенной суспензии частиц на основе β-ЦД образец предварительно инкубировали с 0,1М раствором сульфата меди (II), далее наносили 30 мкл суспензии на подложку на 60 с. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и высушивали образец на воздухе.

Для исследования адсорбции частиц на бактериальных клетках 1 мл ночной бактериальной культуры центрифугировали (Eppendorf Minispin, 7000 об/мин, 5 мин), далее полученный осадок растворяли в 200 мкл 5 мг/мл частиц, обработанных 0,1М сульфатом меди (II). Суспензию клеток с частицами инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20 BIOSAN (Латвия) при перемешивании 100 об/мин при 37°C в течение часа. Аликвота в 40 мкл образца высушивалась на формваровой пленке на медной сетке без последующего контрастирования.

Высушенную суспензию бактериальных клеток и/или частиц анализировали на электронном микроскопе JEM-1400 (80 кВ), оснащенным цифровой камерой OSIS Quemesa. *Адсорбция частиц на бактериальных клетках* проводилась с использованием бактериальной культуры *Escherichia coli*, которую культивировали в жидкой среде Luria-Bertani (pH 7,4) в течение 24 часов. 900  $\mu$ л культуры центрифугировали (Eppendorf Minispin, 7000 об/мин, 5 мин) и трижды промывали стерильным натрий-фосфатным буфером (pH 7,4). Далее к клеточному осадку добавляли 200  $\mu$ л образца. После перемешивания систему помещали в шейкер-инкубатор ES-20 BIOSAN (Латвия) 37°C на 1 час. Далее образцы центрифугировали (Eppendorf Minispin, 7000 об/мин, 5 мин) и регистрировали спектры эмиссии флуоресценции супернананта.

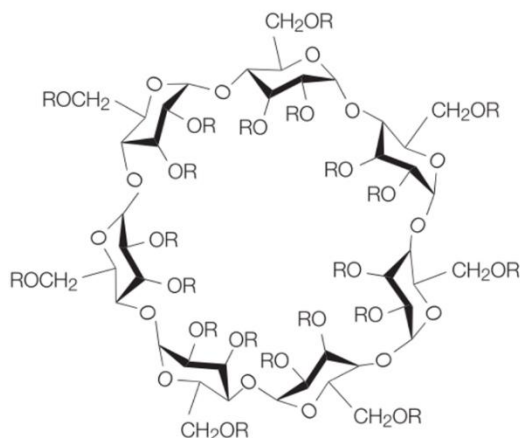
## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Исследование механизма взаимодействия фторхинолонов с производными $\beta$ -циклодекстринов

#### 3.1.1. Определение констант диссоциации комплексов фторхинолонов с производными $\beta$ -циклодекстрина спектроскопическими методами

Для изучения механизма образования комплексов включения ФХ с производными  $\beta$ -циклодекстрина были получены комплексы трех фторхинолонов цiproфлоксацина (ЦФ), левофлоксацина (ЛФ) и моксифлоксацина (МФ) с различными производными  $\beta$ -ЦД. При сравнении структурных особенностей молекул исследуемых ФХ важно отметить, что ЦФ и МФ отличаются преимущественно структурой гетероцикла, в то время как ЛФ имеет наиболее крупный хинолоновый остов за счет третьего сочлененного кольца (Рисунок 1, Таблица 12).

Для выявления влияния типа и природы заместителя в  $\beta$ -ЦД на термодинамическую стабильность и структуру комплексов в качестве лигандов использовались 2-гидроксипропил- $\beta$ -ЦД (ГП- $\beta$ -ЦД) с полярным незаряженным заместителем, метил- $\beta$ -ЦД (М- $\beta$ -ЦД) с неполярным заместителем и сульфобутиловый эфир  $\beta$ -ЦД (СБЭ- $\beta$ -ЦД) с полярным заряженным заместителем (Рисунок 15).



Циклодекстрин	R	n
ГП- $\beta$ -ЦД	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ или H	0,5 – 1,3
М- $\beta$ -ЦД	$-\text{CH}_3$ или H	1,5 – 2,1
СБЭ- $\beta$ -ЦД	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$ или H	1,0 – 1,5

Рисунок 15. Структуры используемых производных  $\beta$ -циклодекстрина с диапазоном степени замещения водорода n в одном D-глюкопиранозном звене.

Заместитель в лиганде имеет особое значение, поскольку может участвовать в образовании дополнительных взаимодействий с функциональными группами ФХ, и, следовательно, оказывать влияние на эффективность комплексообразования и структуру комплекса. Так, метильные группы М- $\beta$ -ЦД могут образовывать гидрофобные



взаимодействия с ароматической структурой и/или гетероциклом ФХ, а отрицательно заряженная сульфо- группа СБЭ-β-ЦД и гидроксильные группы ГП-β-ЦД могут образовывать водородные связи с молекулами ФХ.

Для исследования процесса образования комплексов ФХ с производными β-ЦД использовался классический аналитический метод УФ-спектроскопии. Известно, что связывание фторхинолонов в комплекс с производными β-ЦД сопровождается изменением молярного коэффициента поглощения лекарства в УФ-области, что было продемонстрировано на примере комплекса офлоксацина с ГП-β-ЦД [90].

Производные β-ЦД не имеют УФ-спектров, в то время как в УФ-спектрах ФХ наблюдается ярко выраженная полоса поглощения с максимумами интенсивности в интервале 270-300 нм, что соответствует поглощению ароматического остова лекарственных молекул (Рисунок 16.А). Для ЦФ, ЛФ и МФ в кислых условиях  $\lambda_{\text{макс}}$  составляет 277, 287 и 295 нм соответственно. Данные пики представляются релевантными для анализа содержания препарата в растворе (Рисунок 15.Б).

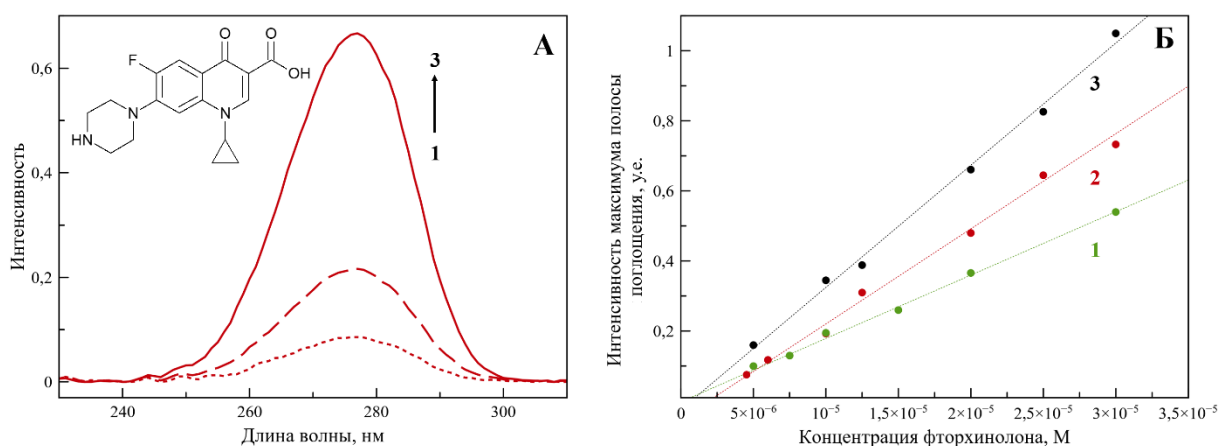


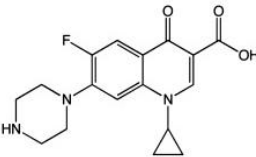
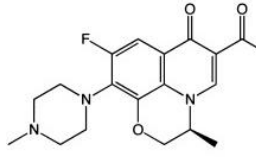
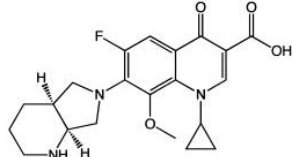
Рисунок 16. А. УФ-спектр ципрофлоксацина в концентрации 4 мкМ (1), 10 мкМ (2) и 25 мкМ (3) при рН 4,0, 25°С. Б. Калибровочная зависимость для левофлоксацина (1), ципрофлоксацина (2) и моксифлоксацина (3) на основе максимумов полос поглощения 287, 277 и 295 нм, соответственно, при рН 4,0, 25°С.

Для оптимизации условий получения комплексов было изучено влияние рН, температуры и времени инкубации на эффективность комплексообразования, которое определяли по изменению интенсивности пиков в УФ-спектре ФХ.

Молекула ФХ имеет ряд функциональных групп, состояние которых зависит от рН раствора, что может оказывать значительное влияние на процесс образования комплекса. Карбоксильная группа ФХ имеет  $pK_a$  в диапазоне 5,2 – 6,3, а азот гетероцикла

характеризуется  $pK_b$  7-9,6 [164]. Основные физико-химические параметры лекарственных препаратов ЦФ, ЛФ и МФ приведены в Таблице 13. При физиологических pH (7,4) ФХ представляют собой цвиттер ионы, а при кислых условиях лекарственная молекула имеет протонированную карбоксильную группу и положительно заряженный гетероцикл.

Таблица 13. Структуры и параметры ципрофлоксацина, левофлоксацина и моксифлоксацина [165–167].

Фторхинолон	Ципрофлоксацин	Левофлоксацин	Моксифлоксацин
Структурная формула			
Mr, г/моль	331	360	401
$pK_a$	6,16	5,7	6,13
$pK_b$	8,63	8,0	9,61
$\text{Log}P_{\text{октано́л/вода}}$ (pH 7,4; 25°C)	-0,89	-0,5	-0,28

В Таблице 14 приведены изменения в интенсивности УФ-спектра МФ при связывании с М-β-ЦД в различных условиях. При исследовании влияния ионного состояния ФХ на эффективность комплексообразования с β-ЦД установлено, что в кислых условиях (pH 4,0) наблюдаются более значимые изменения в интенсивности УФ-спектра лекарственной молекулы по сравнению с нейтральными средами (pH 7,4). Действительно, согласно литературным данным, ЦД образуют комплексы преимущественно с однозаряженными молекулами, а не цвиттер ионами [168], поэтому далее получение комплексов осуществлялось при pH 4,0.

При варьировании температуры и времени инкубации было обнаружено, что нагревание системы ФХ-ЦД до 37°C позволяет достичь более эффективного комплексообразования. Кроме того, наиболее существенные изменения в интенсивности УФ-спектра ФХ характерны при инкубации в течение 60 мин. Данные условия (pH 4,0, инкубирование комплекса при температуре 37°C в течение 60 мин) использовались далее для получения всех комплексов ФХ-носитель ЦД.

Таблица 14. Влияние условий инкубации комплекса моксифлоксацина с метил-β-циклодекстрина на положение и интенсивность полосы поглощения фторхинолона в УФ-спектре.

	Влияние pH раствора		Влияние температуры инкубации (pH 4,0; 20 мин)			Влияние времени инкубации (pH 4,0; 37°C)		
	4,0 (0,1мМ HCl) $\lambda_{\max} = 295$ нм	7,4 (PBS) $\lambda_{\max} = 289$ нм	25°C	37°C	42°C	20 мин	60 мин	90 мин
МФ+М-β-ЦД (1:1)	25 ± 4	21 ± 5	25 ± 4	28 ± 3	20 ± 3	28 ± 3	30 ± 4	25 ± 4
МФ+М-β-ЦД (1:2)	85 ± 4	64 ± 3	85 ± 4	93 ± 4	85 ± 3	93 ± 4	100 ± 2	95 ± 3

\*В таблице приведены относительные изменения в интенсивности УФ-спектра МФ по сравнению с максимально обнаруженными (которые были приняты за 100%).

Для изучения комплексообразования ФХ с производными β-ЦД были получены спектры растворов, содержащих одно из производных β-ЦД в мольном соотношении ФХ:ЦД в диапазоне от 0,25 до 10. Установлено, что при добавлении лиганда происходит увеличение интенсивности максимума полосы поглощения ФХ (Рисунок 17). Необходимо отметить, что данные изменения усиливаются с увеличением избытка β-ЦД с насыщением при мольном соотношении ФХ:лиганд от 2 до 5.

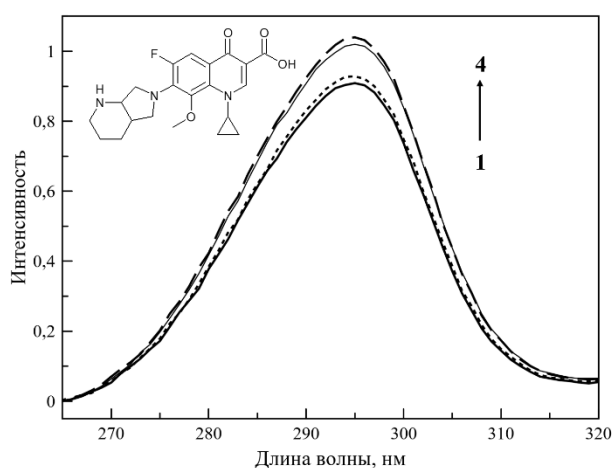


Рисунок 17. УФ-спектры свободного моксифлоксацина (1) и комплексов моксифлоксацина с метил-β-циклодекстрином в мольных соотношениях фторхинолон : β-циклодекстрин = 1:0,5 (2); 1:2 (3); 1:10 (4).  $C_{\text{МФ}} = 27,5$  мкМ.

Для анализа полученных данных использовалось уравнение Бенеси-Гильдебранда:

$$\frac{1}{(I - I_0)} = \frac{K_{\text{дис}}}{(I_{\infty} - I_0)[\text{ЦД}]} + \frac{1}{(I_{\infty} - I_0)} \quad (2)$$

При линейризации данных в координатах  $1/(I - I_0)$  от  $1/[\text{ЦД}]$  были получены  $K_{\text{дис}}$  для комплексов с МФ (Таблица 15). Полученные значения согласуются по порядку величины с литературными данными для комплексов других лекарственных молекул с производными  $\beta$ -ЦД, которые, как правило, лежат в интервале от  $10^{-2}$  до  $10^{-4}$  М ([84,88], Таблица 7).

Таблица 15. Константы диссоциации комплексов моксифлоксацина с производными  $\beta$ -циклодекстрина при pH 4,0, определенные методом УФ-спектроскопии.

	МФ + ГП- $\beta$ -ЦД	МФ + М- $\beta$ -ЦД	МФ + СБЕ- $\beta$ -ЦД
$K_{\text{дис}}, \text{M}^*$	$(2,6 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	$(4,0 \pm 0,9) \times 10^{-5}$	$(3,3 \pm 1,1) \times 10^{-4}$

Однако метод УФ-спектроскопии не позволяет детально установить механизм комплексообразования и структурные характеристики полученных комплексов. Кроме того, изменения в интенсивности полосы поглощения ФХ дают довольно высокую погрешность при расчете  $K_{\text{дис}}$  (порядка 25%). Для установления закономерностей влияния заместителя в  $\beta$ -ЦД на физико-химические свойства комплексов, а также более детального изучения механизма комплексообразования и контроля полученных значений  $K_{\text{дис}}$  применили более информативный метод ИК-спектроскопии Фурье. Данный метод, помимо прочего, позволяет определять такой важный аспект в комплексообразовании: какие функциональные группы со стороны как «гостя», так и «хозяина» задействованы в стабилизации комплекса.

В структуре ФХ можно выделить структурные фрагменты и ряд функциональных групп, способных поглощать в ИК-области: ароматическая структура хинолона, гетероцикл, карбоксильная и карбонильная группы (Рисунок 18). Согласно литературным экспериментальным данным и квантово-механическим расчетам были соотнесены функциональные группы ФХ и полосы поглощения в ИК-спектрах [71,76,169,170].

В ИК-спектре ФХ наиболее интенсивной является полоса поглощения в области  $1550 - 1440 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям связи  $\text{C}-\text{C}_{\text{аром}}$  хинолоновой структуры (Рисунок 18, Таблица 16). За исключением МФ, данная полоса, как правило, состоит из

нескольких перекрывающихся полос. Так, в случае ЦФ наблюдается выраженное расщепление полосы на два пика: 1493 и 1460  $\text{см}^{-1}$ .

Также в ИК-спектре ФХ наблюдаются менее интенсивные полосы поглощения в диапазоне волновых чисел 1045 - 1040  $\text{см}^{-1}$ , 1630 - 1620  $\text{см}^{-1}$  и 1730 - 1700  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям C-F, C=O в карбонильной группе и COOH, соответственно. Менее интенсивные многокомпонентные полосы поглощения в области 1400 - 1350  $\text{см}^{-1}$  соответствуют колебаниям C-N связи гетероцикла ФХ.

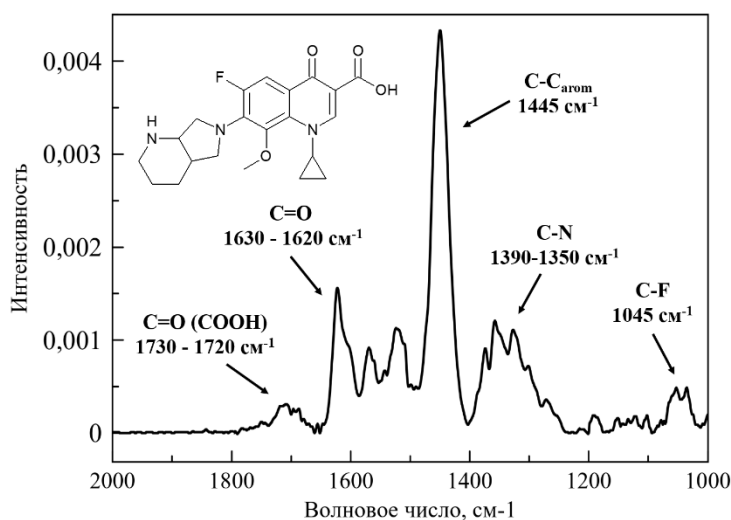


Рисунок 18. ИК-спектр моксифлоксацина в концентрации 3,2 мМ, рН 4,0. Стрелками показано соотнесение функциональных групп моксифлоксацина с полосами поглощения.

Таблица 16. Положения основных полос поглощения фторхинолонов в ИК-спектре ( $\text{см}^{-1}$ ), рН 4,0 [71,76,169,170].

	Ципрофлоксацин	Левофлоксацин	Моксифлоксацин
C-C <sub>аром</sub>	1550 - 1420	1474	1445
C-F	1040	1041	1045
C=O	1630	1618	1630 - 1620
COOH	1710	1708	1705
C-N	1400 - 1350	1420 - 1320	1390 - 1350

В ИК-спектрах производных  $\beta$ -ЦД (Рисунок 19) аналитически значимые полосы поглощения находятся в области волновых чисел 1250 - 900  $\text{см}^{-1}$ . Наиболее интенсивная полоса поглощения 1100-1000  $\text{см}^{-1}$  соответствует колебанию C-O-C гликозидной связи. Также присутствуют низкоинтенсивные полосы поглощения в диапазоне 3000 - 2750  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям метиленовых и метильных групп. Для СБЭ- $\beta$ -ЦД также

наблюдается интенсивная полоса поглощения в области  $1250 - 1190 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям  $-\text{SO}_3^-$  групп.

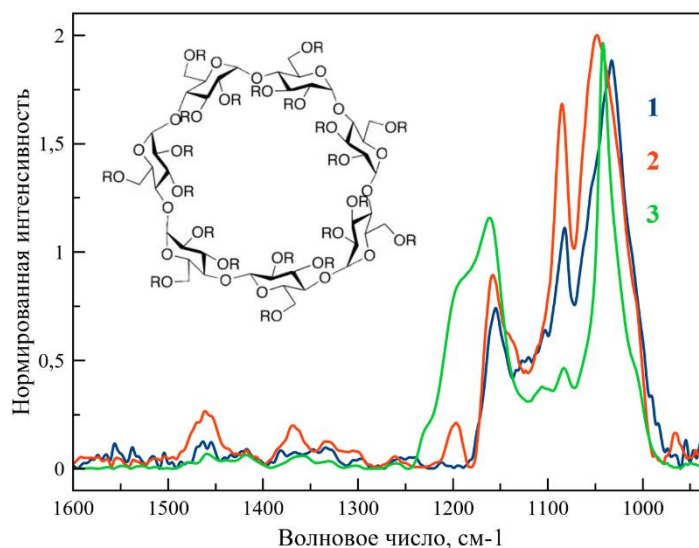


Рисунок 19. Нормированные ИК-спектры 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина (1), метил-β-циклодекстрина (2) и сульфобутилового эфира β-циклодекстрина (3), рН 4,0.

В ИК-спектрах комплексов ФХ с производными β-ЦД наблюдается снижение интенсивности основных полос поглощения ФХ, что указывает на вовлеченность указанных функциональных групп в образовании комплекса (Рисунок 20.А). Наиболее выраженные изменения характерны для области поглощения  $1550-1440 \text{ см}^{-1}$ , соответствующей колебаниям  $\text{C}-\text{C}_{\text{arom}}$  хинолоновой структуры ФХ.

При анализе интенсивности данной полосы поглощения ФХ в зависимости от мольного избытка лиганда были получены изотермы сорбции (Рисунок 20.Б). С помощью линейризации изотерм в координатах Скэтчарда были получены значения  $K_{\text{дис}}$  комплексов (Таблица 17). Необходимо отметить, что значения  $K_{\text{дис}}$  для комплексов МФ (Таблица 14) согласуются со значениями, полученными методом УФ-спектроскопии. Кроме того, в координатах Скэтчарда график пересекает ось абсцисс в единице, что указывает на существование одного основного центра связывания ФХ в комплексе с производными β-ЦД. Поскольку ЦД образуют комплексы за счет включения гидрофобного фрагмента в свою липофильную полость, то, по-видимому, механизм образования комплексов ФХ-ЦД обусловлен заглублением хинолонового остова лекарственной молекулы в полость ЦД.

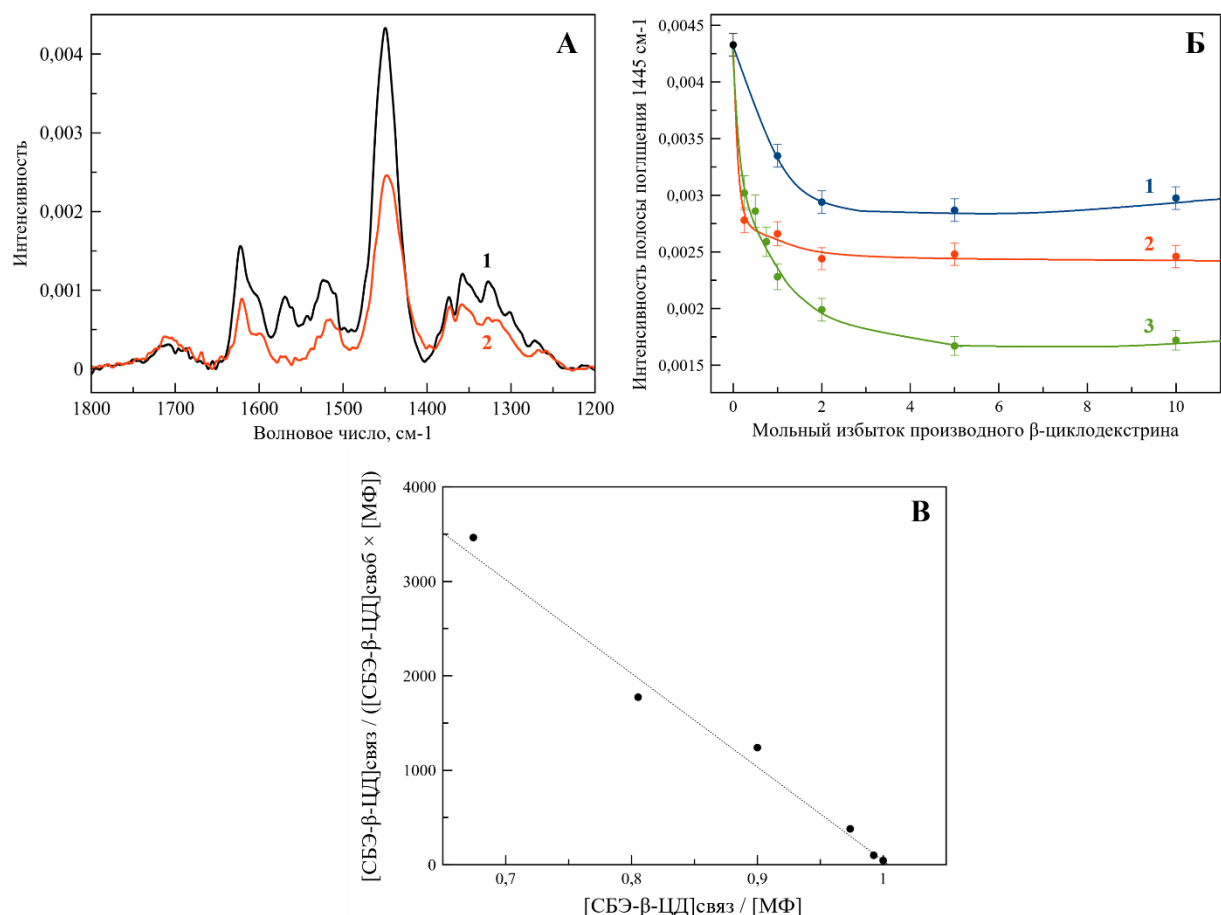


Рисунок 20. А. ИК-спектр свободного моксифлоксацина (1) и моксифлоксацина в комплексе с метил-β-циклодекстрином в мольном соотношении 1 : 2 (2). Б. Изотермы сорбции моксифлоксацина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином (1), метил-β-циклодекстрином (2) и сульфобутиловым эфиром β-циклодекстрина (3) при рН 4,0. В. типичный график в координатах Скэтчарда.

Таблица 17. Значения констант диссоциации комплексов фторхинолонов с производными β-циклодекстрина при рН 4,0, определенные методом ИК-спектроскопии, М.

	<b>Ципрофлоксацин</b>	<b>Левифлоксацин</b>	<b>Моксифлоксацин</b>
ГП-β-ЦД	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-3}$
М-β-ЦД	$(7,7 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-5}$
СБЭ-β-ЦД	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-4}$

Значения  $K_{\text{дис}}$  комплексов находятся в диапазоне значений  $10^{-3} - 10^{-5}$  М, что согласуется с литературными данными (Таблица 7). Необходимо отметить, что наименее прочные комплексы образуются для фторхинолона ЦФ. Так как ЦФ отличается от МФ и ЛФ преимущественно структурой гетероцикла и заместителем у С-8, то данные

функциональные группы (третье кольцо, сочлененное с хинолоновым остовом, в случае ЛФ и метокси группа в случае МФ), по-видимому, участвуют в формировании дополнительных взаимодействий с производным  $\beta$ -ЦД, что способствует снижению значения  $K_{\text{дис}}$  для комплексов МФ и ЛФ.

При изучении влияния заместителя в  $\beta$ -ЦД на эффективность связывания с ФХ, установлено, что наиболее прочные комплексы МФ и ЛФ образуют с М- $\beta$ -ЦД с гидрофобным заместителем и СБЭ- $\beta$ -ЦД с заряженным заместителем по сравнению с ГП- $\beta$ -ЦД с полярным незаряженным заместителем. Такой результат указывает на большую вовлеченность метильного и сульфобутилового заместителей в формировании дополнительных взаимодействий с ФХ (предположительно гетероциклом МФ и ЛФ): гидрофобных и электростатических.

Важно отметить, что в случае ЦФ наиболее стабильный комплекс образуется с ГП- $\beta$ -ЦД. Возможно, за счет небольшого размера молекулы ЦФ сильнее загибается в полость лиганда по сравнению с МФ и ЛФ, обуславливая большую площадь гидрофобных взаимодействий между «гостем» и «хозяином». Высокое значение  $K_{\text{дис}}$  комплекса ЦФ-СБЭ- $\beta$ -ЦД может быть обусловлено отсутствием электростатических взаимодействий между сульфо- группой лиганда и заряженным гетероциклом ЦФ, что еще раз указывает на особую роль гетероцикла ФХ в дополнительной стабилизации комплекса.

Необходимо отметить, что помимо изменения в интенсивности спектра при комплексообразовании ФХ с производными  $\beta$ -циклодекстрина, наблюдаются изменения в тонкой структуре полос в области поглощения -СООН ( $1730 - 1700 \text{ см}^{-1}$ ) группы. Например, в случае МФ исчезает полоса поглощения депротонированной группы  $1580 \text{ см}^{-1}$  (Рисунок 20.А). Поскольку комплексы с ЦД преимущественно образуются с однозаряженными молекулами (но не с цвиттер-ионами), то в полость ЦД включается только молекулы ФХ с протонированной -СООН группой, что сдвигает ионное равновесие свободных ФХ в сторону протонированной карбоксильной группы. В итоге наблюдается снижение интенсивности полосы депротонированной карбоксильной группы в ИК-спектре МФ. Кроме того, наблюдается появление более выраженного плеча пика полосы поглощения С=О группы ФХ  $1630 - 1600 \text{ см}^{-1}$  в области меньших  $1620 - 1600 \text{ см}^{-1}$  (Рисунок 20.А).

Данные изменения указывают на вовлеченность -СООН и С=О групп в образовании комплекса ФХ-ЦД, возможно посредством загибания ароматического фрагмента ФХ в полость ЦД со стороны незаряженной карбоксильной группы.

Примечательно, что при образовании комплексов ЦФ-ЦД не наблюдается изменений в структуре полос поглощения С-N связей ЦФ  $1400 - 1350 \text{ см}^{-1}$ , что указывает



на расположение гетероцикла ЦФ вне полости лиганда, а также отсутствие дополнительных взаимодействий между гетероциклом ЦФ и заместителями в ЦД. Для ЛФ и МФ, напротив, наблюдаются существенные изменения в тонкой структуре полос поглощения 1400 - 1350  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям С-N связи. По-видимому, в отличие от ЦФ для ЛФ и МФ особую роль в образовании комплекса имеет заряженный гетероцикл, который может образовывать дополнительные связи с заместителями  $\beta$ -ЦД (например, электростатических в случае СБЭ- $\beta$ -ЦД), что увеличивает прочность комплекса (Таблица 17).

При образовании комплекса МФ с М- $\beta$ -ЦД, характеризующегося наименьшим значением  $K_{\text{дис}}$  для МФ, также наблюдаются изменения в структуре полосы 1445  $\text{см}^{-1}$ , соответствующей ароматическому остову (Рисунок 21.А, Б).

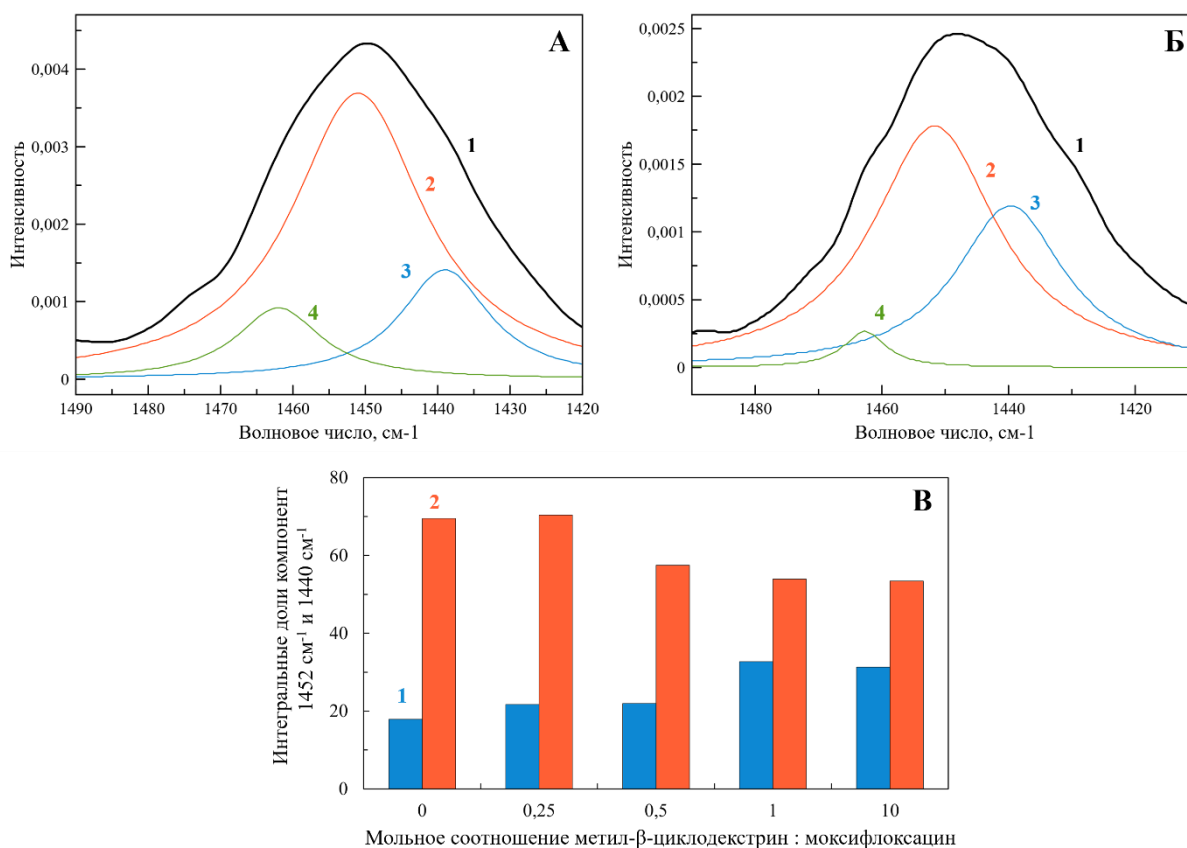


Рисунок 21. Деконволюция полосы поглощения 1445  $\text{см}^{-1}$  в ИК-спектре свободного моксифлоксацина (А) и моксифлоксацина в комплексе с метил- $\beta$ -циклодекстрином в мольном соотношении 1: 10 (Б). Исходный спектр (1), основные компоненты полосы 1452  $\text{см}^{-1}$  (2) и 1440  $\text{см}^{-1}$  (3), минорная компонента пика 1463  $\text{см}^{-1}$  (4). В. Интегральные доли основных компонент 1452  $\text{см}^{-1}$  (1) и 1440  $\text{см}^{-1}$  (2) в зависимости от мольного соотношения фторхинолон : метил- $\beta$ -циклодекстрина.

При деконволюции данной полосы в ИК-спектре свободного МФ были обнаружены две основные компоненты 1440 и 1452  $\text{см}^{-1}$ , а также минорная компонента 1463  $\text{см}^{-1}$ . С увеличением мольного избытка М- $\beta$ -ЦД происходит перераспределение интегральных долей основных компонент в ИК-спектре МФ (Рисунок 21.В): наблюдается увеличение доли компоненты 1440  $\text{см}^{-1}$  за счет уменьшения доли компоненты 1452  $\text{см}^{-1}$ . Столь выраженные изменения в тонкой структуре полосы 1445  $\text{см}^{-1}$  указывает на значительное изменение микроокружения ароматического остова МФ.

Для более детального анализа данного эффекта было исследовано влияние природы растворителя на структуру полосы поглощения ароматического остова ЦФ в области 1550 – 1420  $\text{см}^{-1}$ , который имеет наиболее сложную структуру полосы среди других ФХ: в водной среде наблюдаются две выраженные компоненты 1494  $\text{см}^{-1}$  и 1460  $\text{см}^{-1}$  (Таблица 18). Смена растворителя на более гидрофобный (ацетонитрил) приводит к появлению третьей компоненты в области 1485-1460  $\text{см}^{-1}$ , а также выраженному сдвигу полосы 1460  $\text{см}^{-1}$  в сторону меньших длин волн на 14  $\text{см}^{-1}$ . Таким образом, низкочастотная компонента полосы поглощения ароматического остова ФХ (1460-1440  $\text{см}^{-1}$ ) является чувствительной и аналитически значимой при изменении микроокружения данного фрагмента на более гидрофобное.

Таблица 18. Положение полос поглощения ароматического фрагмента цифпрофлокацина в области 1550 – 1420  $\text{см}^{-1}$  в ИК-спектре в различных растворителях,  $\text{см}^{-1}$ .

ЦФ в 0,1 mM HCl	1494	1470 (плечо полосы 1460)	1460
ЦФ в CH <sub>3</sub> CN	1494	1468	1446

Увеличение интегральной доли компоненты 1440  $\text{см}^{-1}$  в ИК-спектре МФ при образовании комплекса с М- $\beta$ -ЦД (Рисунок 21) указывает на переход в более гидрофобную область и заглубление ароматической структуры МФ в полость ЦД. Изменения в интегральных долях компонент полосы были обнаружены только для комплекса МФ-М- $\beta$ -ЦД, что возможно связано с наиболее глубоким погружением МФ в полость М- $\beta$ -ЦД (наиболее гидрофобным микроокружением) по сравнению с другими комплексами МФ.

Ранее было показано, что производные  $\beta$ -ЦД более эффективно образуют комплексы с катионной формой ФХ в кислых средах (Таблица 14). Для более детального исследования влияния ионного состояния ФХ на механизм образования комплексов с ЦД были

проанализированы ИК-спектры ЛФ в комплексах с ГП-β-ЦД, полученные в разных условиях: при рН 7,4 и при рН 4,0 (Рисунок 22).

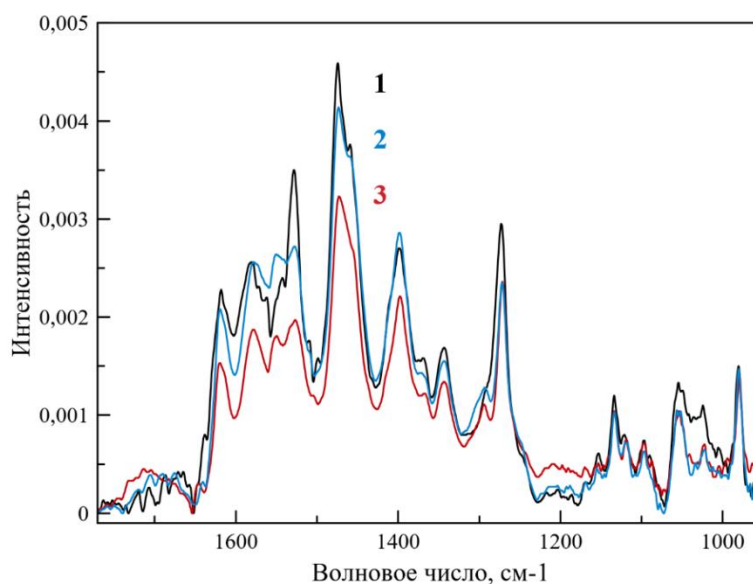


Рисунок 22. ИК-спектр свободного левофлоксацина (1) и левофлоксацина в комплексе с ГП-β-ЦД в мольном соотношении фторхинолон-циклодекстрин = 1 : 5 при рН 7,4 (2) и рН 4,0 (3),  $C_{\text{ЛФ}}=1$  мг/мл.

При получении комплекса в нейтральных условиях наблюдаются аналогичные изменения в ИК-спектре ФХ, что были характерны и при низких значениях рН: уменьшение интенсивности всех основных полос поглощения ФХ. Однако данные изменения менее выражены по сравнению с кислыми условиями.

Полученные результаты указывают на одинаковый механизм формирования комплексов ФХ-ЦД при разных значениях рН, однако более эффективное комплексообразование наблюдается в кислых условиях, что подтверждает как литературные данные (о преимущественном включении однозаряженных молекул в полость ЦД [168]), а также ранее полученные результаты методом УФ-спектроскопии (Таблица 15).

Таким образом, согласно результатам ИК-спектроскопии при образовании комплексов ФХ с производными β-ЦД происходят изменения в интенсивности всех основных полос поглощения ФХ. Данные изменения указывают на участие ароматического остова ФХ,  $C=O$ ,  $-COOH$  и гетероцикла во взаимодействии с производными β-ЦД. Наиболее выраженные изменения характерны для области поглощения хинолонового остова ФХ, а также структур полос, соответствующих колебаниям в  $-COOH$  и  $-C=O$ . По-

видимому, образование комплекса происходит посредством заглубления ароматического фрагмента ФХ со стороны карбоксильной группы внутрь липофильной полости производного  $\beta$ -ЦД.

Из полученных данных также следует, что комплексы ФХ-ЦД стабилизируются не только гидрофобными взаимодействиями между хинолоновым фрагментом ФХ и полостью ЦД, но и дополнительными взаимодействиями между функциональными группами ФХ, которые находятся вне полости ЦД, и заместителями ЦД. По-видимому, природа и количество дополнительных связей обуславливают различия в значениях  $K_{дис}$ . Так, в случае ЛФ и МФ наблюдаются изменения в области поглощения, соответствующей колебаниям C-N связи, что свидетельствует об участии гетероцикла в стабилизации комплексов и, следовательно, более низких значениях  $K_{дис}$ .

Для более детального изучения структуры комплекса, а также выявления роли гетероцикла ФХ в дополнительной стабилизации комплексов, использовался метод молекулярной динамики.

### **3.1.2. Исследование структуры комплексов с помощью методов молекулярного моделирования**

На сегодняшний день определены лишь некоторые аспекты структуры комплексов фторхинолонов с  $\beta$ -ЦД и его производными методом молекулярного моделирования. Согласно литературным данным, включение ФХ в полость  $\beta$ -ЦД осуществляется со стороны бóльшего диаметра тора. Большинство авторов [101,171,172] проводило исследования с незаряженными молекулами ФХ, для которых было установлено, что образование комплекса происходит за счет включения гетероцикла лекарственной молекулы внутрь полости  $\beta$ -ЦД. Однако в работе [171] продемонстрировано только частичное включение N-метилпиперазинового фрагмента офлоксацина в полость  $\beta$ -ЦД. А авторы [173] продемонстрировали минимум энергии комплекса норфлоксацина с  $\beta$ -ЦД, при котором происходит погружение не гетероцикла, а ароматической области ФХ, в полость лиганда. Т.е. данные о структуре комплексов ФХ-ЦД противоречивы. При этом в литературе не установлено влияние ионного состояния ФХ (однозаряженная молекула или цвиттер-ион) и роль заместителя в  $\beta$ -ЦД на взаимодействия между «гостем» и «хозяином».

С целью детального анализа молекулярного механизма комплексообразования и уточнения структуры комплексов была произведена молекулярная динамика комплексов МФ и ЛФ с тремя изучаемыми производными  $\beta$ -ЦД. Особое внимание было уделено роли гетероцикла ФХ в процессе образования комплекса, а также формировании дополнительных связей между «гостем» и «хозяином». Кроме того, с целью определения

роли заместителя в ЦД на эффективность связывания ФХ было исследовано влияние природы и типа заместителя лиганда на виды возможных взаимодействий в комплексе ФХ-ЦД: водородных связей в случае ГП- $\beta$ -ЦД (с полярным незаряженным заместителем), гидрофобных в случае М- $\beta$ -ЦД (неполярными заместителями) и электростатических в случае СБЭ- $\beta$ -ЦД (заряженными заместителями).

Для изучения влияния заряда ФХ на включение МФ и ЛФ в гидрофобную полость  $\beta$ -ЦД в данной работе было проведено компьютерное моделирование ФХ при разных значениях рН 4,0 и 7,0, т.е. для положительно заряженных форм и цвиттер-ионов ФХ, соответственно. Молекула ФХ располагалась вблизи полости лиганда посредством ручного докинга. После помещения комплекса в сферу, состоящую из молекул воды, и компенсации зарядов, была проведена молекулярная динамика.

По результатам компьютерного моделирования в кислых средах (рН = 4,0; ФХ находится в протонированной форме) происходит заглубливание  $-\text{COOH}$  группы и ароматического остова ФХ внутрь гидрофобных полостей всех производных  $\beta$ -ЦД (Рисунок 23). При этом хинолоновый фрагмент МФ располагается не строго перпендикулярно полости  $\beta$ -ЦД, а под углом (Рисунок 23.А-В), что, по-видимому, обуславливает максимальную площадь гидрофобных взаимодействий.

Гидрофобный остов ЛФ, напротив, строго перпендикулярен плоскости олигосахаридного кольца, и его положение не зависит от заместителя в  $\beta$ -ЦД. Однако, интересно отметить, что, в отличие от комплексов МФ, сопряженная ароматическая система ЛФ сильнее заглубливается в полость  $\beta$ -ЦД (Рисунок 23.Г-Е).

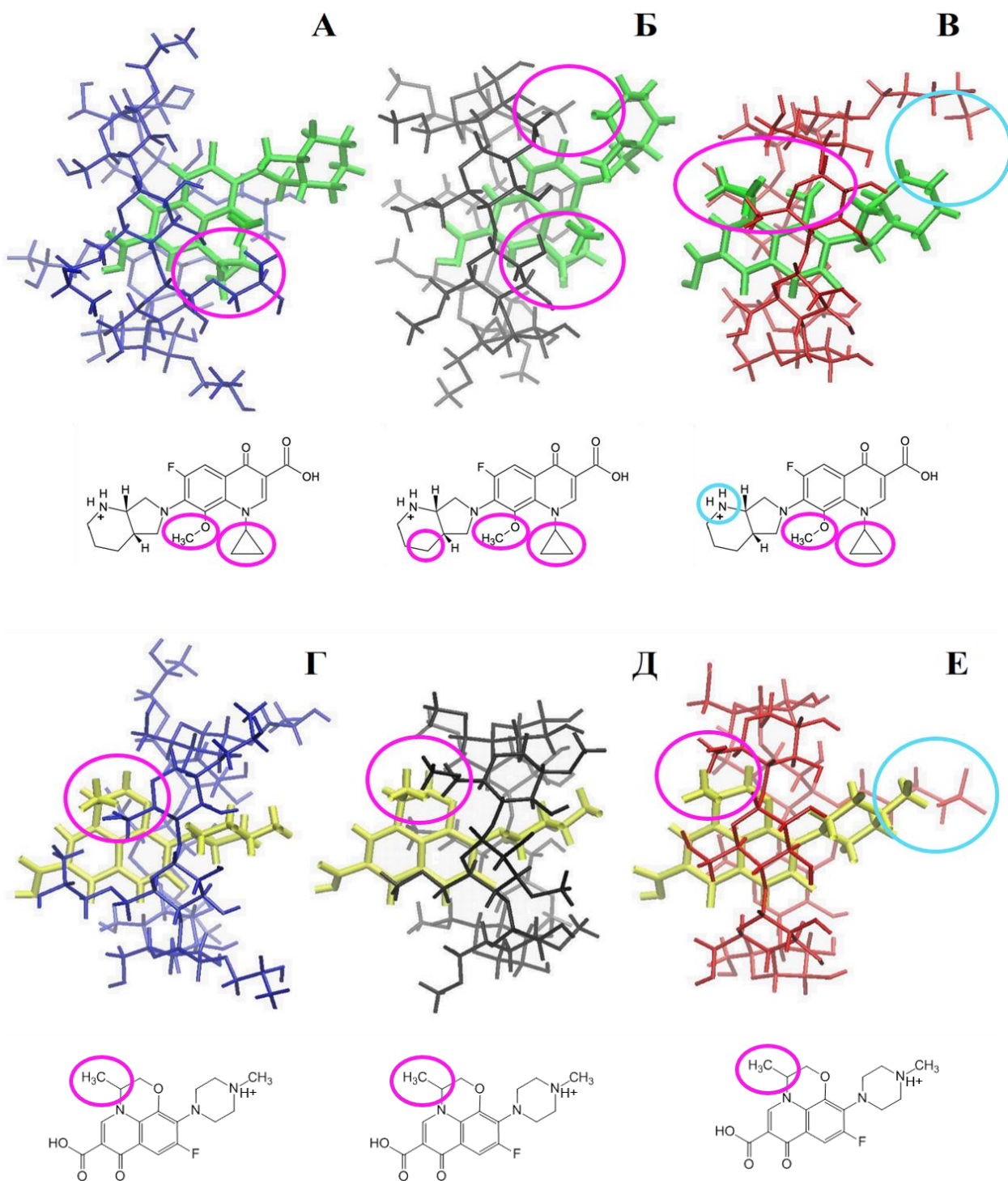


Рисунок 23. Структуры комплексов моксифлоксацина (зеленый) и левофлоксацина (желтый) с 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином (синий), метил- $\beta$ -циклодекстрином (черный) и сульфобутиловым эфиром  $\beta$ -циклодекстрина (красный) при pH 4,0. Розовым и голубым цветами показано участие функциональных групп фторхинолонов в гидрофобных и электростатических взаимодействиях, соответственно, с заместителями лиганда.

Дополнительно комплексы стабилизируются гидрофобными взаимодействиями между заместителями в производном  $\beta$ -ЦД и циклопропановым кольцом и метокси группой

МФ или метильным заместителем в третьем кольце ЛФ хинолонового фрагмента. Полученные данные подтверждают ранее сформулированное предположение об участии заместителей у С-8 МФ и ЛФ в стабилизации комплексов.

В зависимости от типа производного  $\beta$ -ЦД в формировании дополнительных связей принимают участие разные функциональные группы: гидроксипропил- в случае ГП- $\beta$ -ЦД, метил- в случае М- $\beta$ -ЦД, и  $\text{CH}_2\text{OH}$  группы в случае СБЭ- $\beta$ -ЦД. Важно отметить, что только в случае комплексообразования с М- $\beta$ -ЦД также происходит формирование гидрофобных взаимодействий между метильными группами М- $\beta$ -ЦД и ароматическим остовом обоих ФХ. Столь сильное изменение микроокружения ароматического остова МФ в комплексе с М- $\beta$ -ЦД также было обнаружено при исследовании тонкой структуры полосы  $1445\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре МФ (Рисунок 21), где наблюдалось перераспределение интегральных долей компонент полосы при образовании комплекса с М- $\beta$ -ЦД (уменьшение доли компоненты  $1452\text{ см}^{-1}$  за счет увеличения доли компоненты  $1440\text{ см}^{-1}$ ). Таким образом, полоса поглощения  $1445\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре МФ является высокочувствительной к изменению микроокружения хинолонового фрагмента лекарства и отражает участие гидрофобных метильных заместителей М- $\beta$ -ЦД в формировании дополнительных взаимодействий с ароматической частью МФ.

Помимо гидрофобных взаимодействий в стабилизации комплексов также принимают участие водородные связи: со стороны меньшего диаметра ЦД карбоксильные группы ФХ взаимодействует с молекулами воды, которые в свою очередь связаны «флуктуационными» (относительно нестабильными) водородными связями с  $-\text{CH}_2\text{OH}$  группами производных  $\beta$ -ЦД.

Со стороны большего радиуса ЦД располагается протонированный (заряженный) гетероцикл ФХ, который также образует водородные связи с  $-\text{CH}_2\text{OH}$  группами ЦД через сеть Н-связей молекул воды.

В случае МФ наблюдались конформационные изменения в гетероцикле в зависимости от заместителя в  $\beta$ -ЦД (Рисунок 23.А-В): образование комплекса с ГП- $\beta$ -ЦД не приводит к изменению положения гетероцикла, а в случае СБЭ- $\beta$ -ЦД гетероцикл МФ изменяет свое положение и образует «флуктуационную» электростатическую связь с сульфо- группой СБЭ- $\beta$ -ЦД. По-видимому, образование энергетически выгодной ионной связи приводит к дополнительной стабилизации комплекса:  $K_{\text{дис МФ + СБЭ-}\beta\text{-ЦД}} < K_{\text{дис МФ + ГП-}\beta\text{-ЦД}}$  (Таблица 16). Комплексообразование с М- $\beta$ -ЦД приводит к заметному наклону гетероцикла МФ для формирования множественных гидрофобных взаимодействий между  $-\text{CH}_2-$  группами гетероцикла МФ и метильными заместителями М- $\beta$ -ЦД. Таким образом, комплекс с М- $\beta$ -ЦД имеет наиболее компактную структуру.

В случае ЛФ гетероцикл не изменяет своего положения вне зависимости от заместителя в производном  $\beta$ -ЦД, однако также способен взаимодействовать с сульфогруппой СБЭ- $\beta$ -ЦД, что было обнаружено и для МФ.

Только для комплексов МФ со всеми производными  $\beta$ -ЦД обнаружено изменение в структурах самих лигандов: происходит сжатие тора вдоль плоскости кольца ЦД. Поскольку ароматический остов МФ располагается в полости ЦД под наклоном, возможно, сжатие тора связано с увеличением гидрофобных взаимодействий между хинолоновым фрагментом МФ и углеводородными фрагментами D-глюкопиранозных остатков производных  $\beta$ -ЦД. Вследствие данного эффекта диаметр внутренней полости тора всех производных  $\beta$ -ЦД уменьшается приблизительно на 1 Å (Рисунок 24).

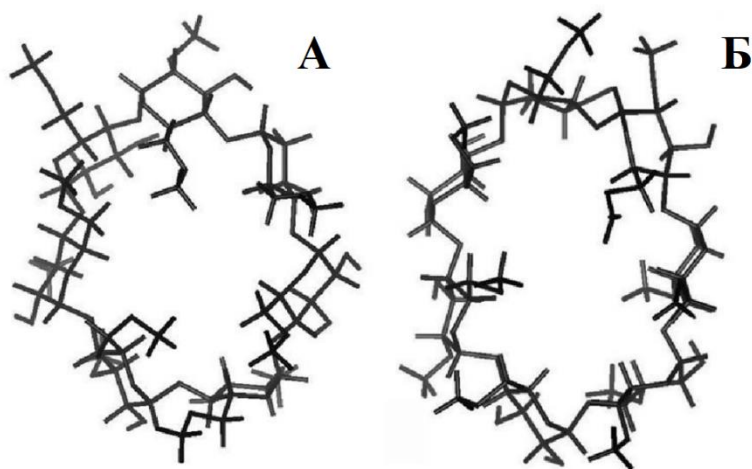


Рисунок 24. Структура олигосахаридного тора свободного М- $\beta$ -ЦД (А) и М- $\beta$ -ЦД в комплексе с моксифлоксацином (Б) при рН 4,0.

В нейтральных средах (рН 7,0) ФХ представляет собой цвиттер ион ( $-\text{COO}^-$  группы и положительный заряд на азоте гетероцикла). По данным компьютерного моделирования в данных условиях механизм образования комплекса схож с ранее полученными данными при рН 4,0: заглупление карбоксильной группы и ароматического остова фторхинолона внутрь гидрофобной полости  $\beta$ -ЦД. Однако для ЛФ наблюдается только частичное погружение ФХ в полость  $\beta$ -ЦД (карбоксильная группа и часть первого ароматического кольца), в то время как для МФ ароматический остов проникает и «выходит» со стороны меньшего диаметра тора  $\beta$ -ЦД. Стабилизация комплексов осуществляется преимущественно благодаря гидрофобным взаимодействиям между циклопропановым кольцом МФ или  $\text{CH}_3$ - группой третьего кольца ЛФ с углеводородными фрагментами заместителей  $\beta$ -ЦД. А в случае комплекса ЛФ-СБЭ- $\beta$ -ЦД не наблюдается образование электростатической связи между протонированным гетероциклом ЛФ и сульфогруппой



СБЭ-β-ЦД. Важно отметить, что для всех рассмотренных систем при рН 7,0 гетероцикл ФХ почти не участвует в формировании дополнительных связей, стабилизирующих комплекс.

Следовательно, при рН 7,0 образование комплексов характеризуется аналогичным механизмом, как и при рН 4,0: заглупление ароматического остова ФХ со стороны карбоксильной группы внутрь полости β-ЦД, при этом функциональные группы лекарственных молекул участвуют в формировании дополнительных взаимодействий с заместителями β-ЦД (гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых, Н-связей). Однако, поскольку молекула ФХ представляет собой цвиттер-ион, то образованный комплекс имеет несколько другую структуру, которая не обеспечивает формирование всех типов взаимодействия между «гостем» и «хозяином», необходимых для образования устойчивой системы. Полученные результаты подтверждают литературные данные, что включение цвиттер-ионов в гидрофобную полость β-ЦД происходит менее предпочтительно, по сравнению с однозарядными молекулами [168].

Таким образом, при изучении механизма взаимодействия ФХ с производными β-ЦД, а также структуры комплексов, было установлено, что образование комплекса происходит за счет включения ароматического фрагмента ФХ со стороны карбоксильной группы внутрь гидрофобной полости тора β-ЦД. Дополнительная стабилизация комплексов осуществляется посредством образования водородных связей -СООН группой и гетероциклом ФХ с -ОН группами β-ЦД; гидрофобных взаимодействий циклопропанового кольца МФ или метильной группы третьего кольца ЛФ с -СН<sub>2</sub>- группами β-ЦД. В случае СБЭ-β-ЦД возможно образование электростатических взаимодействий между положительно заряженным гетероциклом ФХ и сульфо- группой СБЭ-β-ЦД.

### **3.2. Влияние образования комплексов включения с производными β-циклодекстрина на физико-химические и функциональные свойства фторхинолонов**

В данном разделе исследовано влияние образования комплексов ФХ-ЦД на ряд физико-химических свойств лекарственных препаратов: растворимость, кинетику высвобождения и взаимодействие с модельной клеточной мембраной – липосомальным бислоем. Установление закономерностей влияния ЦД на данные параметры лекарств необходимо для направленного регулирования свойств ФХ и разработки высокоэффективной фармацевтической формы ФХ с улучшенными фармакокинетическими параметрами.

### 3.2.1. Растворимость фторхинолонов

Многие лекарственные препараты имеют невысокую или низкую растворимость в воде, а также низкую скорость растворения лекарственной субстанции, что снижает биодоступность и ограничивает их применение. Известно, что ЦД способны увеличивать растворимость лекарственных препаратов в несколько раз [112]. Значительное увеличение скорости растворения комплекса МФ с ГП-β-ЦД было продемонстрировано в работе [78]. В этом исследовании комплексы получали в сухом виде с использованием сверхкритических флюидных технологий или лиофилизации.

Для изучения влияния образования комплекса с ЦД на растворимость ФХ в водных растворах без дополнительных стадий, в данной работе изучались ЛФ и ЦФ, а также их комплексы с ГП-β-ЦД. Исследование проводили в кислых (рН 4,0) и нейтральной среде (рН 7,4) для однозарядного и цвиттер-ионного состояний свободного ФХ, соответственно.

Согласно Таблице 19 растворимость свободного ЦФ и ЛФ при нейтральных рН ниже, чем в кислых средах, что согласуется с литературными данными: ФХ характеризуется минимумом растворимости при рН 7-8 [165,174].

Таблица 19. Растворимость (мг/мл) свободных фторхинолонов их комплексов с ГП-β-ЦД при рН 4,0 и 7,4 в зависимости от времени инкубации при 37°C.

Время	рН 4,0 (HCl)			рН 7,4 (PBS)		
	5 мин	15 мин	120 мин	5 мин	15 мин	120 мин
ЦФ	10,2±1,0	11,3±1,0	12,6±1,0	6,5±1,0	7,2±1,0	7,5±1,0
ЦФ + ГП-β-ЦД	13,5±1,0	14,5±1,0	15,0±1,0	9,2±1,0	11,1±1,0	12,3±1,0
ЛФ	17,9±1,0	18,9±1,0	19,6±1,0	17,9±1,0	22,9±1,0	26,9±1,0
ЛФ + ГП-β-ЦД	31,2±1,0	31,2±1,0	31,2±1,0	32,4±1,0	36,2±1,0	37,1±1,0
МФ*	13,4±1,0	16,1±1,0	25±1,0	5,8±1,0	13,4±1,0	32±1,0
МФ + ГП-β-ЦД*	22±1,0	22±1,0	35±1,0	34,4±1,0	34±1,0	37±1,0

\* - данные по растворимости МФ и лиофилизованного комплекса МФ+ГП-β-ЦД [78].

Образование комплексов ФХ с ГП-β-ЦД обуславливает значительное увеличение растворимости лекарственных молекул как в кислых, так и в нейтральных средах. Например, в случае ЦФ для финальных образцов (120 минут инкубации) наблюдается увеличение растворимости препарата на 19% при рН 4,0 и на 64% при рН 7,4.

При сравнении полученных результатов с влиянием ГП-β-ЦД на растворимость МФ [78] важно отметить, что более выраженное увеличение растворимости всех ФХ в

комплексе с ГП-β-ЦД наблюдается для нейтральных значениях рН, что важно для разработки лекарственных формуляций для парентерального введения. Кроме того, даже в случае длительной инкубации свободного ФХ (от 2 часов до суток) невозможно достичь значений растворимости лекарств, характерных для комплексов ФХ-ЦД, значит предельная (истинная) растворимость ФХ в комплексах с ЦД существенно выше.

При визуализации процесса растворения ФХ методом оптической микроскопии (Рисунок 25) было установлено, что образование комплексов ФХ-ЦД также обуславливает существенное увеличение скорости растворения ФХ. Данный эффект наблюдается уже в течение первых 5-15 минут после смешения компонентов.

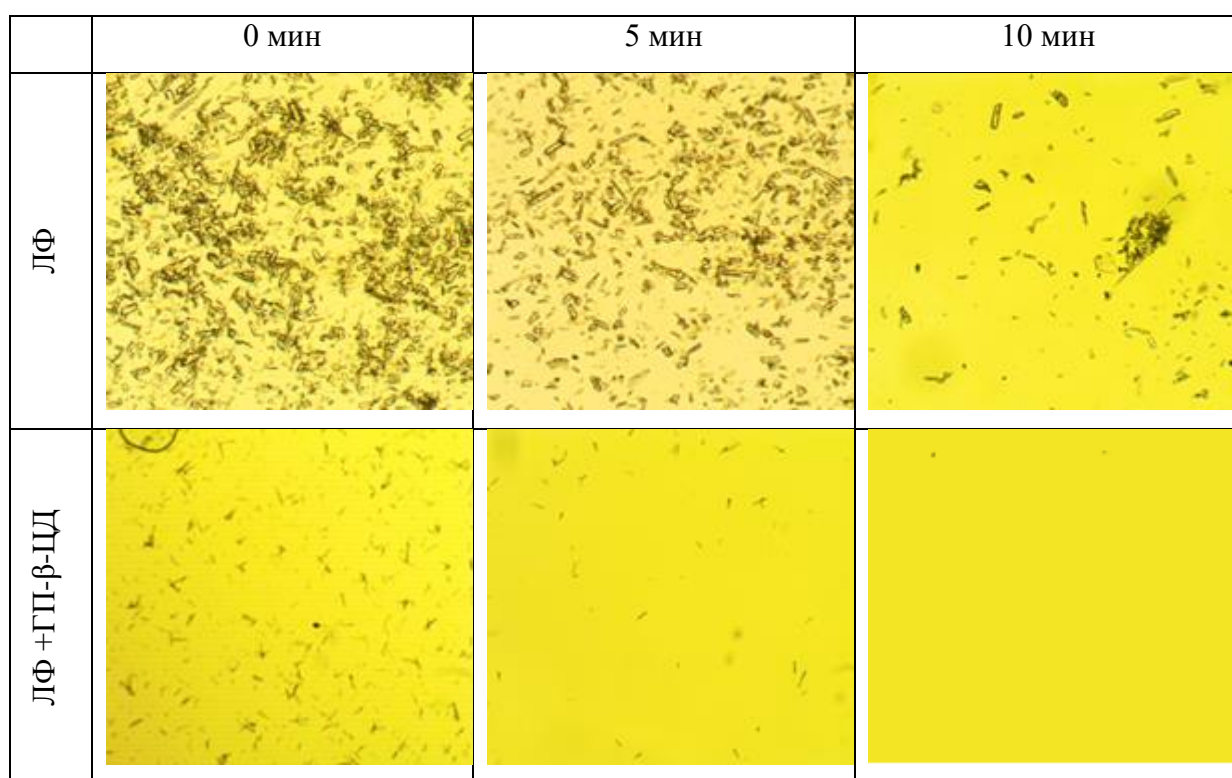


Рисунок 25. Визуализация растворения левофлоксацина и его комплекса с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином при рН 7,4, с использованием светового микроскопа, 40 кратное увеличение.

Таким образом, производные β-ЦД являются перспективными для разработки лекарственных формуляций ФХ с улучшенной растворимостью и скоростью растворения препарата, что может обуславливать увеличение биодоступности ФХ.

### 3.2.2. Взаимодействие производных $\beta$ -циклодекстрина с липосомальным бислоем

Для увеличения биодоступности и улучшения проникновения лекарственных молекул сквозь биологические барьеры необходимо не только увеличение растворимости препарата, но и усиление его взаимодействия с поверхностью клеток, в первую очередь с липидной мембраной.

Как было рассмотрено ранее, многие антибактериальные препараты, в том числе и ФХ, проникают в клетку преимущественно за счет пассивной диффузии. При инкапсуляции лекарства в носитель необходимо исследовать в первую очередь взаимодействие носитель-бислой, поскольку адсорбция макромолекул на мембране может оказывать существенные изменения в физико-химическом состоянии бислоя: проницаемости, микровязкости, скорости латеральной диффузии липидных молекул и скорости «флип-флопа». Нарушение целостности мембраны может обуславливать усиление взаимодействия лекарства с мембраной и, как следствие, улучшение проникновения лекарственных молекул внутрь клеток [175,176].

Известно, что ЦД не способны преодолевать биологические барьеры. Для исследования взаимодействия ЦД с мембраной удобно использовать модельные липидные везикулы – липосомы [177,178]. Олигосахариды могут адсорбироваться на поверхности бислоя и экстрагировать различные фосфолипиды и холестерин, что может приводить к возникновению дефектов в бислое. Для появления выраженных дефектов в бислое необходимо наличие нескольких гидрофобных заместителей в ЦД, а также высокие концентрации [177]. Так, авторами [179] было показано, что произвольно метилированный ЦД извлекает липиды из клеточной стенки *Mycobacterium sp.* При этом наблюдается ингибирование роста бактериальной культуры при концентрациях ЦД выше 100мМ.

Поскольку ЦД могут обуславливать изменения в состоянии бислоя, то можно ожидать, что образование комплексов ФХ-ЦД способно повлиять на эффективность взаимодействия ФХ с бислоем и, как следствие, транспорта лекарственных препаратов сквозь бислой, что может привести к увеличению биодоступности лекарства.

Исследование влияния заместителя ЦД на величину возникающих дефектов в бислое, а также на взаимодействие ФХ с поверхностью бислоя, проводилось на двухкомпонентных анионных липосомах, состоящих из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и кардиолипина (КЛ), в массовом соотношении 80%:20%. Данная система позволяет в определенном приближении моделировать бислой плазматической мембраны, где липидный состав гетерогенный.

Липиды и производные ЦД не имеют спектров поглощения в УФ- и видимой

области, а также спектров флуоресценции, поэтому для исследования влияния ЦД на проницаемость и целостность липосомального бислоя везикулы загружаются различными красителями (флуорексоном [180], 6-карбоксифлуоресцином [181] и др.). В данной работе в качестве красителя был выбран фенолфталеин (ФФ), который изменяет свою окраску в зависимости от pH раствора. Загруженные ФФ липосомы при pH 7,4 (прозрачный раствор) помещались в диализный мешок и во внешний раствор с pH 10,7. Высвобождение ФФ из липосом сопровождалось появлением малиновой окраски внешнего раствора, интенсивность которой определялась методом УФ-спектроскопии (Рисунок 26.А).

Для липосом, загруженных ФФ, наблюдается постепенное высвобождение индикатора: за 2 часа высвобождается 40% красителя (Рисунок 26.Б). В качестве контрольной системы, где происходит полное высвобождение ФФ, использовали Тритон X-100 (поверхностно активное вещество, разрушающее липидный бислой). Обнаружено, что при добавлении к липосомам Тритона X-100 происходит полное разрушение липосом, и 100% ФФ высвобождается уже за 15 минут.

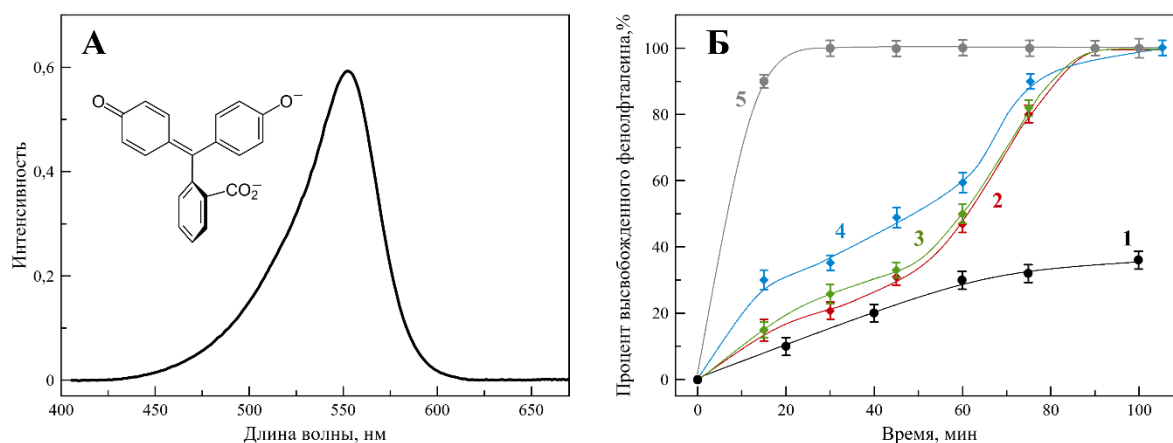


Рисунок 26. А. УФ-спектр фенолфталеина в концентрации 0,01 мМ, pH 10,7. Б. Кинетика высвобождения фенолфталеина, загруженного в липосомы ДПФХ:КЛ=80%:20% (Слипидов = 5 мг/мл), во внешний раствор, (1), под действием метил-β-циклодекстрина (2), 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина (3), сульфобутилового эфира β-циклодекстрина (десятикратный мольный избыток олигосахарида относительно липидов) (4) и Тритона X-100 (0,4% по массе в растворе) (5), pH 10,7, 37°C.

Присутствие производных β-ЦД в системе оказывает существенное влияние на проницаемость липидного бислоя. Добавление ЦД к загруженным липосомам приводит к значительному увеличению скорости высвобождения красителя, по сравнению с контролем: 100% ФФ высвобождается за 90 минут. Таким образом, производные ЦД, действительно, обуславливают нарушение целостности мембраны скорее всего за счет

образования дефектов в бислое. Наиболее выраженное ускорение высвобождения ФФ наблюдается в присутствии ГП-β-ЦД. Для объяснения этого эффекта необходимо отметить, что на начальном участке времени механизм взаимодействия ЦД с бислоем обусловлен, в первую очередь, адсорбцией молекул олигосахарида на поверхности мембраны, например, за счет формирования Н-связей с фосфатными группами липидов [177,178]. Поэтому степень влияния производного ЦД на кинетику высвобождения ФФ обусловлена взаимодействием заместителей ЦД с поверхностью липосом.

По сравнению с другими производными ЦД в структуре ГП-β-ЦД наблюдается наибольшее количество гидроксильных групп, которые могут взаимодействовать с фосфатными группами липидов. Усиление адсорбции ЦД может обуславливать впоследствии большее количество дефектов в мембране.

Возникновение дефектов в бислое под действием ЦД может способствовать мирконарушениям целостности мембраны, что впоследствии, может привести к изменению проницаемости липидного бислоя для лекарственных молекул. Для изучения влияния ЦД на взаимодействие ФХ с липосомальным бислоем был использован метод спектроскопии кругового дихроизма (КД). Данный метод представляется удобным для анализа микросостояния лекарственной молекулы, которая имеет хиральные центры, в то время как липосомы и ЦД не имеют собственных КД-спектров.

ЛФ имеет выраженный минимум в КД-спектре при длине волны 301 нм (Рисунок 27.А). Изменение ионного состояния молекулы и ее микроокружения может приводить к изменению положения минимума. Так, раствор ЛФ в более гидрофобном растворителе (в ДМСО) приводит к сдвигу КД-спектра в сторону больших длин волн на 4 нм. Поскольку образование комплексов ФХ-ЦД происходит за счет погружения ароматического остова в полость ЦД (более гидрофобное окружение), то следует ожидать аналогичный сдвиг КД-спектра. Действительно, образование комплексов ЛФ-ЦД приводит к сдвигу КД-спектра ЛФ в сторону больших длин волн на 1 нм (Рисунок 27.Б).

Напротив, при добавлении ЛФ к липосомам наблюдается сдвиг в сторону меньших длин волн (Рисунок 27.А), что по-видимому, связано с изменением ионного состояния ФХ. Такой эффект может быть обусловлен адсорбцией ЛФ на поверхности везикул за счет формирования электростатических взаимодействий между протонированным гетероциклом ЛФ и фосфатными группами липидов. Действительно, при изучении липосомальной формуляции МФ нами было показано, что взаимодействие МФ, содержащего заряженную аминогруппу гетероцикла, с фосфатными группами липидов приводит к схожим изменениям в КД-спектре ФХ [37]. Насыщение поверхности липосом

молекулами ЛФ достигается при трёхкратном мольном избытке ФХ - наблюдается максимальный сдвиг спектра на 7 нм (Рисунок 27.Б).

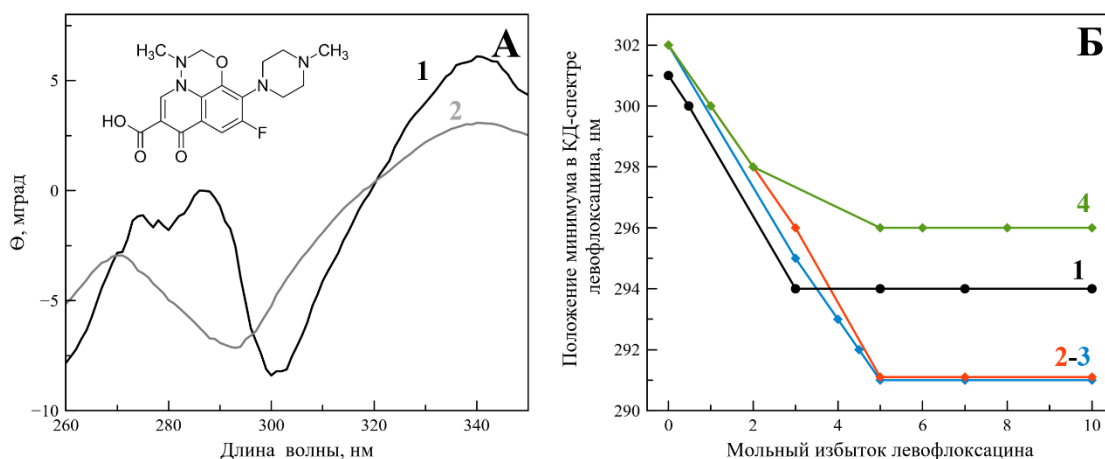


Рисунок 27. А. КД-спектр свободного левофлоксацина в концентрации 2мМ (1) и левофлоксацина, адсорбированного на поверхности анионных липосом (2),  $C_{\text{липидов}} = 5$  мг/мл, рН 7,4. Б. Изменение положения минимума в КД-спектре левофлоксацина в свободном (1) или связанном виде с метил- $\beta$ -циклодекстрином (2), 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином (3) и сульфобутиловым эфиром  $\beta$ -циклодекстрина (4) при добавлении к суспензии липосом в зависимости от мольного избытка препарата, рН 7,4.

При добавлении комплексов ЛФ-ЦД к липосомам для всех производных ЦД наблюдались аналогичные изменения в положении КД-спектра ЛФ, которые были обнаружены и для свободного ЛФ: сдвиг полосы поглощения в синюю область. При этом для комплекса ЛФ-СБЭ- $\beta$ -ЦД сдвиг КД-спектра менее выражен, чем в случае свободного ЛФ (Рисунок 27.Б). Такой эффект скорее всего обусловлен преобладанием сил отталкивания отрицательно заряженных сульфо- групп СБЭ- $\beta$ -ЦД от анионной поверхности липосом.

Для комплексов ЛФ с М- $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД, напротив, сдвиг КД-спектра ФХ становится более выраженным по сравнению со свободным ЛФ, что указывает на более эффективное взаимодействие ЛФ с поверхностью липидных везикул. При этом насыщение поверхности липосом наблюдается для мольного избытка ЛФ равного 5, т.е. образование комплексов приводит к увеличению числа центров связывания ФХ на липидной мембране, вероятно, за счет образования дефектов в бислое в случае комплексов с М- $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД.

Для подтверждения предположения об усилении адсорбции ЛФ-ЦД на поверхности липосом по сравнению со свободным ЛФ был исследован  $\zeta$ -потенциал липосом в

присутствии ЛФ или его комплексов с ЦД.

Анионные липосомы характеризуются отрицательным  $\zeta$ -потенциалом  $-21$  мВ, в то время как ЛФ и ЛФ-ЦД имеют  $\zeta$ -потенциал  $\sim 0$  мВ. При добавлении к липосомам раствора ЛФ или его комплекса наблюдаются противоположные тенденции: в случае свободного ЛФ наблюдалось уменьшение  $\zeta$ -потенциала до  $-34$  мВ, а при внесении ЛФ-ЦД  $\zeta$ -потенциал увеличивался до  $-12 \div -5$  мВ.

Для объяснения данного эффекта важно отметить, что при рН 7,4 ЛФ представляет собой цвиттер-ион (Таблица 13). Адсорбция лекарственных молекул на поверхности липосом с помощью электростатических взаимодействий между протонированным гетероциклом и фосфатными группами липидов должна сопровождаться либо отсутствием изменений  $\zeta$ -потенциала везикул, либо его уменьшением за счет высокой концентрации экспонированных в раствор  $-\text{COO}^-$  групп ФХ, адсорбированных на поверхности липосом. Однако в составе комплексов ФХ-ЦД карбоксильная группа ФХ погружена в полость ЦД и не доступна для взаимодействия с бислоем, поэтому добавление комплексов ЛФ-ЦД к липосомам может сопровождаться экранированием отрицательного поверхностного заряда (увеличение  $\zeta$ -потенциала).

Таким образом, производные  $\beta$ -ЦД обуславливают определенные нарушения в целостности липосомального бислоя. Адсорбция ЦД на поверхности везикул и образование дефектов в мембране могут обуславливать значительное увеличение адсорбции ФХ на бислое, чего не достигается в случае свободного лекарства. В целом, для ГП- $\beta$ -ЦД характерно наибольшее влияние на целостность бислоя и выраженное усиление взаимодействия ЛФ с липидной мембраной, в то время как для СБЭ  $\beta$ -ЦД эти эффекты наиболее мягкие за счет отталкивания отрицательно заряженных сульфо- групп от анионной поверхности везикул.

### **3.2.3. Кинетика высвобождения фторхинолонов из комплексов с производными $\beta$ -циклодекстрина с использованием модельной полупроницаемой мембраны**

Исследование кинетики высвобождения ФХ из систем доставки является необходимой частью исследования для разработки лекарственной формуляции пролонгированного действия. В работе исследовали кинетику высвобождения ФХ из полупроницаемой мембраны методом равновесного диализа в различных условиях ( $T=37^\circ\text{C}$ , рН 4,0 или рН 7,4). Регистрация свободного ФХ во внешнем растворе осуществлялась методом УФ-спектроскопии (Рисунок 28).



Установлено, что для свободных ФХ вне зависимости от рН равновесие достигается быстро: 100% свободного ФХ высвобождается в среднем за 30-40 минут. При изучении кинетики высвобождения ФХ из комплексов с производными  $\beta$ -ЦД при рН 2,0 и 4,0 установлено, что комплексообразование приводит к замедлению высвобождения ФХ через диализную мембрану на 20-30% в течение первых 20 минут (Рисунок 28). 100% свободного лекарства высвобождается в течение часа.

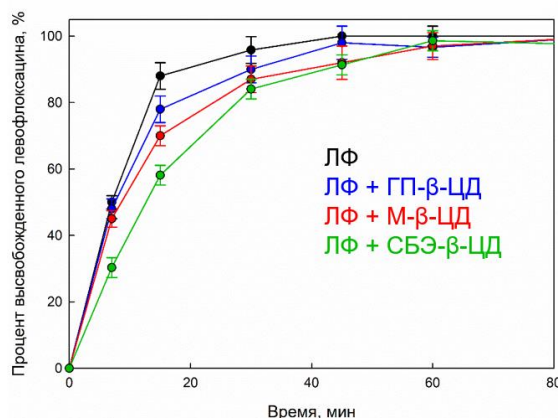


Рисунок 28. Кривые высвобождения левофлоксацина как свободного, так и связанного в комплекс с ГП-β-ЦД, СБЭ-β-ЦД и М-β-ЦД, мольное соотношение циклодекстрин:фторхинолон = 1:1, рН 4,0, 37°C.

Высвобождение ФХ из комплекса в нейтральных условиях исследовали при первоначальном получении комплекса в рН 4,0, когда реализуется наиболее эффективное комплексообразование, и последующей смене рН на 7,4. Согласно полученным данным изменения в кинетике высвобождения ФХ при смене рН не наблюдается. Кроме того, методом ИК-спектроскопии обнаружено, что комплекс не изменяет своей структуры [71].

Интересно отметить, что степень замедления высвобождения ФХ из комплексов коррелирует со значениями  $K_{дис}$  (Таблица 17): чем ниже константа диссоциации комплекса, тем более сильное замедление кинетики ФХ (Рисунок 28). Однако в целом образование комплекса с производными  $\beta$ -ЦД не приводит к значительному изменению профиля высвобождения лекарства.

Таким образом, образование комплексов ФХ с производными  $\beta$ -ЦД приводит к замедлению кинетики высвобождения лекарства на начальном участке времени исследования (30-40 минут) в среднем на 20-40%. Степень высвобождения ФХ коррелирует со значениями  $K_{дис}$  ФХ+ЦД: для комплексов ФХ-ЦД со значениями  $K_{дис}$   $10^{-4}$  –  $10^{-5}$ М наблюдается наиболее выраженное замедление.

Однако, согласно литературным данным, комплексы лекарство-ЦД быстро диссоциируют при сильном разбавлении, в частности, в кровотоке [70]. Для увеличения

времени циркуляции лекарственной формы необходимо достижение  $K_{дис} 10^{-5}M$  и менее [116]. С целью разработки системы доставки с более низкими значениями  $K_{дис}$  и, как следствие, более выраженным пролонгированным действием предложено синтезировать полимеры на основе производных  $\beta$ -ЦД. Кроме того, для увеличения времени циркуляции лекарственного препарата в организме, снижения скорости ферментативной деградации и появления замедленного высвобождения размер носителя должен составлять не менее 100 нм [116,182].

### **3.3. Влияние полимеризации производных $\beta$ -циклодекстрина на механизм формирования комплексов с фторхинолонами**

Для определения роли формирования полимерной матрицы ЦД на механизм образования комплексов лиганд-ФХ в работе предложено синтезировать полимеры на основе производных  $\beta$ -ЦД в результате «сшивания» (кросс-линкинга) олигосахаридных торов линкером (сшивающим агентом). Важным аспектом является определение влияния природы заместителя (неполярного, полярного и заряженного) в мономере на структуру и физико-химические свойства полученных полимеров.

Кроме того, формирование надмолекулярной архитектуры носителя очевидно будет оказывать влияние на эффективность и механизм взаимодействия с ФХ. Можно ожидать, что за счет более объемной структуры лиганда ФХ будет взаимодействовать с большим количеством функциональных групп носителя по сравнению с производными  $\beta$ -ЦД. При этом ФХ может взаимодействовать как функциональными группами мономерного звена, так и новыми функциональными группами, образованными в результате синтеза. Таким образом, для полимеров можно ожидать снижения значений  $K_{дис}$  систем лиганд-ФХ за счет многоточечных взаимодействий лекарственной молекулы с полимерной матрицей.

Особый интерес вызывает вопрос о существовании корреляции между свойствами мономеров (производных  $\beta$ -ЦД) и полимеров. Так, будут ли полимеры на основе М- $\beta$ -ЦД и СБЭ- $\beta$ -ЦД с множественными гидрофобными и заряженными заместителями соответственно обладать большим сродством к ФХ, что было характерно для простых производных  $\beta$ -ЦД.

#### **3.3.1. Синтез разветвленных полимеров на основе производных $\beta$ -циклодекстрина**

Синтез полимеров на основе производных  $\beta$ -ЦД осуществлялся посредством взаимодействия гидроксильных групп олигосахаридов с сшивающим агентом 1,6-

гексаметилендиизоцианатом (ГМД) по схеме, представленной на Рисунке 29. Необходимо отметить, что на данной схеме для упрощения показано, что в реакцию вступают только более реакционноспособные первичные гидроксильные группы ЦД, однако вторичные группы также могут принимать участие в синтезе, поэтому синтезированный полимер обладает разветвленной структурой.

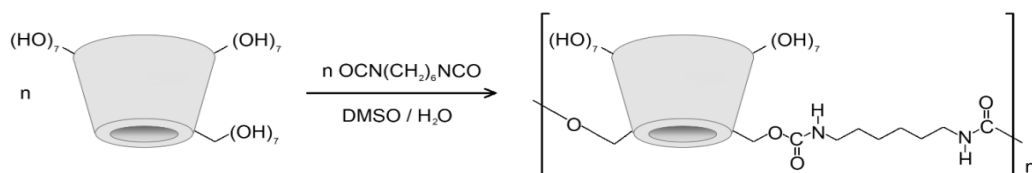


Рисунок 29. Химическая реакция получения полимеров на основе β-циклодекстрина с использованием 1,6-гексаметилендиизоцианата в качестве линкера.

ГМД был выбран в качестве сшивающего агента, поскольку позволяет получить разветвленные полимеры на основе β-ЦД с большой площадью поверхности. Формирование пористой структуры образованной алифатическими цепями ГМД способствует дополнительному удерживанию лекарственных молекул в полимерной сетке посредством формирования дополнительных взаимодействий с функциональными группами спейсера [123]. Взаимодействие изоцианатов с гидроксильными группами приводит к образованию биodeградируемых уретановых связей [123,183], которые также могут принимать участие во взаимодействии с ФХ.

В данной работе были получены три серии полимеров на основе ГП-β-ЦД («Г» серия), М-β-ЦД («М» серия) и СБЭ-β-ЦД («С» серия). Исходная концентрация производных β-ЦД составляла 5 мг/мл для получения соединений с небольшим числом мономерных звеньев (до 200) и относительно гибкой структурой для более эффективного связывания ФХ. Среди рассматриваемых в работе производных β-ЦД наибольшее количество гидроксильных групп имеет ГП-β-ЦД, а наименьшее М-β-ЦД (Рисунок 15), поэтому можно ожидать, что ГП-β-ЦД будет обладать наибольшей реакционной способностью, М-β-ЦД наименьшей, а для СБЭ-β-ЦД будут характерны промежуточные свойства.

Для получения водорастворимых частиц с различными физико-химическими свойствами мольный избыток сшивающего агента ГМД варьировали от 1 до 5. Название каждого образца представлено в виде ХУ, где Х – серия («Г», «М» или «С») и У – мольный избыток ГМД.

### 3.3.2. Физико-химические свойства полимеров на основе производных $\beta$ -циклодекстрина

Поскольку связывание молекул  $\beta$ -ЦД приводит к образованию соединений большого размера, то были изучены размеры получаемых частиц методом анализа траектории частиц (NTA), который позволяет получить информацию о среднем гидродинамическом радиусе частиц, их распределение по размерам, а также концентрацию частиц [184].

Согласно Таблице 20, синтезированные полимеры представляют собой относительно гомогенную фракцию со средним гидродинамическим диаметром в диапазоне от 100 до 200 нм, что свидетельствует о том, что синтез осуществлен успешно. Полученные данные были подтверждены с помощью метода динамического рассеяния света (DLS).

Для «М» и «С» серии характерно увеличение диаметра частиц с увеличением мольного избытка ГМД, в то время как для «Г» серии характерен одинаковый размер частиц для всех образцов. Полученные данные свидетельствуют о том, что, возможно, за счет большего количества доступных гидроксильных групп ГП- $\beta$ -ЦД образует максимально возможное количество связей с линкером уже при мольном избытке ГМД равном 1. Для М- $\beta$ -ЦД и СБЭ- $\beta$ -ЦД характерно меньшее количество свободных –ОН групп, что обуславливает увеличение размера частиц с увеличением избытка ГМД за счет присоединения новых мономеров.

Заряд частицы может оказывать сильное влияние на эффективность связывания с ФХ, что было показано на примере образования «флуктуационной» (относительно нестабильной) электростатической связи в комплексе ФХ-СБЭ- $\beta$ -ЦД. Установлено, что свободные ГП- $\beta$ -ЦД и М- $\beta$ -ЦД обладают  $\zeta$ -потенциалом близким к нулю, а для СБЭ- $\beta$ -ЦД характерен отрицательный заряд за счет множественных сульфо- групп.

При изучении  $\zeta$ -потенциала полимеров обнаружено, что с увеличением мольного избытка линкера наблюдается увеличение  $\zeta$ -потенциала образцов «Г» и «М» серий. Рост положительного заряда может быть обусловлен возрастанием концентрации аминокрупп, заряженных в условиях эксперимента (рН 4,0). Аминокруппы образуются вследствие гидролиза свободных (концевых) изоцианатных групп, которые не участвуют в синтезе. Так, образование –NH<sub>2</sub> групп было показано при получении нанокапсул крахмала при модификации диизоцианатом [185,186].

Таблица 20. Физико-химические параметры полимеров, полученных на основе одного из производных  $\beta$ -циклодекстрина.

Производное $\beta$ -ЦД	Образец	Мольный избыток ГМД	Гидродинамический диаметр (рН 4,0), нм	$\zeta$ -потенциал (рН 4,0), мВ	Mr, кДа	Степень полимеризации $\beta$ -ЦД	$K_{дис}$ комплексов с моксифлоксацином, М
ГП- $\beta$ -ЦД (0,5-1,3)*	ГП- $\beta$ -ЦД	0	0,15**	0,6 $\pm$ 0,1	1,5	-	3,3( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-3}$
	Г1	1	130 $\pm$ 15	2,2 $\pm$ 0,9	134 $\pm$ 15	80 $\pm$ 8	7,2( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-4}$
	Г3	3	110 $\pm$ 17	9,2 $\pm$ 1,2	100 $\pm$ 19	67 $\pm$ 11	3,0( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-4}$
	Г5	5	131 $\pm$ 12	16,8 $\pm$ 1,1	120 $\pm$ 13	71 $\pm$ 7	8,1( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-5}$
М- $\beta$ -ЦД (1,5-2,1)*	М- $\beta$ -ЦД	0	0,15**	0,71 $\pm$ 0,1	1,2	-	5,0( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-5}$
	М1	1	90 $\pm$ 12	2,3 $\pm$ 0,1	95 $\pm$ 10	70 $\pm$ 5	8,1( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-4}$
	М3	3	167 $\pm$ 15	22,9 $\pm$ 1,2	164 $\pm$ 16	120 $\pm$ 9	5,2( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-4}$
	М5	5	170 $\pm$ 14	30,8 $\pm$ 1,1	240 $\pm$ 19	183 $\pm$ 11	5,4( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-4}$
СБЭ- $\beta$ -ЦД (1,0 – 1,5)*	СБЭ- $\beta$ -ЦД	0	0,15**	-7,3 $\pm$ 0,8	2,1	-	1,0( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-4}$
	С1	1	140 $\pm$ 17	-9,0 $\pm$ 0,7	103 $\pm$ 10	45 $\pm$ 6	7,7( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-5}$
	С3	3	101 $\pm$ 14	-13,4 $\pm$ 0,9	115 $\pm$ 11	55 $\pm$ 7	5,9( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-6}$
	С5	5	188 $\pm$ 19	-18,7 $\pm$ 1,1	138 $\pm$ 13	66 $\pm$ 7	5,2( $\pm$ 0,3) $\times 10^{-6}$

\* - в скобках указана средняя степень замещения водорода на одно D-глюкопиранозное звено

\*\* - предполагается, что размер производных  $\beta$ -циклодекстрина близок к размеру немодифицированного  $\beta$ -циклодекстрина [70]

Для «С» серии, напротив, наблюдается уменьшение  $\zeta$ -потенциала с увеличением концентрации ГМД, что скорее всего свидетельствует об увеличении количества сульфогрупп в частице, т.е. увеличении степени полимеризации.

При исследовании молекулярной массы полученных соединений ( $M_r$ ), рассчитанной с помощью метода NTA, было обнаружено, что в среднем в синтезированных частицах содержится от 50 до 180 остатков  $\beta$ -ЦД. При этом для «Г» и «С» серий характерно меньшее число остатков  $\beta$ -ЦД (менее 90) по сравнению с «М» серией (от 75 до 183 остатков  $\beta$ -ЦД).

Полимеры «Г» и «С» серии характеризуются близкими значениями  $M_r$  (100 – 140 кДа). При этом значения степеней полимеризации ( $n$ ) не зависят от мольного избытка ГМД. Таким образом, максимальное возможное количество мономеров ГП- $\beta$ -ЦД и СБЭ- $\beta$ -ЦД участвуют в синтезе полимеров уже при мольном избытке ГМД равного 1. Избыток непрореагировавших концевых изоцианатных групп гидролизуеться с образованием аминогрупп на поверхности частицы. Увеличение среднего гидродинамического диаметра полимеров «С» серии может быть обусловлено менее плотной структурой по сравнению с «Г» серией.

Для полимеров «М» серии в целом характерны более высокие значения  $M_r$  (от 100 до 220 кДа). Возможно за счет наименьшего количества –ОН групп (от 1 до 0,5 на одно D-глюкопиранозное звено) увеличение избытка ГМД приводит к увеличению степени полимеризации М- $\beta$ -ЦД, а не плотности его структуры.

Для более детального изучения структуры синтезированных частиц полимеры были исследованы методами ИК- и ЯМР- спектроскопии (Рисунок 30).

Изоцианаты подвергаются гидролизу в водных растворах до первичных аминов, а также могут образовывать полимочевины посредством взаимодействия свободных концевых –N=C=O групп с –NH<sub>2</sub> группами [183]. Для исследования полос поглощения ГМД и состава возможных побочных продуктов в независимом эксперименте был получен ИК-спектр линкера в водно-органической среде (H<sub>2</sub>O : ДМСО = 1 : 1 по объему), в который проводился синтез полимеров. Соотнесение полос проводилось в соответствии с литературными данными [185–188].

В ИК-спектре суспензии ГМД (Рисунок 30.А) присутствует высокоинтенсивная полоса 2270 см<sup>-1</sup> и полоса 1350 см<sup>-1</sup>, соответствующие ассиметричным и симметричным колебаниям –N=C=O связи, соответственно. Также наблюдаются полосы поглощения, соответствующие ассиметричным и симметричным колебаниям –CH<sub>2</sub>- групп, 2945 см<sup>-1</sup> и 2861 см<sup>-1</sup>. Кроме того, в ИК-спектре обнаружены и полосы 1620 см<sup>-1</sup> и 1575 см<sup>-1</sup>, которые соответствуют колебаниям амида I и амида II мочевинных групп, что указывает на

протекание побочных процессов гидролиза ГМД с последующей полимеризацией до полимочевин.

Для анализа влияния взаимодействия мономеров с ГМД на структурные свойства производных  $\beta$ -ЦД на Рисунке 30.Б-В также приведены ИК-спектры полимеров в сравнении с ИК-спектрами мономеров. Важно отметить, что в спектрах всех полимеров отсутствует высокоинтенсивная полоса поглощения  $-N=C=O$  группы, характерная для свободного ГМД. Однако наблюдается возникновение полосы  $951\text{ см}^{-1}$ , соответствующей колебаниям C-N связи, что свидетельствует о гидролизе концевых непрореагировавших изоцианатных групп до первичных аминов, которые обуславливают положительный  $\zeta$ -потенциал частиц (Таблица 20).

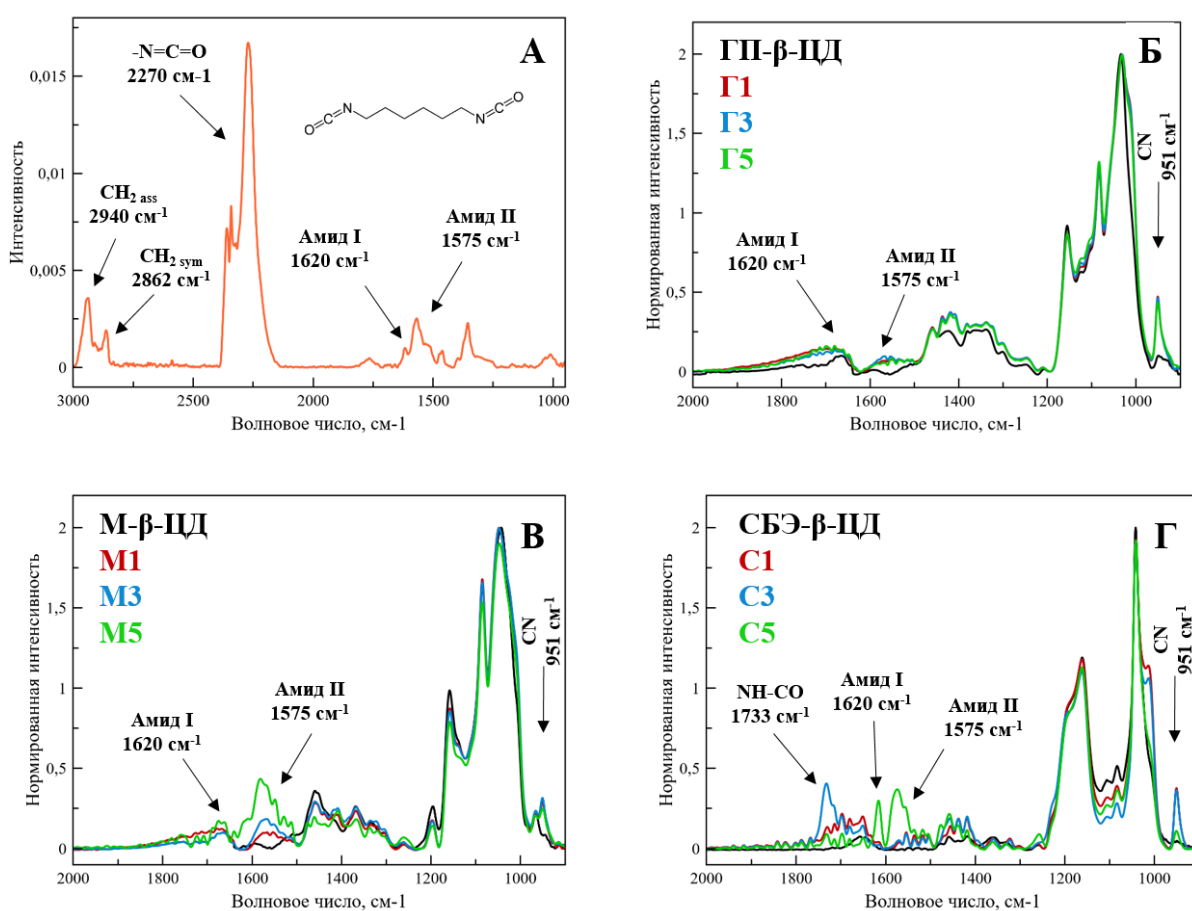


Рисунок 30. А. ИК-спектр 1,6-гексаметилендиизоцианата в водно-органической среде ( $H_2O : ДМСО = 1 : 1$  по объему). Б-Г. Нормированные ИК-спектры полученных полимеров в сравнении с ИК-спектрами мономеров - производных  $\beta$ -циклодекстринов, рН 4,0, 22°C.

Для всех серий полимеров также наблюдается появление плеча полосы поглощения C-O-C связи:  $1033\text{ см}^{-1}$  для «Г» серии,  $1049\text{ см}^{-1}$  для «М» серии и  $1041\text{ см}^{-1}$  для «С» серии, причем данный эффект не зависит от мольного избытка ГМД. Эти изменения, возможно,

связаны с возникновением нового состояния торов ЦД, например, напряжением олигосахаридных циклов ЦД в частицах вследствие ковалентного соединения с линкером.

Взаимодействие с ГМД также приводит к появлению низкоинтенсивных полос в области  $1540 - 1570 \text{ см}^{-1}$  и  $1610 - 1680 \text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют полосам поглощения амид I и амид II дзамещенных мочеви́н. Действительно, согласно литературным данным получение полиуретанов сопровождается побочным процессом с образованием полимочевин, для которых характерна полоса поглощения в диапазоне  $1620 - 1670 \text{ см}^{-1}$  [185,187,188]. Важно отметить, что для «М» серии характерно увеличение интенсивности данных полос с увеличением избытка ГМД, что подтверждает рассмотренные выше данные об увеличении степени полимеризации М-β-ЦД (Таблица 20). Только в ИК-спектрах образцов «С» серии была обнаружена полоса  $1733 \text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям  $\text{NHC=O}$  уретановых связей [188,189].

Полученные данные о структуре синтезированных полимеров были подтверждены методом ЯМР-спектроскопии. Так, в  $^1\text{H}$  ЯМР-спектре СБЭ-β-ЦД (Рисунок 31) наиболее интенсивными пиками являются 2,8 и 1,65 м.д., соответствующие метиленовым протонам сульфобутилового заместителя. Сигналы в области 4,0-3,2 м.д. и дублет 5,09 и 4,96 м.д. соответствуют H2-H5 и H1 D-глюкопиранозного звена олигосахарида [190].

В  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрах полимеров были обнаружены не только пики мономеров, но и новые сигналы, которые были соотнесены с метиленовыми группами присоединенного линкера [82,191]. Кроме того, интенсивность новых сигналов увеличивается с увеличением мольного избытка ГМД, что подтверждает ранее полученные данные об увеличении степени полимеризации производных ЦД с увеличением концентрации сшивающего агента (Таблица 20).

Для оценки количества присоединенных линкеров на один тор ЦД была проведена нормализация спектров по сигналу, соответствующему H1 D-глюкопиранозного звена. Было обнаружено, что на один олигосахарид в среднем приходится от 1-2 спейсеров, т.е. полимеры не являются плотно сшитыми. Однако важно отметить, что в концентрациях, необходимых для получения ЯМР-спектров, полимеры не растворяются полностью, поэтому полученные значения могут быть немного занижены.



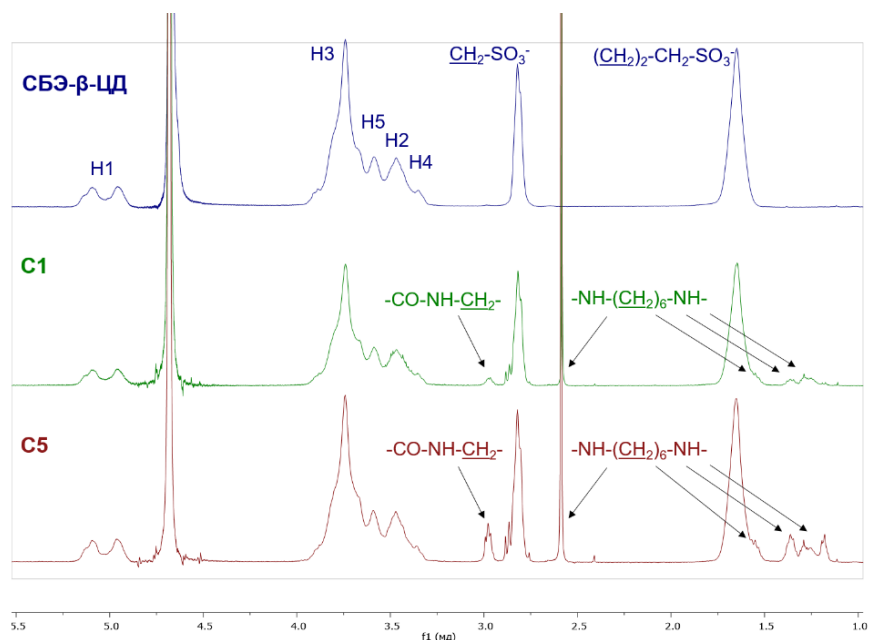


Рисунок 31.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры сульфобутилового эфира  $\beta$ -циклодекстрина (1), полимеров С1 (2) и С5 (2), 10 мг/мл,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 МГц.

Таким образом, в результате синтеза полимеров на основе производных  $\beta$ -ЦД были получены частицы со средним гидродинамическим диаметром до 200 нм, структура которых представляет собой связанные торы ЦД, соединенные преимущественно «двойными спейсерами» и  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$  группами. Уретановые связи образуются в меньшей степени и характерны только для полимеров на основе СБЭ- $\beta$ -ЦД. Избыток сшивающего агента ГМД, присоединенный только одним концом к частице, гидролизуеться с образованием поверхностных первичных  $-\text{NH}_2$  групп. Кросс-линкинг торов ЦД обуславливает получение полимерных структур, которые содержат десятки торов ЦД и гидрофобные поры, образованные алифатическими цепями спейсера.

Все перечисленные структурные особенности, возникающие вследствие взаимодействия с линкером, могут обеспечивать дополнительное связывание лекарственных молекул ФХ по сравнению с простыми производными  $\beta$ -ЦД и оказывать влияние на эффективность связывания ФХ. Для выявления роли полимеризации ЦД в регуляции физико-химических свойств ФХ были исследованы комплексы полимеров с ФХ.

### 3.3.3. Исследование взаимодействия полимеров на основе производных $\beta$ -циклодекстрина с моксифлоксацином

Исследование влияния кросс-линкинга на эффективность комплексообразования ЦД с ФХ осуществлялось по методике, рассмотренной выше для комплексов производных  $\beta$ -

ЦД с ФХ методом ИК-спектроскопии. Полученные результаты сравнивали с рассмотренными выше данными по комплексам ФХ с мономерами ЦД (Рисунок 32).

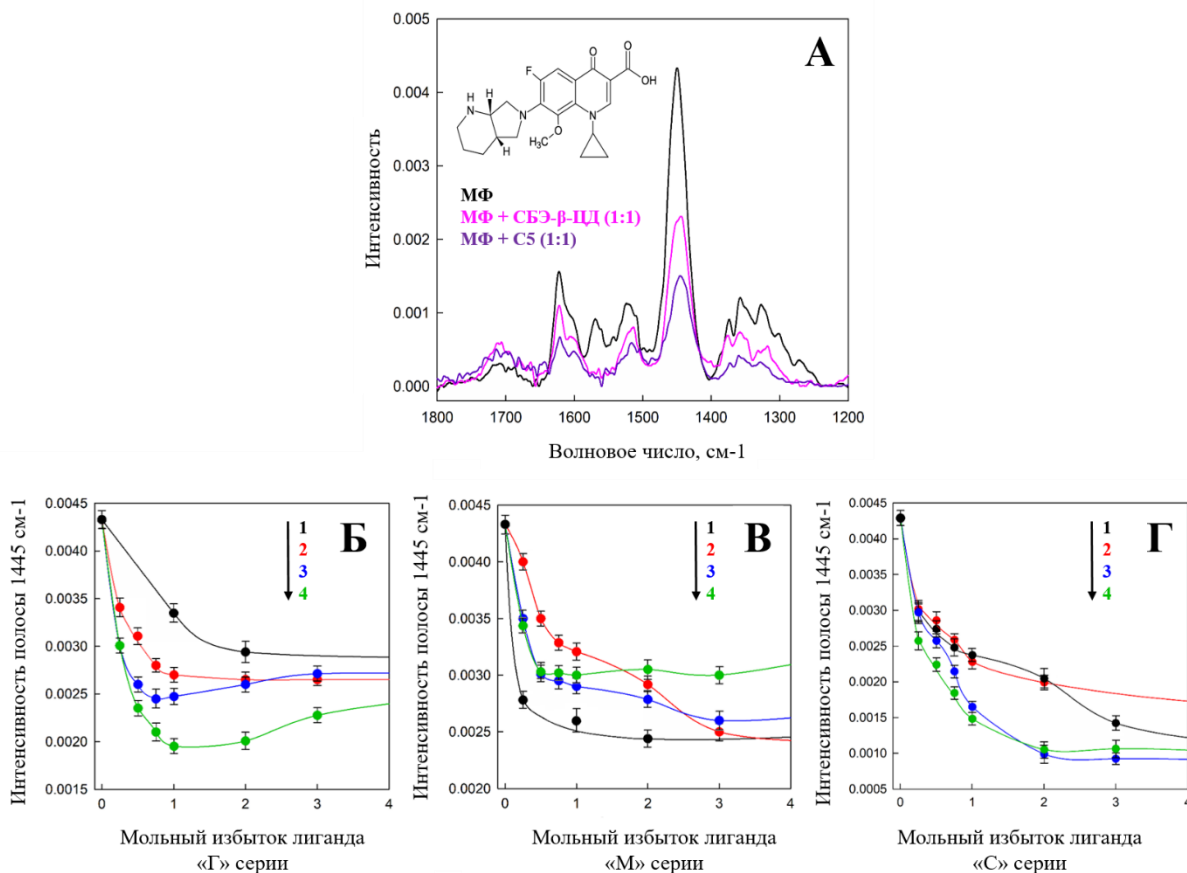


Рисунок 32. А. ИК-спектр свободного моксифлоксацина и моксифлоксацина в комплексе с СБЭ-β-ЦД и С5, мольное соотношение тор циклодекстрина : моксифлоксацин = 1 : 1, рН 4,0, 22°C. Б-Г Изотермы сорбции моксифлоксацина с мономерами (1), и полимерами, полученными при мольном избытке ГМД равном 1 (2), 3 (3) и 5 (4).

Образование комплексов полимерных ЦД с МФ сопровождается аналогичными изменениями в ИК-спектре МФ, которые были характерны и для свободных β-ЦД: уменьшение интенсивности всех полос поглощения лекарственной молекулы. Наиболее ярко данный эффект наблюдался для полосы поглощения 1445 см<sup>-1</sup>, соответствующей колебаниям С-С<sub>arom</sub> связи хинолонового фрагмента МФ. Также наблюдались изменения и в тонкой структуре полос поглощения, соответствующих поглощению –СООН, С=О и –С-Н связей. Таким образом, можно предположить, что механизм образования комплексов ФХ с полимерами схож с механизмом, описанным для мономеров β-ЦД.

Однако в присутствии полимеров наблюдается более выраженное снижение интенсивности всех полос поглощения МФ в ИК-спектре, по сравнению с комплексообразованием с мономерами (Рисунок 32.А). Такой эффект указывает на

большую вовлеченность функциональных групп МФ в межмолекулярных взаимодействиях с лигандом.

Анализ интенсивности полосы МФ  $1445 \text{ см}^{-1}$  в координатах Скэтчарда позволил рассчитать значения  $K_{\text{дис}}$  для полимеров (Таблица 20). Согласно полученным данным небольшие мольные избытки ГМД не приводят к значительному изменению  $K_{\text{дис}}$ . Напротив, полимерные частицы, полученные с избытком линкера 3 и 5, в значительной степени влияют на эффективность комплексообразования. Причем в зависимости от заместителя в исходном мономере ЦД эти изменения носят разный характер.

Так, полимеры «Г» и «С» серии по эффективности комплексообразования проявляют себя в 10 и 20 раз эффективнее по сравнению с мономерами. Повышение эффективности связывания МФ, по-видимому, связано с многоточечным взаимодействием функциональных групп ФХ с полимерами: гидрофобной полостью, фрагментами спейсера, свободными сульфо- группами.

Напротив, полимеризация М-β-ЦД приводит к увеличению значений  $K_{\text{дис}}$ . Данный эффект может быть обусловлен отталкиванием положительно заряженного МФ от положительно заряженных частиц полимеров. Кроме того, увеличение размеров частиц «М» с увеличением избытка ГМД свидетельствует о формировании менее плотных, более гибких структур, по сравнению с полимерами на основе ГП-β-ЦД или СБЭ-β-ЦД, что может обуславливать менее прочные взаимодействия с МФ.

В среднем в условиях насыщения полимеров по МФ степень загрузки МФ составляет 0,08-0,1 мг на 1 мг полимера.

Полученные данные свидетельствуют о том, что полимеризация оказывает значительное влияние на связывание производных β-ЦД с ФХ: возможно как увеличение, так и уменьшение значений  $K_{\text{дис}}$  в  $10 \div 20$  раз. Важно отметить, что выраженное увеличение  $K_{\text{дис}}$  наблюдается при использовании в качестве мономера М-β-ЦД, который продемонстрировал наиболее эффективное взаимодействие с МФ среди других производных β-ЦД (Таблица 20) за счет формирования дополнительных взаимодействий множественными метильными группами с молекулой ФХ. В то время как сульфо- группы СБЭ-β-ЦД, которые участвуют в стабилизации комплексов ФХ-ЦД ограниченно (формирование неустойчивой электростатической связи с гетероциклом ФХ), улучшают связывание МФ почти на два порядка. Таким образом, изменение эффективности комплексообразования МФ с полимерами не коррелирует с параметрами мономерных комплексов ФХ-ЦД, а определяется структурными особенностями и физико-химическими свойствами синтезированных полимеров.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что для более эффективного комплексообразования необходим отрицательный  $\zeta$ -потенциал частиц и наличие плотной структуры, которая, по-видимому, обеспечивает дополнительную стабилизацию системы в гидрофобных порах полимера.

Наиболее перспективными полимерами, характеризующимися данными параметрами, являются частицы на основе СБЭ- $\beta$ -ЦД (отрицательный  $\zeta$ -потенциал, присутствие уретановых связей). Для исследования влияния степени полимеризации и условий синтеза полимера на возможность регуляции физико-химических свойств ФХ в работе также были получены и охарактеризованы полимерные частицы на основе СБЭ- $\beta$ -ЦД с инкапсулированным МФ вследствие темплатного синтеза.

### **3.4. Темплатный синтез 3D-матричных структур с квази-регулярной полимерной структурой на основе сульфобутиловго эфира $\beta$ -циклодекстрина**

Перспективным методом получения частиц является темплатный синтез, в результате которого образующиеся поры в полимерной матрице соответствуют структуре и размеру конкретной молекулы - темплата. Формирование таких пор с заданной структурой может способствовать образованию большого количества межмолекулярных связей носитель-лекарство, что впоследствии может обуславливать более выраженные изменение свойств препарата по сравнению с комплексами лекарство-полимер ЦД. Кроме того, темплат может обуславливать изменение сайтов присоединения линкера вследствие ассоциации комплексов темплат-ЦД, т.е. способствовать образованию специфической полимерной сетки, обладающей свойствами, не характерными для полимеров, синтезированными без темплата.

Использование фторхинолонов в качестве темплата может обуславливать формирование систем уникальной структуры, устойчивой к диссоциации и с высокой эффективностью загрузки. При этом полученная полимерная матрица может обеспечивать равномерное распределение ФХ во всей полимерной сетке, в то время как для носителей, которые выдерживаются в растворе лекарства, основная масса вещества преимущественно адсорбируется на поверхности частиц. Темплатный синтез может усилить удерживание молекул ФХ в полимерной структуре как за счет включения лекарства в комплекс с ЦД, так и за счет стерических ограничений в полимерной матрице, т.е. обеспечивать выраженное замедленное высвобождение ФХ.

### 3.4.1. Синтез частиц с инкапсулированным фторхинолоном

В работе предложен подход для создания полимерных носителей ЦД с уникальной структурой: получение частиц в результате ковалентной сшивки комплексов ФХ-ЦД (Рисунок 33). Поскольку при таком способе получения полимеров ФХ является темплатом, то можно ожидать, что синтезированная полимерная матрица будет иметь строго определенную структуру с размером пор под форму молекулы ФХ, который будет распределен равномерно во всем объеме частиц. Такие системы в связи с предполагаемыми особенностями строения в дальнейшем будут обозначаться, как 3D-матриксные структуры (MAX).

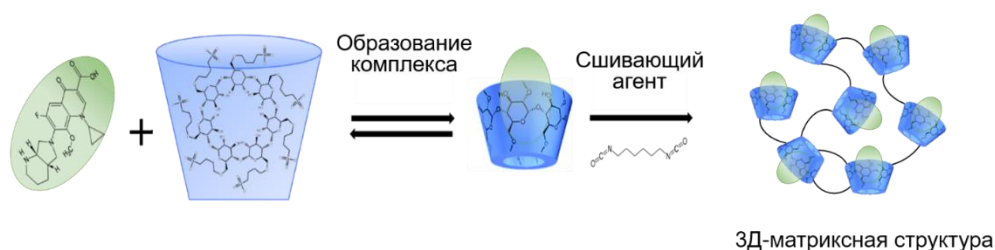


Рисунок 33. Схема получения 3D-матриксной структуры на основе комплекса оксифлоксацина с сульфобутиловым эфиром  $\beta$ -циклодекстрина.

Особый интерес представляет изучение влияния ФХ на структуру и физико-химические свойства образующегося полимера на основе  $\beta$ -ЦД. Так, присутствие темплата в процессе синтеза может привести к структурным и функциональным особенностям полимера, которые не были характерны для систем, полученных без темплата.

Была получена серия структур MAX на основе СБЭ- $\beta$ -ЦД. Исходная концентрация олигосахарида составляла больше, чем в случае синтеза полимеров - 16 мг/мл, с целью получения более плотной структуры с более выраженным удерживанием ФХ в полимерной матрице. Синтезированные MAX1-MAX6 были получены при варьировании мольного избытка сшивающего агента 0,25 до 5.

### 3.4.2. Исследование физико-химических свойств 3D-матриксных структур

Для исследования физико-химических свойств MAX были определены размеры и  $\zeta$ -потенциал частиц, а также степень включения активного компонента (Таблица 21).

Согласно результатам NTA и DLS, MAX представляют собой частицы со среднем гидродинамическим диаметром 130 – 200 нм, что было также характерно для ранее полученных полимеров ЦД. Т.е. взаимодействие ГМД с –ОН группами ЦД приводит к

образованию частиц вне зависимости от присутствия ФХ в качестве темплата. Однако при исследовании суспензии МАХ методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) были установлены несколько меньшие диаметры частиц – 50 – 100 нм. Такие отличия от данных NTA и DLS указывают на высокую степень гидратации частиц в растворе.

В отличие от полимеров СБЭ-β-ЦД ζ-потенциал всех образцов МАХ близок к нулю при значениях рН 4,0 (~ 0,7±0,5 мВ) и рН 7,4 (~ 3,6±1,2 мВ), что указывает на практически полную нейтрализацию отрицательного заряда сульфо- групп, по-видимому, за счет взаимодействия с протонированным азотом гетероцикла МФ.

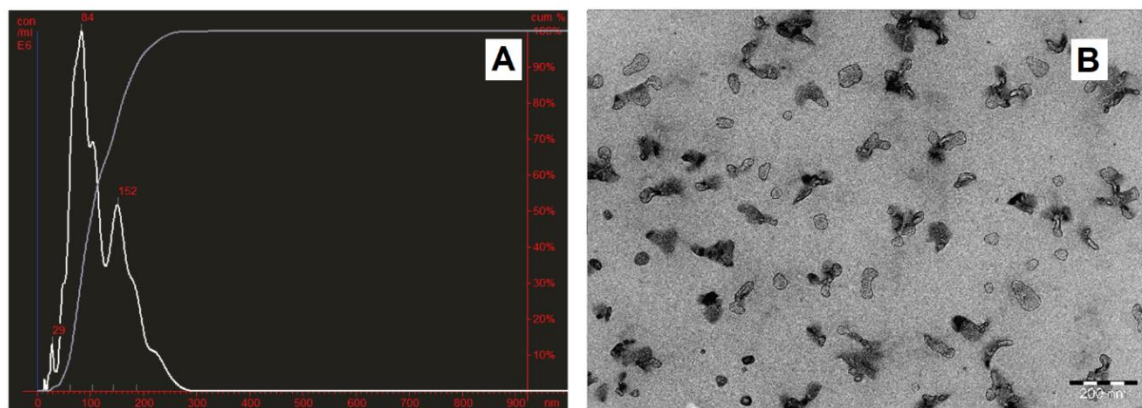
Выход МАХ по СБЭ-β-ЦД (процент включенного СБЭ-β-ЦД в частицы МАХ по отношению к добавленному при синтезе) рассчитывался по интенсивности полосы поглощения 1041 см<sup>-1</sup>, соответствующей колебанию С-О-С связи ЦД, в ИК- спектре МАХ. Было обнаружено, что выход зависит от мольного избытка ГМД: с увеличением концентрации сшивающего агента наблюдается уменьшение выхода с 80 до 36%. При этом сохраняется высокий процент включения МФ (более 85%) для всех образцов, определенный с помощью УФ-спектроскопии. По сравнению с комплексами полимеров с МФ эффективность загрузки МАХ по лекарству в 4-5 раз больше и составляет 0,45-0,55 мг на 1 мг полимера.

Высокая степень влечения МФ в структуру МАХ может быть обусловлена высокой долей МФ, находящимся в комплексе с СБЭ-β-ЦД, из-за высоких концентраций реагентов (~0,015М). Возрастание доли непрореагировавших СБЭ-β-ЦД приводит к увеличению количества лекарственных молекул на один тор СБЭ-β-ЦД от 1:1 до 2:1, что указывает на формирование некой другой структуры для образцов МАХ4-МАХ6 по сравнению с МАХ1-МАХ3. Более подробно данный эффект будет рассмотрен далее.

Таблица 21. Физико-химические характеристики 3D-матриксных структур, полученных на основе комплексов моксифлоксацина с сульфобутиловым эфиром  $\beta$ -циклодекстрина.

Образец	Мольный избыток ГМД	Гидродинамический диаметр (рН 4,0), nm	$\zeta$ -потенциал (рН 4,0), мВ	Степень включения МФ в МАХ, %	Мг, кДа	Степень полимеризации	Выход МАХ по СБЭ- $\beta$ -ЦД, %	Расчетное количество молекул МФ на 1 тор СБЭ- $\beta$ -ЦД
МАХ1	0,25	144 $\pm$ 11	0,7 $\pm$ 0,5	82 $\pm$ 5	1010 $\pm$ 75	421 $\pm$ 31	78 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3
МАХ2	0,5	145 $\pm$ 13	1,1 $\pm$ 0,7	83 $\pm$ 5	1466 $\pm$ 81	611 $\pm$ 34	81 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,4
МАХ3	0,75	149 $\pm$ 12	0,9 $\pm$ 0,5	81 $\pm$ 5	1885 $\pm$ 95	785 $\pm$ 40	71 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5
МАХ4	1	151 $\pm$ 18	0,5 $\pm$ 0,4	85 $\pm$ 5	1588 $\pm$ 88	662 $\pm$ 37	60 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3
МАХ5	3	130 $\pm$ 17	1,2 $\pm$ 0,6	86 $\pm$ 5	1247 $\pm$ 78	520 $\pm$ 32	38 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,4
МАХ6	5	198 $\pm$ 14	0,8 $\pm$ 0,3	87 $\pm$ 5	1324 $\pm$ 80	552 $\pm$ 33	36 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,4

Рисунок 34. А. Распределение частиц МАХ5 по размерам, полученное методом НТА. Б. Микрофотография МАХ5, 100кВ. Масштабный отрезок 100 нм.



Лиофилизированные образцы МАХ представляют собой легкие хлопья ярко желтого цвета, обусловленного окраской МФ. Для исследования распределения МФ внутри полимерной матрицы МАХ был использован метод ИК-микроскопии (Рисунок 35.А).

На микрофотографии МАХ были выбраны два визуально разных объекта: тонкая пленка светлого оттенка, которая дает ответ (Рисунок 35, синяя точка), и ярко желтый фрагмент (Рисунок 35, красная точка). Для обоих объектов были получены ИК-спектры, которые сравнивались с ИК-спектром раствора МФ.

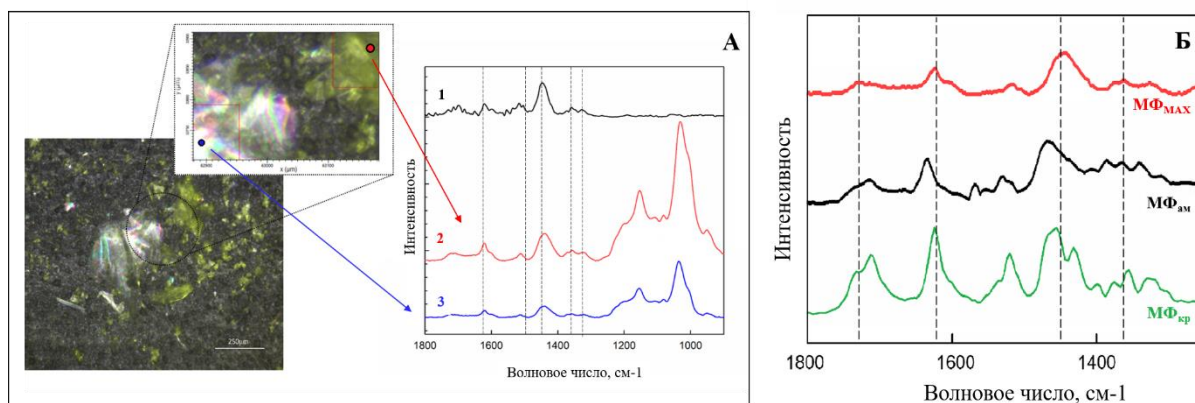


Рисунок 35. А. Микрофотография образца МАХ2. Масштабный отрезок 250 нм. ИК-спектры, зарегистрированные для красной (2) и синей (3) областей, в сравнении с ИК-спектром свободного МФ (1), 22°C. Б. Сравнение ИК-спектров МФ в МАХ2 и ИК-спектров МФ в кристаллическом и аморфном состояниях [78].

В обоих спектрах областей присутствуют полосы, характерные для свободных МФ и СБЭ-β-ЦД, что указывает на то, что МАХ действительно представляет собой полимерную структуру с распределенным в ней МФ. Разная интенсивность полос МАХ для двух областей, по-видимому, обусловлена физическими параметрами вещества (например, толщиной пленки). При этом мольное соотношение МФ:СБЭ-β-ЦД приблизительно одинаково для обоих объектов, что свидетельствует о равномерном распределении лекарства по всему образцу.

Образование комплексов ФХ-ЦД может сопровождаться изменением кристаллического состояния МФ на аморфное, что было показано на примере комплекса МФ-ГП-β-ЦД [78]. Для более детального исследования состояния МФ в МАХ (МФ<sub>мах</sub>) ИК-спектр МФ<sub>мах</sub> сравнивали со спектрами МФ в кристаллическом (МФ<sub>кр</sub>) и аморфном состоянии (МФ<sub>ам</sub>).

Согласно литературным данным [78] ИК-спектры МФ<sub>кр</sub> и МФ<sub>ам</sub> сильно различаются по структуре и интенсивности основных полос поглощения лекарственной молекулы.



Наиболее сильно выражены изменения в области поглощения ароматического остова МФ в области 1540-1425 см<sup>-1</sup>. Так, для МФ<sub>кр</sub> характерно расщепление полосы на два пика 1452 см<sup>-1</sup> и 1428 см<sup>-1</sup>, кроме того наблюдается выраженная полоса 1516 см<sup>-1</sup>. При образовании комплекса МФ-ГП-β-ЦД (МФ<sub>ам</sub>) в результате лиофилизации или с использованием сверхкритических флюидных технологий полосы 1428 см<sup>-1</sup> и 1516 см<sup>-1</sup> практически полностью исчезают.

Аналогичные изменения наблюдаются и в ИК-спектре МАХ (Рисунок 35.Б). Поскольку ИК-спектр МФ<sub>мах</sub> близок к спектру МФ<sub>ам</sub>, полученные результаты указывают на аморфное состояние МФ в МАХ.

### **3.4.3. Влияние моксифлоксацина на формирование полимерной матрицы на основе сульфобутилового эфира β-циклодекстрина**

Согласно ранее полученным данным по полимерам ЦД установлено, что в результате взаимодействия ЦД с ГМД возможно как «сшивание» торов ЦД с помощью линкера (образование уретановых и -NH-CO-NH- групп), так и гидролиз концевых непрореагировавших изоцианатных групп до первичных аминов. При этом для полимеров ЦД процесс гидролиза до -NH<sub>2</sub> групп был сильно выражен. Поскольку ζ-потенциал МАХ близок к нулю (Таблица 21), то можно предположить отсутствие или нейтрализацию -NH<sub>2</sub> групп на поверхности МАХ. Кроме того, поскольку для получения МАХ использовалась более высокая концентрация ЦД (16 мг/мл), то должна была образоваться более плотная структура с бóльшим количеством уретановых и/или -NH-CO-NH- групп. Таким образом, следует ожидать, что структуры МАХ и полимеров будут различаться.

Исследование структуры полимерной матрицы МАХ, образованной посредством кросс-линкинга торов ЦД линкером, была изучена методами ЯМР-спектроскопии и ИК-спектроскопии Фурье.

В <sup>1</sup>H ЯМР спектре МАХ (Рисунок 36) присутствуют как сигналы, соответствующие СБЭ-β-ЦД, так и пики, которые относятся к протонам МФ [192,193]. Кроме того, присутствуют новые сигналы, которые ранее были обнаружены в <sup>1</sup>H ЯМР-спектрах полимеров «С» серии, что свидетельствует о том, что синтез МАХ с образованием уретановых и -NH-CO-NH- связей прошел успешно.

Интенсивность новых сигналов <sup>1</sup>H ЯМР-спектре МАХ увеличивается с увеличением мольного избытка ГМД, что указывает на увеличение степени сшивки. При этом интенсивность этих пиков выше по сравнению с полимерами «С» серии. Таким образом, МАХ обладает более сшитой структурой, чем полимеры.

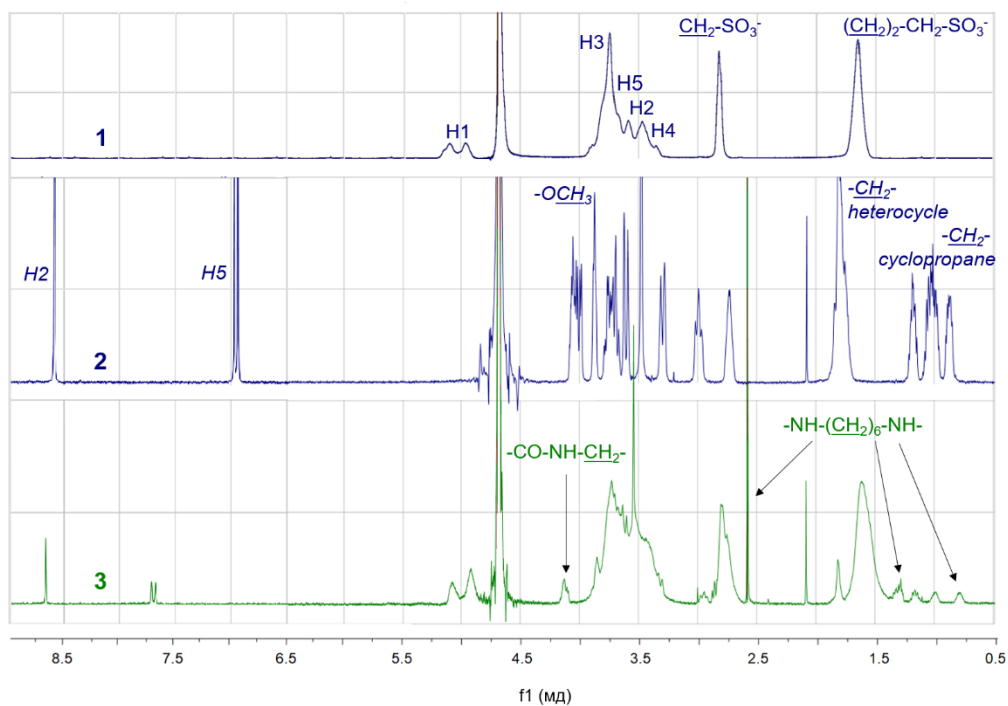


Рисунок 36.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры сульфобутилового эфира  $\beta$ -циклодекстрина (1), моксифлоксацина (2) и МАХ1, 7 мг/мл,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 МГц.

Расчетная степень включения МФ в МАХ составляет больше 80%, что хорошо согласуется с данными, полученными методом УФ-спектроскопии (Таблица 21). Однако из-за сложной структуры  $^1\text{H}$  ЯМР-спектра МАХ данное значение может быть занижено.

Важно отметить, что синглет МФ 8,58 м.д. и дублет 6,97 м.д. и 6,94 м.д., которые соответствуют Н2 и Н5 ароматического остова молекулы препарата, в  $^1\text{H}$  ЯМР-спектре МАХ претерпевают выраженный сдвиг в область бóльших значений м.д. Аналогичный эффект был показан авторами [194], которые предположили, что столь значимый сдвиг сигналов обусловлен заглублением гидрофобного фрагмента внутрь полости ЦД, при этом гетероцикл находится снаружи олигосахарида. Таким образом, по-видимому, МАХ представляют собой «сшитые» комплексы МФ-СБЭ- $\beta$ -ЦД, которые имеют структуру, рассмотренную выше при изучении простых комплексов ЦД-ФХ.

Для исследования полимерной матрицы МАХ методом ИК-спектроскопии из спектра МАХ вычитался ИК-спектр МФ в концентрации, соответствующей содержанию МФ в системе.

В ИК-спектрах полимерной структуры МАХ (Рисунок 37.А) не наблюдается полоса поглощения, соответствующая колебаниям С-N концевых аминогрупп  $951\text{ см}^{-1}$ , что было характерно для полимеров ЦД (Рисунок 30.Б-Г). Такой результат, как предполагалось

выше, может быть обусловлен преобладанием «сшивания» торов ЦД над гидролизом концевых изоцианатных групп из-за высоких концентраций свободных –ОН групп реагента.

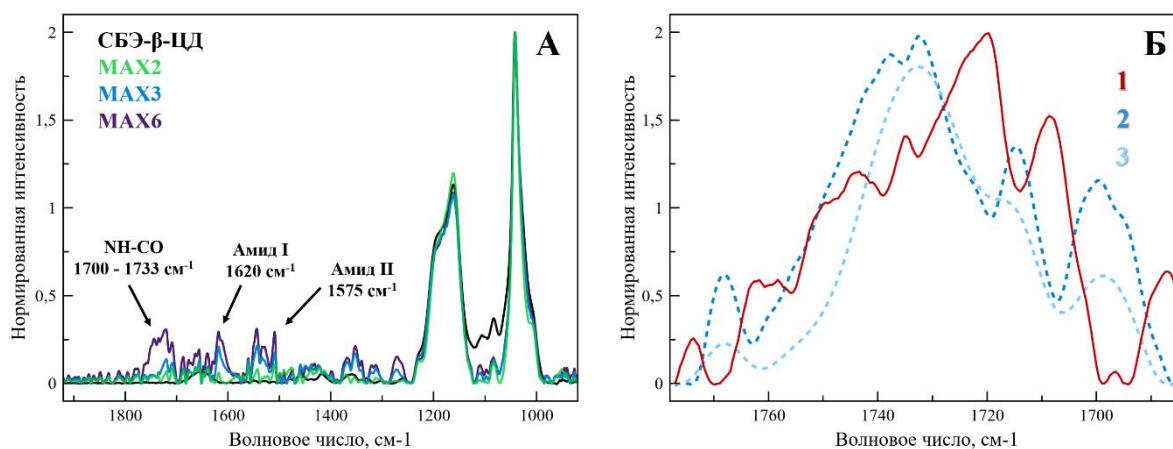


Рисунок 37. А. Нормированные ИК-спектры СБЭ-β-ЦД, МАХ2, МАХ3 и МАХ6. Б. Нормированные спектры МАХ5 (1), и МАХ5<sup>-</sup> (2) и полимера С3 (3) в области поглощения уретановой области 1780 -1680 см<sup>-1</sup>.

В ИК-спектрах МАХ присутствуют полосы поглощения амид I 1620 см<sup>-1</sup> и амид II 1575 – 1500 см<sup>-1</sup>, соответствующие колебаниям карбамидных групп, что указывает на образование полимера. По сравнению с ИК-спектрами свободного СБЭ-β-ЦД и полимеров СБЭ-β-ЦД в ИК-спектре МАХ присутствует выраженная многокомпонентная полоса, соответствующая колебаниям С=О связи уретановых групп в области 1740-1700 см<sup>-1</sup>.

Для более детального анализа данной полосы важно отметить, что, согласно литературным данным [185,187–189], в ИК-спектре полиуретановых материалов характерен узкий пик в диапазоне 1710 – 1690 см<sup>-1</sup>, что указывает на одинаковое состояние всех -NH-CO- групп. Однако возможно и уширение данной полосы в сторону больших значений волновых чисел, что наблюдается в ИК-спектре МАХ.

Для объяснения этого эффекта и исследования тонкой структуры пика авторы [188] провели деконволюцию полосы колебаний С=О связи уретановых групп 1740 – 1690 см<sup>-1</sup> и показали наличие двух основных компонент в области высоких (~1733 см<sup>-1</sup>) и низких (~1700 см<sup>-1</sup>) значений волновых чисел, которые соответствуют свободным С=О группам и С=О группам, которые участвуют в образовании Н-связей. Важно отметить, что с течением времени полимерная структура полиуретанов может претерпевать внутримолекулярные конформационные изменения с формированием упорядоченной структуры, поддерживаемой водородными связями, что можно наблюдать по увеличению доли компоненты 1700 см<sup>-1</sup> за счет уменьшения доли компоненты 1733 см<sup>-1</sup> в ИК-спектре

материала (увеличение количества C=O групп, участвующих в формировании Н-связей). Таким образом, в соответствии с тонкой структурой полосы поглощения C=O связи уретановых групп в области 1740-1700 см<sup>-1</sup> можно сделать предположение об участии уретановых связей во внутримолекулярных взаимодействиях и формировании упорядоченной полимерной структуры.

В ИК-спектре МАХ наблюдается широкий многокомпонентный пик C=O связи уретановых групп в области 1740-1700 см<sup>-1</sup>, что может указывать на образование определенной упорядоченной структуры за счет внутримолекулярных взаимодействий. Поскольку водородные связи могут образовываться как результат внутримолекулярных взаимодействий в самой полимерной матрице, так и межмолекулярных взаимодействий между полимером и МФ было исследовано влияние темплата на структуру полосы 1740-1700 см<sup>-1</sup>.

Для выявления роли темплата МФ во взаимодействии с уретановыми связями полимерной матрицы МАХ был проведен сравнительный анализ области поглощения уретановых связей 1740 – 1690 см<sup>-1</sup> для следующих образцов: МАХ и полимера СЗ, а также МАХ, синтезированного без МФ (далее МАХ<sup>-</sup>) (Рисунок 37.Б).

При анализе полос уретановых связей носителей без МФ установлено, что для полимеров СБЭ-β-ЦД и МАХ<sup>-</sup> наблюдается преобладание компоненты высоких (~1735 см<sup>-1</sup>) значений волновых чисел (несвязанные C=O группы). Т.е. образование большого количества внутримолекулярных водородных связей и формирование упорядоченной структуры лигандов в отсутствие МФ не характерно. Возможно данный эффект связан с гибкостью полимерной структуры. Аналогичный эффект (преобладание несвязанных C=O групп уретановых связей) был обнаружен для комплексов полимеров «С» серии и МАХ<sup>-</sup> с МФ, что указывает на небольшую вовлеченность уретановых групп во взаимодействии с МФ. Полученные данные подтверждают ранее сформулированное предположение о том, что инкапсуляция молекулы в полимерную матрицу вследствие темплатного синтеза может обуславливать формирование уникальной структуры со свойствами, не характерными для полимеров, синтезированных без темплата.

В ИК-спектрах МАХ, синтезированных вследствие темплатного синтеза, преобладает низкочастотная компонента ~1720 см<sup>-1</sup> (связанные C=O группы). Такой результат указывает на особую роль МФ в формировании дополнительных межмолекулярных взаимодействий и уникальной структуры полимерной матрицы МАХ. Действительно, темплат может направлять ориентацию комплексов ЦД и определять сайты

присоединения линкера, что приводит к образованию некой другой структуры, чем в отсутствие темплата [128].

Таким образом, в случае МАХ МФ участвует в формировании квази-регулярной структуры, при этом МФ играет особую роль в поддержании такой структуры за счет межмолекулярных взаимодействий между инкапсулированным ФХ и уретановыми С=О группами полимерной матрицы.

Важно отметить, что интенсивность полосы поглощения уретановых связей в ИК-спектре МАХ 1740-1700 см<sup>-1</sup> увеличивается с увеличением мольного избытка ГМД. Поскольку размер частиц МАХ1-МАХ6 почти одинаковый, то можно предположить, что увеличение количества уретановых связей обусловлено увеличением плотностью сшивки и/или степени полимеризации. Действительно, согласно Таблице 21 значения Мг для МАХ увеличиваются в ряду МАХ1<МАХ2<МАХ3, что указывает на возрастание числа мономеров, участвующих в синтезе. Однако далее (МАХ4-МАХ5-МАХ6) наблюдается падение степени полимеризации с 785 до 552 с увеличением количества уретановых связей, что указывает на увеличение плотности сшивки (степени модификации ЦД в пересчете на 1 тор) внутри частицы и, возможно, формирование другой структуры полимера по отношению к полимерным частицам.

Для более детального изучения данного эффекта использовался метод КД-спектроскопии. В КД-спектре МФ наблюдается два минимума в диапазоне длин волн 250 – 350 нм (Рисунок 38.А), соответствующие ароматической структуре ФХ. Образование комплекса МФ с СБЭ-β-ЦД и полимерами СБЭ-β-ЦД приводит к сдвигу спектра в область больших длин волн (в красную область). Ранее нами было исследовано влияние полярности среды и ионного состояния МФ на его спектральные характеристики [37]. Так, изменение микроокружения МФ на более гидрофобное (ДМСО) приводит к сдвигу КД-спектра в сторону больших длин волн на 6 нм. Изменение ионного состояния с однозаряженной молекулы (рН 4,0) на цвиттер-ион (рН 7,4), напротив, приводит к сдвигу КД-спектра в синюю область на 5-6 нм.

Таким образом, сдвиг КД-спектра МФ в красную область при образовании комплексов с мономерным и полимерными СБЭ-β-ЦД обусловлено заглублением хинолонового остова ФХ внутрь гидрофобных полостей лигандов, что согласуется с ранее полученными данными по ИК-спектроскопии и молекулярному моделированию, а также КД-спектроскопии МФ (Рисунок 27).

Однако важно заметить, что сдвиг спектра в случае полимера СБЭ-β-ЦД более выраженный, чем в случае мономерного СБЭ-β-ЦД, что возможно обусловлено большей эффективностью связывания МФ (значениями  $K_{дис}$ , Таблица 20).

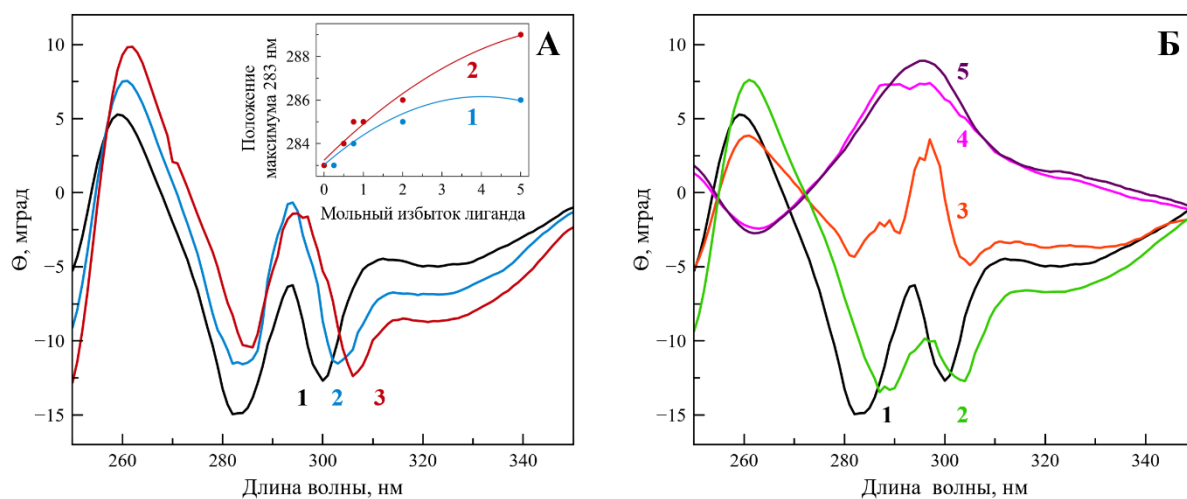


Рисунок 38. А. КД-спектр свободного моксифлоксацина (1) и моксифлоксацина в комплексе с СБЭ-β-ЦД (2) или полимера С1 (3) в мольном соотношении лекарство:тор ЦД, равное 1 : 1, рН 4,0, 22°C. Вставка: зависимость положения минимума в КД-спектре моксифлоксацина 283 нм от мольного избытка СБЭ-β-ЦД (1) или полимера С1 (2). Б. КД-спектры моксифлоксацина (1), МАХ2 (2) , МАХ4 – МАХ6 (3 – 5), рН 4,0, 22°C.

В КД-спектрах МАХ для небольших мольных избытков ГМД (МАХ1-МАХ3) наблюдается аналогичный сдвиг КД-спектра МФ в длинноволновую область, что было характерно для мономерного СБЭ-β-ЦД и его полимера (Рисунок 38.Б). Таким образом, инкапсуляция МФ вследствие темплатного синтеза при небольших избытках ГМД не оказывает значительного влияния на механизм связывания лекарства и образуемую супрамолекулярную структуру двухкомпонентной системы.

Однако с увеличением мольного избытка ГМД (МАХ4-МАХ6) наблюдается значительное изменение структуры КД-спектра МФ в области 270 - 320 нм с изменением направления спектра (с отрицательного на положительный (Рисунок 38.Б)). Согласно литературным данным [195,196] положительный пик в КД-спектре в комплексах включения с участием ЦД указывает на то, что дипольный момент молекул «гостя» параллелен оси вращения полостей β-ЦД (которые образуют анизотропную структуру), то есть в данном случае дипольный момент молекулы МФ преимущественно ориентирован перпендикулярно диаметру торцов ЦД (как это наблюдалось также при молекулярном моделировании мономерных комплексов (Рисунок 23)).

Столь сильные изменения в КД-спектрах МАХ4-МАХ6 указывает на формирование квази-регулярной (анизотропной) структуры МАХ, в которой МФ выступает в качестве хромофорной метки (поскольку сам ЦД не имеет поглощения в исследуемой ближней УФ-области спектра). Из литературы известно, что при высоких концентрациях производные  $\beta$ -ЦД и его комплексы способны самоорганизовываться в различные надмолекулярные структуры: димеры («голова к голове» и «голова к хвосту»), цепочки, кольца, зигзагообразные структуры и др. [107,110,197,198]. Поэтому столь значительные изменения в КД-спектрах МАХ4-МАХ6 могут свидетельствовать о «фиксации» надмолекулярной структуры, образуемой комплексами МФ-СБЭ- $\beta$ -ЦД, в процессе полимеризации при высоких избытках ГМД.

При рассмотрении процесса ассоциации комплексов МФ-СБЭ- $\beta$ -ЦД, как зародышеобразования кристалла, важно отметить, что, согласно полученным нами данным (по молекулярному моделированию, ЯМР и ИК-спектроскопии), гетероцикл МФ располагается вне полости СБЭ- $\beta$ -ЦД. Согласно литературным данным, для комплексов включения ЦД с органическими молекулами, которые не располагаются в полости ЦД полностью (как в случае МФ), супрамолекулярная структура должна иметь тип «слой», что было показано для комплекса  $\beta$ -ЦД с сульфатиазолом (Таблица 8). Так, аминифенильный фрагмент сульфатиазола располагается в полости ЦД, а тиазольное кольцо зажато между слоями  $\beta$ -ЦД [110]. Таким образом, тиазольное кольцо может взаимодействовать с гидроксильными группами ЦД соседнего слоя.

Аналогичную структуру, по-видимому, имеет МАХ: ароматический остов МФ находится в торах ЦД, при этом гетероцикл МФ, расположенный вне полости ЦД, направлен в межмолекулярное пространство между слоями ЦД и может участвовать в межмолекулярных связях с соседними комплексами (Рисунок 39).

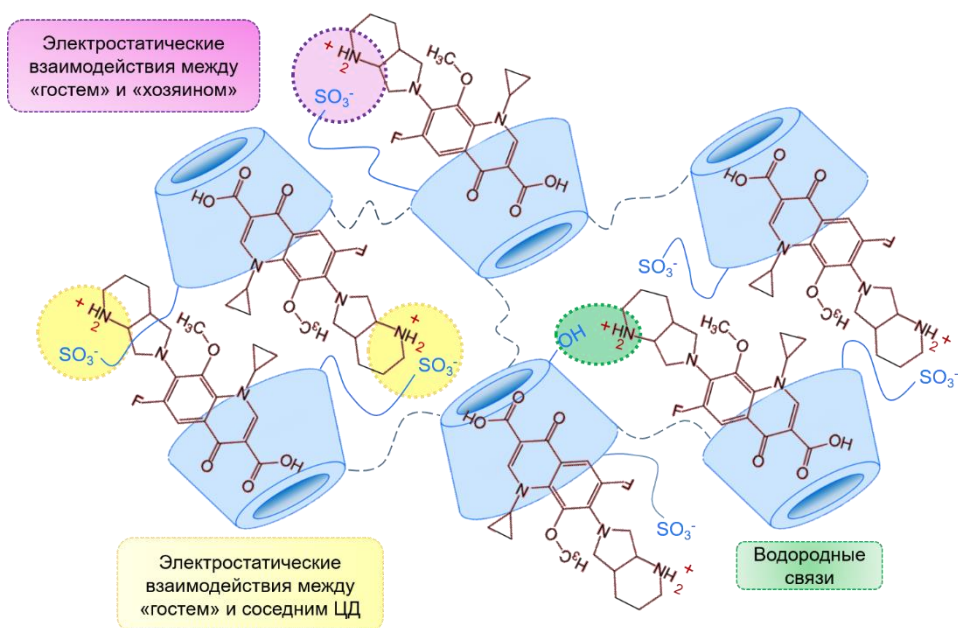


Рисунок 39. Предполагаемая регулярная структура МАХ. Цветом показаны основные типы взаимодействий между полимерной структурой МАХ и моксифлоксацином.

Таким образом, в процессе синтеза МАХ сшивающий агент ГМД взаимодействует с доступными –ОН группами СБЭ-β-ЦД самоорганизованных комплексов. При небольших мольных избытках линкера образуются гибкие структуры с произвольной супрамолекулярной структурой. Повышение избытка ГМД приводит к увеличению плотности сшивки и образованию надмолекулярной структуры, которая возможно представляет из себя слои из торов СБЭ-β-ЦД, заполненные молекулами лекарства. При этом МФ располагается как в полостях ЦД, так и в порах самой полимерной сетки МАХ. Похожая структура «темплатного комплекса» была обнаружена в работе [130] при синтезе полимера на основе β-ЦД в присутствии L-DOPA (Рисунок 12), где также наблюдались два типа локализации темплата в полимерной матрице. Однако, поскольку на начальном этапе только 10% L-DOPA находилось в форме комплекса, то большая часть темплата, по-видимому, располагается вне полостей ЦД полимера. В то время как в случае МАХ синтез проводился при высоких концентрациях как «гостя», так и «хозяина» (0,03 М) при  $K_{дис} 10^{-4}$  М, что обеспечивает большую долю МФ в составе комплекса (более 90% МФ в виде комплекса было на начальном этапе синтеза).

Таким образом, при высоких концентрациях линкера происходит формирование квази-регулярной анизотропной структуры МАХ вследствие самоассоциации комплексов и их фиксации в плотной полимерной сетке.



Многоточечное удерживание МФ в системах МАХ может обеспечивать выраженное замедленное высвобождение из носителя.

### 3.5. Профили высвобождения моксифлоксацина из полимерных носителей и матричных систем на основе производного циклодекстрина

Изучение влияния физико-химических свойств частиц на основе СБЭ-β-ЦД на профиль высвобождения МФ было изучено методом равновесного диализа с использованием полупроницаемой мембраны с массой отсечения 3,5кДа, которая позволяет свободно высвобождаться МФ, но удерживает полимер внутри мембраны. Кривые высвобождения МФ из различных носителей, а также при различных рН, представлены на Рисунке 40.

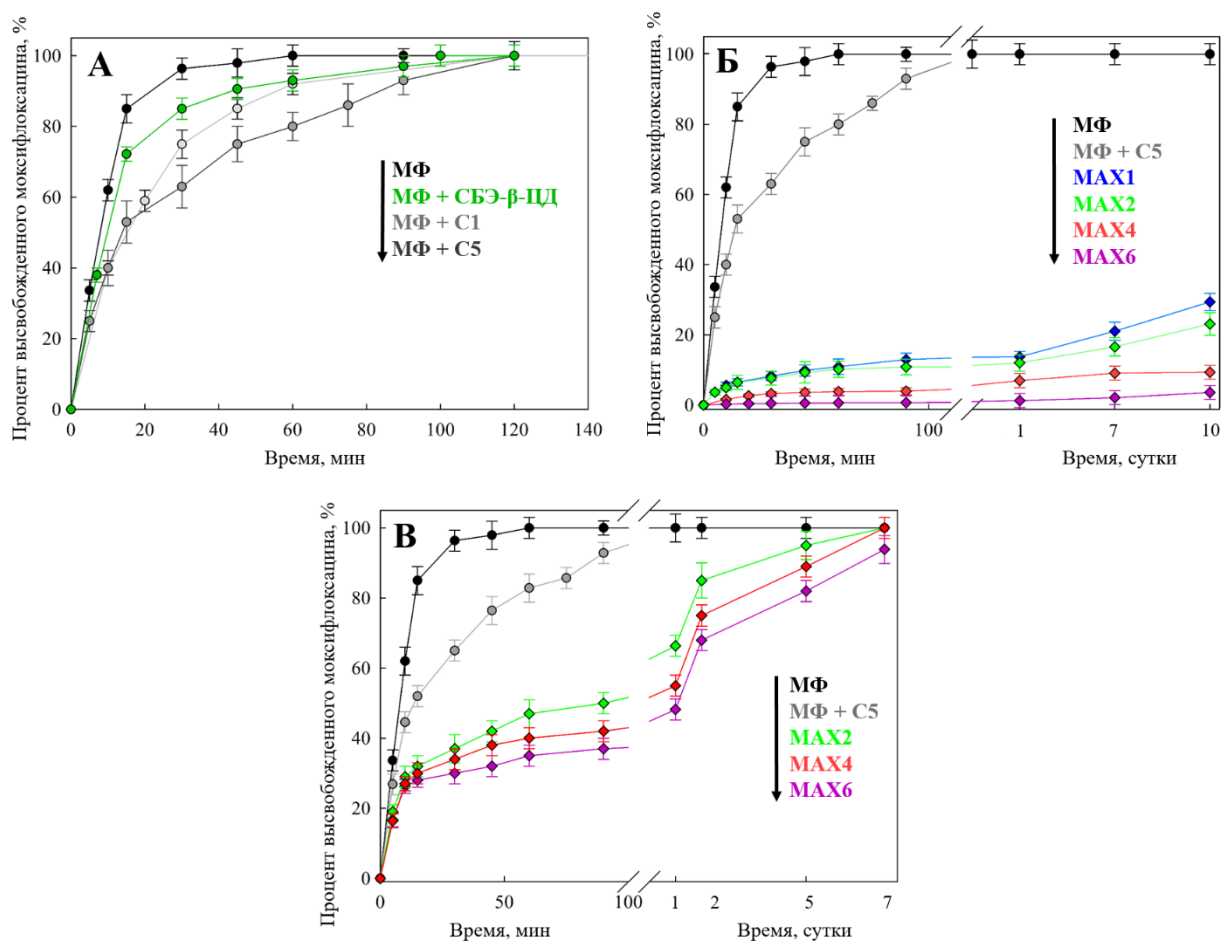


Рисунок 40. А. Высвобождение свободного МФ и МФ, связанного в комплекс типа «гость-хозяин» с сульфобутиловым эфирами β-циклодекстрином, полимерами С1 и С5, мольное соотношение тор циклодекстрина:МФ = 1:1, рН 4,0, 37°С. Б-В. Высвобождение свободного МФ и МФ из комплекса с С5, а также систем МАХ при рН 4,0 (Б) и рН 7,4 (В), 37°С.

Рассмотрим высвобождение МФ в кислых условиях для наиболее устойчивых комплексов ФХ-ЦД, поскольку ФХ является однозаряженной молекулой (Рисунок 40.А-Б, Таблица 22). 100% свободного МФ высвобождается в течение 40 минут. Образование комплекса МФ-СБЭ-β-ЦД приводит к незначительному замедлению кинетики высвобождения лекарства на начальном временном участке: за 40 минут высвобождается почти 90% лекарства.

Таблица 22. Скорость высвобождения МФ из различных носителей на основе СБЭ-β-ЦД, представленная как тангенсы углов наклона начальных участков кривых высвобождения моксифлоксацина (Рисунок 40), относительные изменения концентрации в минуту.

<b>tgα</b>	<b>МФ</b>	<b>МФ+СБЭ-β-ЦД</b>	<b>МФ+С5</b>	<b>МАХ2</b>	<b>МАХ4</b>	<b>МАХ5</b>
<b>pH 4,0</b>	4,8±0,3	4,2±0,3	3,1±0,2	0,13±0,01	0,08±0,01	0,012±0,02
<b>pH 7,4</b>	5,1±0,4	4,5±0,3	3,5±0,3	2,2±0,2	2,0±0,2	1,8±0,2

Для комплексов ФХ с производными β-ЦД ранее было показано, что степень замедления высвобождения ФХ коррелирует со значениями  $K_{дис}$ . Поскольку полимеризация СБЭ-β-ЦД приводит к понижению значений  $K_{дис}$  в 10 - 20 раз, то особый интерес представляет собой исследование влияния образования полимерной структуры на профиль высвобождения ФХ.

Установлено, что образование комплексов МФ с полимерами «С» серии приводит к более выраженному замедлению кинетики высвобождения МФ по сравнению со свободными производными β-ЦД. Тем не менее, наиболее сильное влияние полимеров СБЭ-β-ЦД на профиль высвобождения лекарства наблюдается только на начальном временном участке. 100% свободного лекарства достигается в течение 90-120 минут.

Таким образом, на основании значения  $K_{дис}$  комплексов ФХ-носитель на основе ЦД можно предположить профиль высвобождения ФХ. Однако в целом изменение кинетики высвобождения лекарства наблюдается только в первые 30-40 минут.

В отличие от мономерных производных β-ЦД и полимеров на основе ЦД системы МАХ представляют собой полимерную сетку с равномерно распределенным МФ во всем объеме частицы. Инкапсуляция МФ в МАХ может в значительной степени замедлять высвобождение лекарства из-за стерических затруднений: диссоциация будет происходить не только с поверхности частицы, но и из внутренней частицы матрицы. Помимо плотной полимерной структуры МФ также будет удерживаться многоточечными взаимодействиями

с полимерной сеткой МАХ. Т.е. можно ожидать, что МАХ будут обладать наиболее медленным высвобождением не только на начальном участке кривой высвобождения.

Действительно, системы МАХ характеризуются наиболее выраженным медленным высвобождением МФ по сравнению с простыми производными  $\beta$ -ЦД и их полимерами: не более 30% свободного лекарства высвобождается в течение 10 дней (рН 4,0). Важно отметить, что степень замедления коррелирует с концентрацией уретановых связей: с увеличением плотности полимерной матрицы в ряду МАХ1<МАХ6 наблюдается все более медленное высвобождение. Наиболее медленное высвобождение характерно для МАХ5 и МАХ6 – не более 3% высвобождается в течение 7 дней.

При переводе систем из кислых условий в нейтральные (рН 7,4) происходит депротонирование карбоксильной группы МФ, что может приводить к нарушению межмолекулярных взаимодействий между ФХ и полимерной матрицей, и, как следствие, ускорять высвобождение МФ. Для подтверждения данного предположения была исследована кинетика МФ при рН 7,4 (Рисунок 40.В, Таблица 22).

Изменение рН не оказывает влияние на профиль высвобождения как свободного МФ, так и МФ, связанного в комплекс с простым СБЭ- $\beta$ -ЦД и полимерами «С» серии. Однако, для систем МАХ наблюдается значительное ускорение высвобождения лекарственных молекул. Наиболее выраженные изменения наблюдаются на начальном временном участке (в первые 24 часа), когда высвобождается не более 60% МФ (в сравнении с 15% при рН 4,0). Далее характерно замедленное высвобождение ФХ до 100% на седьмой день эксперимента. Первоначальное увеличение скорости релиза МФ (1 сутки) возможно обусловлено изменением ионного состояния МФ на поверхности частиц, затем МАХ продолжает высвобождать препарат, который локализован внутри частицы, что происходит медленнее.

Таким образом, системы МАХ обеспечивают выраженное замедленное высвобождение, которое может быть слишком медленным для проявления терапевтического эффекта. Однако важно принять во внимание, что лекарственная формуляция при различных способах введения в живой организм будет взаимодействовать с разными веществами, что может привести к биодegradации и ускорению высвобождения препарата. Так, при разработке пероральных лекарственных форм важно учитывать, что препарат будет контактировать с панкреатическими ферментами (амидазами), одним из таких модельных ферментов является, трипсином.

Трипсин является ферментом класса гидролаз, который способен разрушать амидные связи белков и полипептидов. В некоторых работах показано, что трипсин способен разрушать не только амидные, но и уретановые связи [199–201]. Поэтому можно

ожидать, что при исследовании кинетики высвобождения МФ из МАХ в присутствии трипсина будет наблюдаться разрушение уретановых связей полимерной матрицы и, как следствие, ускорение высвобождения лекарства.

Для изучения влияния фермента на профиль высвобождения МФ из МАХ использовался метод равновесного диализа. При этом использовалась мембрана с массой отсечения 14 кДа, чтобы возможно было установить присутствие крупных гидролизованных остатков МАХ во внешнем растворе. В качестве исследуемых образцов были выбраны МАХ2 и МАХ6 с наиболее быстрым и медленным профилями высвобождения: за 2 часа высвобождается ~45 и ~35% лекарства соответственно (PBS, pH 7,4). К раствору МАХ добавлялся раствор трипсина, далее образец инкубировали в течение 90 минут с контролем состава внутреннего и внешнего раствора. Эксперимент проводился в боратном буфере при pH 8,5.

Концентрацию МФ во внешнем растворе контролировали с помощью УФ-спектроскопии. Согласно полученным данным трипсин приводит к ускорению высвобождения МФ из систем МАХ (Рисунок 41).

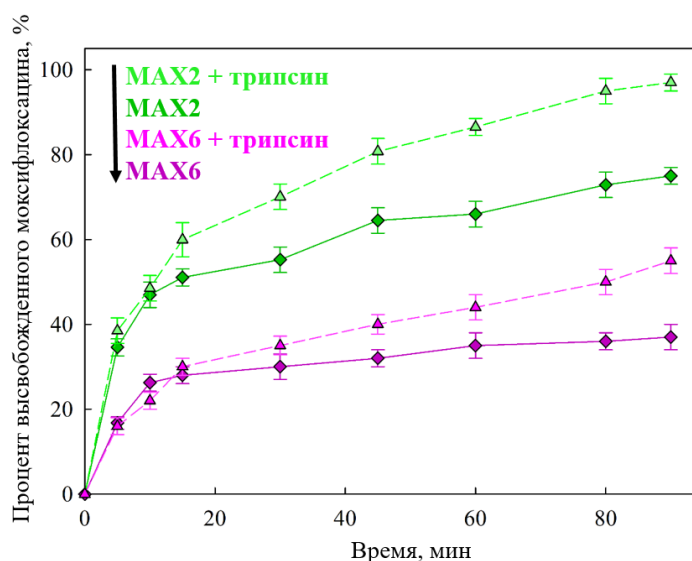


Рисунок 41. Кривые высвобождения моксифлоксацина из МАХ2 и МАХ6, а также из МАХ2 и МАХ6 в присутствии трипсина,  $C_{\text{трипсина}}=10^{-5}$  М, pH 8,5, 37°C.

Так, присутствие фермента приводит к увеличению содержания свободного МФ во внешнем растворе на 20% за 90 минут, при этом данная величина не зависит от степени сшивки. Столь сильное увеличение скорости высвобождения лекарственного препарата может быть обусловлено ферментативной деградацией МАХ6.

Для более детального изучения возможной биodeградации МАХ состав внутреннего и внешнего раствора исследовался методом ИК-спектроскопии. Согласно полученным

данным во внешнем растворе был обнаружен только лекарственный препарат как в контрольном образце МАХ, так и в образце, который инкубировался с трипсином. Высвобождение молекул  $\beta$ -ЦД не было обнаружено. При этом практически не наблюдалось изменения мутности (определяемой по поглощению на 600 нм) суспензии находящейся внутри диализного мешка. Такие результаты свидетельствуют о том, что действие трипсина не способствует полному разрушению полимерной структуры МАХ до мономерных ЦД, а обуславливает частичный гидролиз доступных ферменту связей вблизи поверхности полимера. Снижение плотности структуры и, как следствие, стерических затруднений может приводить к ускоренному высвобождению МФ.

Также важно отметить, что профили высвобождения МФ для всех образцов, полученные методом ИК-спектроскопии, совпадают с данными, полученными методом УФ-спектроскопии.

При исследовании состава внутреннего раствора (внутри диализной мембраны) обнаружено, что высокоинтенсивная полоса поглощения С-О-С связей СБЭ- $\beta$ -ЦД  $1041\text{ см}^{-1}$  (Рисунок 42.А) в МАХ не изменяется в течение 90 минут (концентрация СБЭ- $\beta$ -ЦД в начале и конце эксперимента одинакова внутри диализного мешка), т.е. действие фермента заключается в снижении плотности структуры без образования мелких продуктов гидролиза, которые могли бы преодолеть поры мембраны с массой отсечения  $14\text{ кДа}$ .

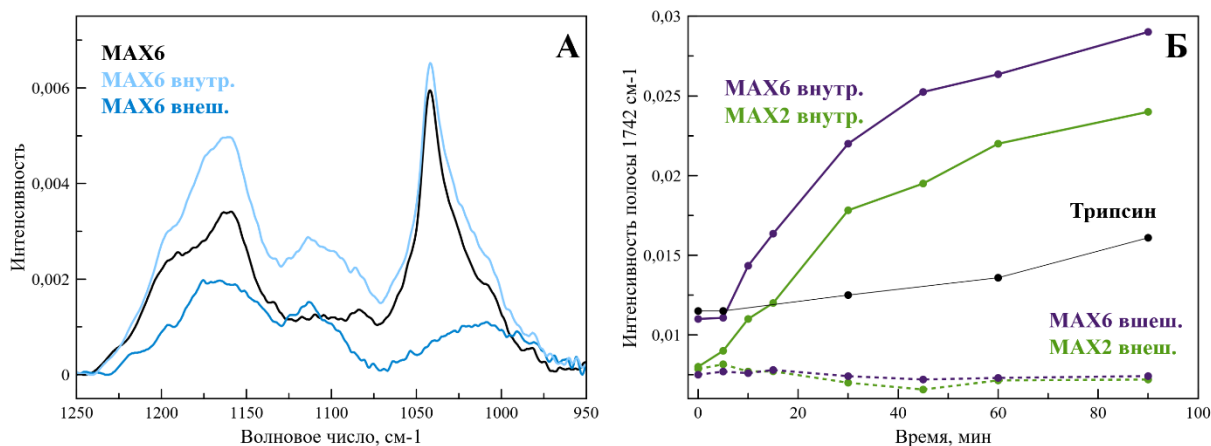


Рисунок 42. А. Область поглощения  $1250\text{-}950\text{ см}^{-1}$  ИК-спектра исходного раствора МАХ6, ИК-спектров и внутреннего и внешнего растворов МАХ6, инкубируемого с трипсином в течение 90 минут рН 8,5,  $37^\circ\text{C}$ . Б. Зависимость интенсивности полосы поглощения  $1742\text{ см}^{-1}$  от времени в ИК-спектре трипсина, а также ИК-спектрах внешнего и внутреннего растворов МАХ2 и МАХ6, инкубируемых с трипсином, рН 8,5,  $37^\circ\text{C}$ .

При неизменном содержании СБЭ- $\beta$ -ЦД в ИК-спектрах внутреннего раствора системы МАХ-трипсин наблюдается увеличение интенсивности узкой полосы  $1742\text{ см}^{-1}$ ,

соответствующей колебаниям карбоксильных групп (Рисунок. 42.Б). Такой эффект может быть обусловлен биодegradацией уретановых связей в полимерной структуре МАХ, а также автолизом трипсина. Однако увеличение интенсивности полосы  $1742\text{ см}^{-1}$  для системы МАХ-трипсин намного более выражено, чем в случае свободного трипсина, т.е. действительно наблюдается гидролиз МАХ.

Отсутствие выраженных изменений в полосе поглощения  $1742\text{ см}^{-1}$  во внешнем растворе подтверждает предположение о частичном гидролизе МАХ. Уменьшение плотности структуры под действием трипсина может приводить к ускорению высвобождения МФ.

Таким образом, воздействие ферментов, например, протеаз способствует увеличению скорости высвобождения ФХ из полимерной матрицы МАХ. При этом сохраняется замедленное высвобождение лекарства, концентрация которого может достигать значений, необходимых для проявления антибактериального действия.

### **3.6. Влияние производных $\beta$ -циклодекстрина на антибактериальную активность фторхинолонов *in vitro***

Замедленное высвобождение ФХ может способствовать пролонгированному антибактериальному действию вследствие постепенного повышения концентрации лекарства. Однако также возможно и снижение антибактериальной активности из-за крайне медленного высвобождения лекарства (концентрации ФХ не достигают значений МИК). Поэтому важно исследовать влияние физико-химических свойств лигандов (размеров, структуры,  $\zeta$ -потенциала и молекулярной архитектуры) на антибактериальные свойства ФХ *in vitro*.

Для исследования влияния различных производных ЦД на антибактериальную активность ФХ были выбраны следующие носители: мономерные  $\beta$ -ЦД ( $K_{\text{дис}} \text{ ФХ} + \beta\text{-ЦД} \sim 10^{-3} - 10^{-4} \text{ М}$ ); отрицательно заряженные частицы полимера на основе СБЭ- $\beta$ -ЦД (С5), для которых характерны  $K_{\text{дис}} \sim 10^{-4} \text{ М}$  и  $\sim 10^{-6} \text{ М}$ , соответственно; и системы МАХ с относительно быстрой и самой медленной скоростью высвобождения МФ: МАХ2 и МАХ6 (высвобождение  $\sim 50\%$  и  $\sim 30\%$  МФ за 24 часа соответственно при pH 7,4).

Антибактериальное действие ФХ было исследовано *in vitro* на двух штаммах ГрО бактериальных клеток *Escherichia coli* МН1 [163] и JM109 [162]. Данные штаммы были выбраны, поскольку близки генетически, однако у штамма JM109 наблюдается наличие белковых структур на поверхности клетки – фимбрий. Структурные особенности поверхности клетки могут обуславливать различную адсорбцию частиц на поверхность

клеток и, следовательно, разное антибактериальное действие. Использование данных штаммов позволяет провести сравнение действия МФ свободного и в системах доставки на основе  $\beta$ -ЦД.

### 3.6.1. Определение минимальной ингибирующей концентрации фторхинолонов

Для определения минимальной ингибирующей концентрации ФХ на штаммах *E.coli* МН1 и JM109 был использован метод диффузии в агаре (Рисунок 43): на чашках Петри с нанесенной бактериальной культурой вырезались диски агара диаметром 9 мм, далее в лунки помещался исследуемый образец и спустя сутки инкубации при 37°C были оценены диаметры зон ингибирующего действия (ДЗИ).

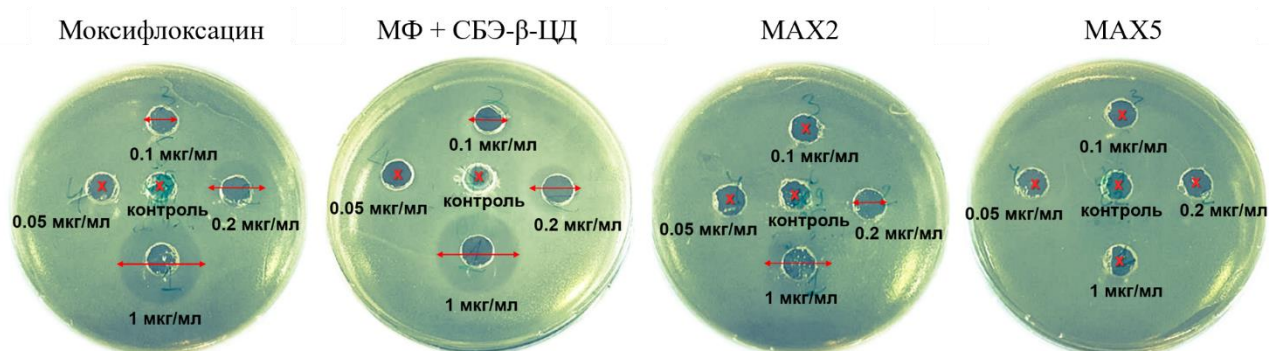


Рисунок 43. Диаметры зон ингибирующего действия образцов на штамме *E.coli* МН1, метод диффузии в агаре, рН 7,4, 37°C, 24 часа.

Для антибактериального препарата ЦФ, ЛФ и МФ характерны концентрационные зависимости значений ДЗИ (Таблица 23) для обоих штаммов *E.coli*. Для МФ и ЛФ МИК<sub>МН1</sub> и МИК<sub>JM109</sub> составляют примерно 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно, при этом ЦФ характеризуется большими значениями МИК: 0,2 мкг/мл и 2 мкг/мл. Полученные интервалы значений МИК для ФХ согласуются с известными значениями, характерными для других штаммов бактерий (Таблица 2).

Таблица 23. Значения диаметров зон ингибирования роста (мм) на исследуемых штаммах *Escherichia coli*, метод диффузии в агаре, рН 7,4, 37°C, 24 часа.

Концентрация фторхинолона, мкг/мл	ЦФ	ЛФ	МФ	СБЕ-β-ЦД	ГП-β-ЦД	МФ + СБЭ-β-ЦД	ЛФ + ГП-β-ЦД	С5	МФ + С5	ЛФ + С5	МАХ2	МАХ6
<i>E.coli MH1</i>												
0 (контроль)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1	-	10,5 ± 0,5	11 ± 0,5	-	-	11 ± 0,5	11,5 ± 0,5	-	10,5 ± 0,5	11,5 ± 0,5	-	-
0,2	10 ± 0,5	14 ± 0,5	14 ± 0,5	-	-	15 ± 0,5	15 ± 0,5	-	14 ± 0,5	15 ± 0,5	11 ± 0,5	-
1	19 ± 0,5	24 ± 0,5	22 ± 0,5	-	-	21,5 ± 0,5	24,5 ± 0,5	-	21 ± 0,5	23 ± 0,5	18 ± 0,5	-
<i>E.coli JM109</i>												
0 (контроль)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	10 ± 0,5	11 ± 0,5	-	-	11 ± 0,5	11 ± 0,5	-	10,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5	-	-
2	11 ± 0,5	13 ± 0,5	12 ± 0,5	-	-	13 ± 0,5	12,5 ± 0,5	-	12 ± 0,5	13 ± 0,5	11 ± 0,5	-
5	15 ± 0,5	18 ± 0,5	17,5 ± 0,5	-	-	18 ± 0,5	17 ± 0,5	-	17 ± 0,5	18,5 ± 0,5	12 ± 0,5	-
10	19 ± 0,5	23 ± 0,5	23 ± 0,5	-	-	22,5 ± 0,5	22 ± 0,5	-	22 ± 0,5	23 ± 0,5	15 ± 0,5	-



Важно отметить, что штамм JM109 менее восприимчив к действию ФХ, чем штамм *E.coli* MN1 ( $МИК_{MN1} < МИК_{JM09}$  в 10 раз для всех ФХ). Значимое отличие в значениях МИК для двух штаммов может быть обусловлено различным строением поверхности бактериальных клеток. Так, у штамма JM109 присутствуют белковые структуры фимбрии поверх клеточной стенки. Дополнительный белковый слой может выступать еще одним барьером от проникновения антибактериальных препаратов.

Свободные производные  $\beta$ -ЦД не проявляют антибактериальной активности (не наблюдается возникновение ДЗИ при  $C_{\beta\text{-ЦД}} \leq 10$  мкг/мл), что также подтверждается литературными данными о нетоксичности и биосовместимости производных  $\beta$ -ЦД [155]. Комплексы ФХ с производными  $\beta$ -ЦД характеризуется такими же значениями ДЗИ, что и свободные ФХ для обоих штаммов, что указывает на отсутствие значимого влияния комплексообразования лекарства с производными  $\beta$ -ЦД на МИК ФХ. Возможно, данный эффект обусловлен быстрой кинетикой высвобождения ФХ (Рисунок 40): уже 100% свободного лекарства высвобождается в течение часа.

Для выяснения влияния полимеризации  $\beta$ -ЦД на антибактериальную активность ФХ были исследованы комплексы ФХ с С5 и системы МАХ. Важно отметить, что незагруженный полимер С5 не проявляет антибактериальной активности, как и мономерные производные  $\beta$ -ЦД в тех же условиях. Таким образом, «сшивание» торцов ЦД обуславливает формирование более крупной системы диаметром порядка 200 нм с выраженным зарядом поверхности, но не способствует возникновению антибактериальных свойств.

Ранее было показано, что комплекс МФ с полимером С5 характеризуется значениям  $K_{\text{дис}} 5,2(\pm 0,3) \times 10^{-6}$  М (Таблица 20). При исследовании антибактериального действия комплексов ФХ с полимерами С5 было обнаружено, что значения ДЗИ систем сравнимы со значениями ДЗИ свободного ФХ.

Таким образом, использование как мономерных ЦД, так и полимеров на их основе, в качестве систем доставки не способствует снижению антибактериальных свойств МФ вне зависимости от значения  $K_{\text{дис}}$ . Возможно отсутствие влияния носителя на МИК ФХ обусловлено сравнительно быстрым высвобождением лекарства из носителя – 100% МФ высвобождается в течение двух часов.

Как было показано ранее, инкапсулирование МФ в системы МАХ обуславливало наиболее медленное высвобождение лекарства. Т.е. можно ожидать, что МАХ2 и МАХ6, которые высвобождают ~30% и ~60% МФ за 24 часа при pH 7,4 (в сравнении со свободным МФ), будут обладать меньшими значениями МИК в 24 часовых экспериментах.

Согласно полученным данным МАХ2 проявляет выраженную антибактериальную активность, однако чуть в меньшей степени, чем свободный МФ. Так, значения МИК<sub>МАХ2</sub> в среднем в два раза больше, чем для свободного МФ (для клеток *E.coli* МИК<sub>МН1</sub> и МИК<sub>М09</sub> для МАХ2 составляют примерно 0,2 мкг/мл и 2 мкг/мл соответственно), что приблизительно соответствует 60% МФ, высвобожденному из МАХ2. Т.е., если учесть, что не весь МФ высвобождается за 24 часа из МАХ2, то эффективность действия МАХ2 в пересчете на процент высвобождения не ниже, чем для свободного МФ.

МАХ6 продемонстрировал отсутствие антибактериальной активности (в течение 24 часов). По-видимому, снижение эффективности антибактериального действия связано с крайне низкой скоростью высвобождения лекарства в течение 1 суток (30% МФ).

Для более детального исследования антибактериальной активности МФ, а также установления тенденции к пролонгированному действию, был проведен эксперимент в жидких питательных средах в течение более длительного периода времени (7 дней).

### **3.6.2. Влияние носителей на основе β-циклодекстрина на антибактериальные свойства фторхинолонов в течение длительного периода времени**

Поскольку в литературе не изучалось антибактериальное действие лекарства в системе доставки в течение длительного периода времени на растущей бактериальной культуре, то в первую очередь была разработана следующая методика: суточная бактериальная культура разбавлялась свежей питательной средой, затем к суспензии микроорганизмов добавлялся образец, и система инкубировалась в течение семи дней с периодическим отбором аликвот для контроля как общего количества клеток (по плотности на 600 нм), так и жизнеспособных клеток (высев на чашках Петри и подсчет КОЕ).

Согласно полученным данным в контрольных культурах в течение первых четырех дней наблюдался рост бактериальных клеток. Дальнейшее инкубирование клеток до 7 дней приводит к небольшому снижению КОЕ. Отсутствие изменений в плотности поглощения на 600 нм на 4-7 сутки указывает на отсутствие лизиса клеток.

Для изучения влияния концентрации антибактериального агента МФ на степень гибели микроорганизмов (как в свободном виде, так и в системе доставки) были выбраны три различные концентрации препарата: МИК (0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл для штаммов *E.coli* МН1 и М109, соответственно), а также трехкратный и пятнадцатикратный избытки МИК (далее 3МИК и 15МИК). Концентрации, близкие к значениям МИК, были выбраны, чтобы основная масса клеток оставалась живой и способной делиться в течение нескольких дней.

В таких условиях можно следить за активностью МФ как свободного, так и в комплексах (носителя), в течение относительно длительного периода времени (до 7 дней). Концентрация 15МИК была выбрана для оценки предельно возможной антибактериальной активности образцов.

В первую очередь была изучена концентрационная зависимость антибактериального действия МФ (Рисунок 44). Антибактериальная активность образца (АА) рассчитывалась, как доля погибших жизнеспособных клеток в результате воздействия МФ, при этом был взят десятичный логарифм от данной величины, чтобы учесть разницу в несколько порядков:

$$AA = \lg \frac{КОЕ_{\text{контроль}}}{КОЕ_{\text{МФ}}} \quad (7)$$

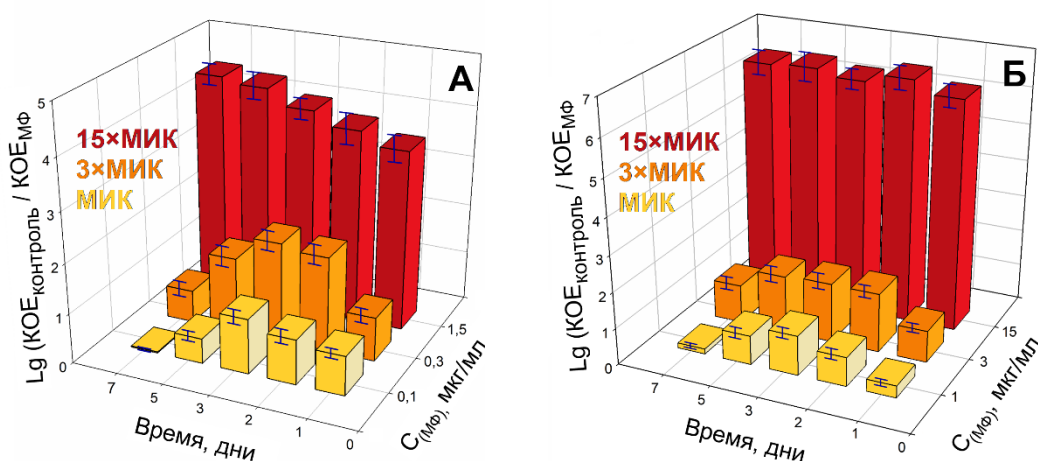


Рисунок 44. Антибактериальная активность моксифлоксацина в трех разных концентрациях (МИК, 3МИК и 15МИК) в семидневном эксперименте на жидких питательных средах на штаммах *E.coli* MN1 (А) и JM109 (Б), рН 7,4, 37°C.

Обнаружено, что МФ в концентрациях близких к МИК проявляет выраженную антибактериальную активность только в течение первых трех дней эксперимента. После 3-4 суток наблюдается увеличение КОЕ и значения поглощения на 600 нм, что указывает на рост бактериальных клеток. Вышеописанная тенденция характерна для обоих штаммов. Прекращение антибактериального действия МФ может быть связано с биодegradацией лекарственной молекулы [202]. Согласно литературным данным [24,203] ФХ склонны к фотодegradации, а также биодegradации, при которой наблюдается отщепление атома фтора, окисление и/или разрыв гетероцикла. Изменение структуры фармакофора под воздействием различных веществ микроорганизмов может обуславливать отсутствие длительного антибактериального действия ФХ в низких концентрациях.

При концентрации 15МИК МФ демонстрирует высокую антибактериальную активность на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует о том, что при высоком содержании ФХ большая часть жизнеспособных клеток погибает в первые сутки эксперимента, и биодegradация препарата (изменение структуры фармакофора) не наблюдается.

Полученные результаты указывают на то, что для изучения влияния носителя на антибактериальные свойства ФХ, в том числе и пролонгированного антибактериального действия, исследования необходимо проводить концентрациях вблизи значений МИК.

Аналогично исследованиям на твердых средах незагруженные носители на основе ЦД (СБЭ-β-ЦД, полимер С5) не проявляют антибактериального действия для обоих штаммов (при концентрации торов ЦД < 10 мкг/мл): значения КОЕ и поглощения на 600 нм сравнимы со значениями, характерными для контрольных образцов бактерий, с учетом погрешности. Полученные данные подтверждают ранее полученные результаты об отсутствии антибактериального действия производных ЦД по данным МИК.

Для изучения влияния носителя на антибактериальные свойства МФ в течение семи дней был рассчитан коэффициент усиления действия (КУД) МФ, т.е. действие свободного лекарственного препарата принималось за единицу:

$$\text{КУД} = \frac{\text{КОЕ}_{\text{МФ}}}{\text{КОЕ}_{\text{МФ+носитель}}} \quad (8)$$

Образование комплексов МФ с мономерными производными β-ЦД приводит к увеличению эффективности действия антибактериального действия в 1,2-1,4 раза в течение первых 4х дней. Улучшение антибактериального действия может быть обусловлено увеличением растворимости ФХ, улучшением адсорбции комплексов на поверхности клеток, а также защитой лекарственных молекул от биодegradации. На седьмой день комплексы характеризуются антибактериальной активностью, сравнимой с действием самого МФ, т.е. пролонгированного антибактериального действия для комплексов МФ-ЦД не наблюдается.

Для исследования влияния полимеризации на антибактериальные свойства МФ были выбраны полимер С5, который характеризуется отрицательным поверхностным зарядом (-18,7±1,1мВ) и значением  $K_{\text{дис}}$  комплекса с лекарством  $5,2(\pm 0,3) \times 10^{-6} \text{М}$ , а также МАХ2, для которого характерно высвобождение ~60% МФ за 24 часа.

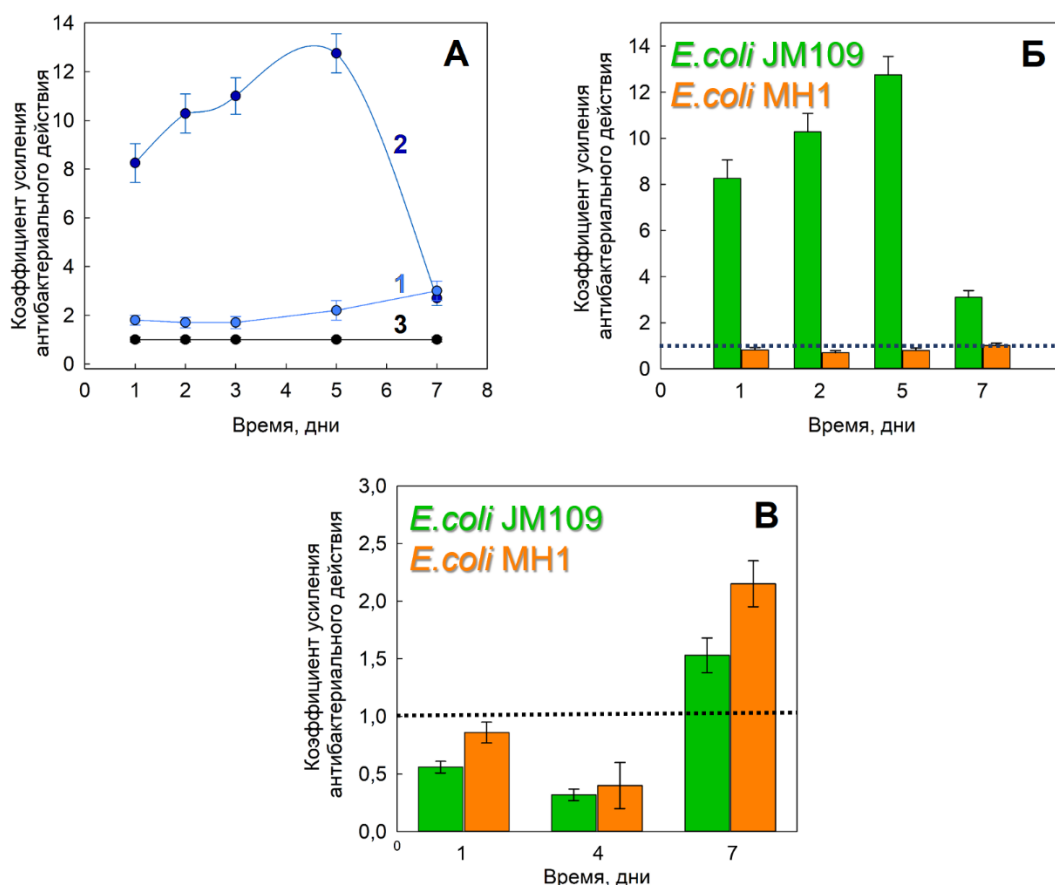


Рисунок 45. А. Коэффициент усиления антибактериального действия моксифлоксацина при образовании комплекса МФ+С5 в трех разных концентрациях МИК (1), 3МИК (2) и 15МИК (3) в семидневном эксперименте на жидких питательных средах, *E.coli* JM109, pH 7,4, 37°C. Коэффициент усиления антибактериального действия моксифлоксацина для системы МФ+С5 (Б) и МАХ2 (В) на *E.coli* МН1 и JM109, действие МФ показано пунктирной линией,  $C_{\text{МФ}}$  0,3 и 3 мкг/мл (Б), 0,1 или 1 мкг/мл (В) соответственно, pH 7,4, 37°C.

Согласно значениям КУД (Рисунок 45) для штамма JM109 полимерные носители на основе СБЭ-β-ЦД усиливают антибактериальное действие лекарственной молекулы с первого дня эксперимента при концентрациях близких к МИК. Наибольшее усиление характерно для С5: возможно достижение значений КУД = 10-12. Для МАХ2 усиление антибактериального действия МФ менее выражено, что скорее всего связано с замедленным высвобождением лекарства. Тем не менее, применение полимерных носителей позволяет улучшить антибактериальные свойства лекарственного препарата в несколько раз. Такой эффект может быть связан с адсорбцией частиц на поверхности клеток и создания высоких локальных концентраций МФ. Кроме того, носители на основе ЦД могут препятствовать биodeградации МФ, поскольку включение лекарства в полимерную

матрицу может обуславливать защиту молекулы от ферментативных и химических воздействий.

Для штамма МН1 также было обнаружено усиление антибактериальной активности МФ, однако КУД имеет более низкие значения (до 2,5). Кроме того, наиболее выраженный эффект наблюдается для образца МАХ2. Поскольку штаммы МН1 и JM109 различаются морфологией поверхности (наличием белковых фимбрий), то можно предположить, что системы МАХ и МФ+С5 имеют разное сродство к поверхности бактериальных клеток, что объясняет разную антибактериальную активность образцов.

### **3.6.3. Влияние носителей на основе $\beta$ -циклодекстрина на механизм антибактериального действия моксифлоксацина и ультраструктуру бактериальных клеток**

Поскольку *in vitro* исследование продолжалось в течение длительного периода времени (7 дней) важно следить за состоянием клеток в процессе действия антибактериальных препаратов при МИК. Для визуализации и более детального исследования антибактериального действия исследуемых препаратов состояние и ультраструктуру бактериальных клеток контролировали методом ТЕМ.

Ультратонкие срезы исходной (суточной) бактериальной культуры, используемой для эксперимента, демонстрируют гомогенность клеток, которые находятся в одной фазе роста (Рисунок 46.А). При сравнении двух штаммов не наблюдается морфологическая разница в ультраструктуре как поверхности, так и во внутреннем содержимом клеток. По-видимому, вследствие сложности и многостадийности метода фиксации клеток белковые выросты - фимбрии, расположенные на поверхности клеток JM109, разрушаются.

Инкубация контрольной культуры в течение 3-5 дней приводит к увеличению числа клеток и появлению морфологической гетерогенности, что характерно для обоих штаммов (Рисунок 46.В,Г). На микрофотографиях наблюдается появление мертвых клеток, однако на 5 день эксперимента основная масса культуры сохраняет нормальное строение, что свидетельствует об их жизнеспособности и возможности продолжения эксперимента более пяти дней для выявления пролонгированности антибактериального действия ФХ.

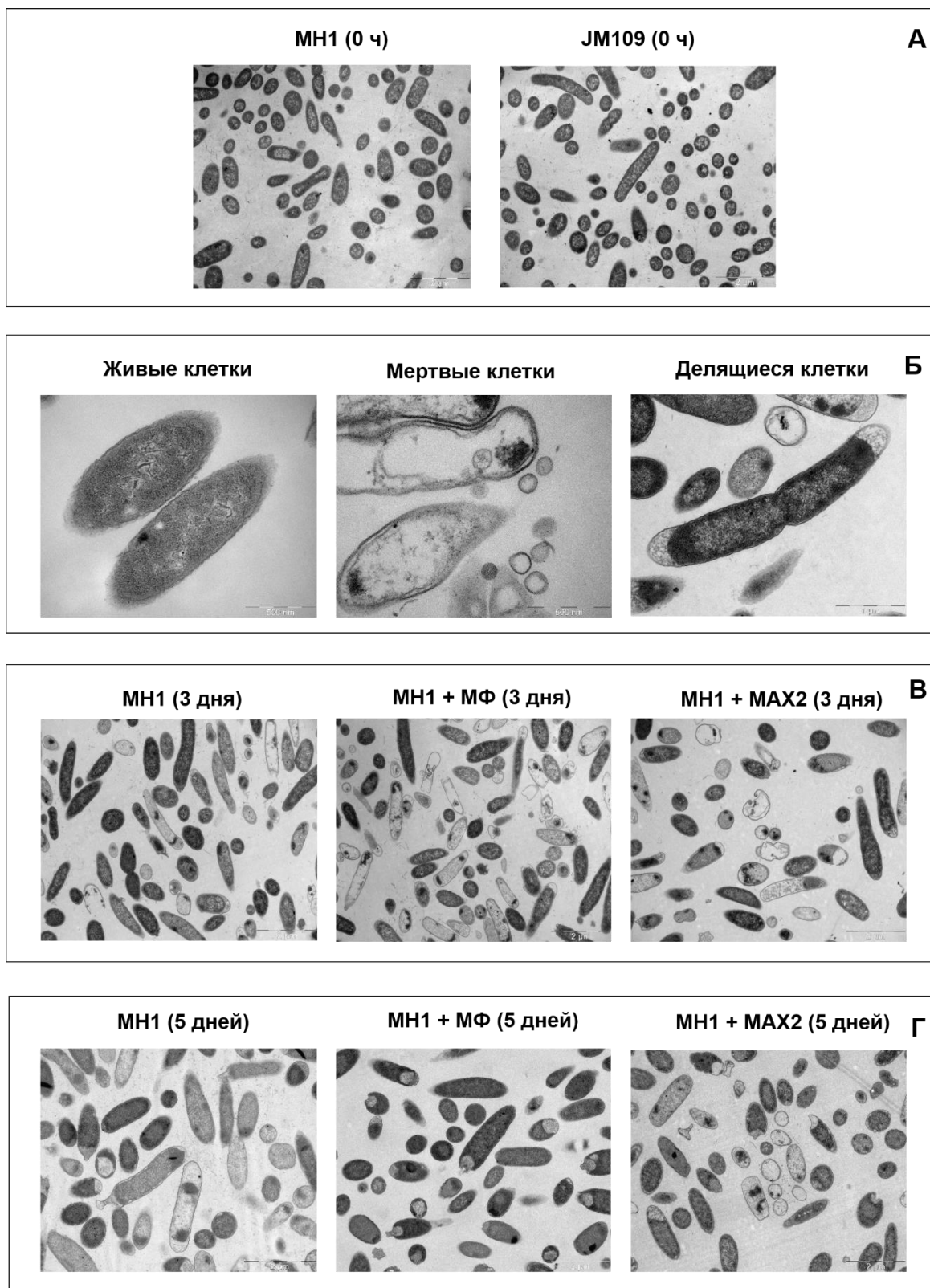


Рисунок 46. А. Микрофотографии ультратонких срезов исходной (ночной) культуры *E.coli* МН1 и JM109. Масштабный отрезок - 2 мкм. Б. Микрофотографии ультратонких срезов живых, мертвых и делящихся клеток. Масштабные отрезки – 500 нм, 500 нм и 1 мкм. В. Микрофотографии срезов клеток *E.coli* МН1, которые инкубировали в течение 3 дней в присутствии или отсутствии образца. Масштабные отрезки – 2 мкм. Б. Микрофотографии

живых, мертвых и делящихся клеток. Масштабные отрезки – 500 нм, 500 нм и 1 мкм. Г. Микрофотографии ультратонких срезов клеток *E.coli* МН1, которые инкубировали в течение 5 дней в присутствии или отсутствии образца. Масштабные отрезки – 2 мкм.

На микрофотографиях образцов, подвергнутых воздействию МФ или системе МФ-носитель ЦД (С5 или МАХ2) в течение 3 суток (Рисунок 45.В), количество мертвых клеток заметно больше, чем в контрольном образце, однако все еще значительное количество клеток остается живыми. Важно отметить, что во всех исследуемых образцах (как в контроле, так и в присутствии МФ) были обнаружены делящиеся клетки, что указывает на их жизнеспособность на 3 день эксперимента.

На микрофотографиях образцов, инкубируемых в течение 5 дней, наблюдается выраженная разница между воздействием МФ и МФ в системе доставки (Рисунок 45.Г): в случае МФ наблюдается бóльшая гомогенность клеток по сравнению с действием МАХ2. Кроме того, количество мертвых клеток в образце МАХ2 значительно больше. Такой результат подтверждает ранее полученные результаты о прекращении антибактериального действия МФ при МИК после 3-4 суток. В отличие от МФ система МАХ2 медленно высвобождает молекулы МФ, которые проявляют антибактериальную активность и на 5-7 сутки (наблюдается бóльшее количество мертвых клеток).

При более детальном исследовании влияния носителя на механизм антибактериального действия МФ не было обнаружено выраженных изменений в ультраструктурах поверхности и цитоплазмы как живых, так и погибших клеток, по сравнению с образцом, содержащим МФ. Таким образом, по-видимому, носитель не изменяет механизма действия ФХ: лекарственные молекулы проникают внутрь клетки путем пассивной диффузии и участвуют в ингибировании ДНК-гиразы и/или топоизомеразы IV.

Усиление действия МФ (Рисунок 45) может быть обусловлено взаимодействием частиц с бактериальной поверхностью, что может, как способствовать возникновению дефектов во внешней мембране ГрО клеток (и улучшению проникновения лекарственных молекул), так и обуславливать высокую локальную концентрацию препарата за счет адсорбции.



### 3.6.4. Исследование адсорбции частиц на поверхности бактериальных клеток

Для исследования взаимодействия носителей на основе ЦД с бактериальными клетками *E.coli* в первую очередь была изучена морфология поверхности двух штаммов. Поскольку ранее было показано, что пробоподготовка ультратонких срезов бактерий приводит к разрушению фимбрий, то для исследования структурных особенностей поверхности клеток штаммов МН1 и JM109 был использован другой способ фиксации *E.coli*: промытая в воде суспензия клеток высушивалась на винилформальдегидной пленке на медной сетке с последующей обработкой фосфовольфрамовой кислотой в качестве контрастирующего агента.

На Рисунке 47 представлены полученные микрофотографии исследуемых штаммов. Обнаружено, что для штамма JM109 характерно наличие белковых пилей и жгутиков, в то время как у штамма МН1 характерны только жгутики. В среднем длина жгутиков составляет 2,5 - 4 мкм, а длина фимбрий 0,3 – 1 мкм. Полученные данные подтверждают литературные данные об особенностях строения штамма JM109. Различия в строении поверхности клеток могут обуславливать различное сродство к частицам и, как следствие, проявлению разной степени антибактериального действия МФ.

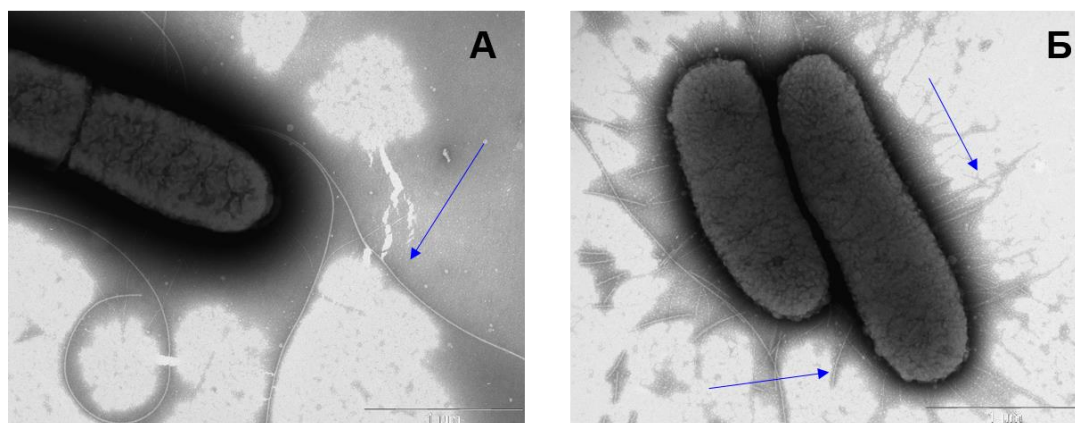


Рисунок 47. Микрофотография бактерий *E.coli* МН1 (А) и JM109 (Б). Стрелками показаны жгутики и пили. Масштабный отрезок – 1 мкм.

Для исследования адсорбции частиц на поверхности клеток были выбраны МАХ2 с нейтральным  $\zeta$ -потенциалом и комплекс МФ с полимером С5 с отрицательным  $\zeta$ -потенциалом. Согласно ранее полученным данным по антибактериальной активности наибольшее усиление антибактериального действия МФ для МФ+С5 наблюдается для штамма JM109, а для МАХ2 - для штамма МН1. Таким образом, можно ожидать, что

комплекс будет лучше адсорбироваться на штамм JM109, для которого характерны фимбрии.

Для исследования влияния фимбрий на поверхностный заряд клеток был исследован  $\zeta$ -потенциал бактериальной поверхности. Штаммы *E.coli* MN1 и JM109 характеризуются значениями  $\zeta$ -потенциалов  $-36,8 \pm 4,5$  мВ и  $-35,5 \pm 5,6$  мВ соответственно, что соотносится с литературными данными (для других штаммов *E.coli*) [204,205]. Отсутствие различий в  $\zeta$ -потенциале двух штаммов указывает на то, что фимбрии не оказывают значительного влияния на заряд поверхности клеток.

Установлено, что для обоих штаммов образование комплексов МФ с мономерными ЦД способствует увеличению адсорбции МФ на клетках в 2-3 раза.

Поскольку *E.coli* MN1 и JM109 имеют выраженный отрицательный  $\zeta$ -потенциал, то можно предположить, что комплексы МФ с полимером C5 (который содержит сульфогруппы) будут в меньшей степени адсорбироваться на клетках вследствие отталкивания одноименных заряженных поверхностей по сравнению с частицами MAX2. Однако авторы [206] показали, что фимбрии *S. typhimurium* обуславливают более выраженную адгезию клеток на частицы минералов, которые характеризуются  $\zeta$ -потенциалами от -14 до -40 мВ, по сравнению с адгезией бактерий *S. typhimurium* без фимбрий. Кроме того, было показано трехкратное усиление адгезии бактерий к отрицательно заряженным поверхностям (катионообменным смолам) по сравнению с положительно заряженными поверхностями (анионообменным смолам) при наличии фимбрий. Как считают авторы, несмотря на то что фимбрии в целом имеют отрицательный заряд, они также содержат и положительно заряженные функциональные группы и гидрофобные фрагменты, которые могут способствовать преодолению сил отталкивания от отрицательно заряженных поверхностей.

Согласно результатам исследования, концентрации адсорбированных частиц (Рисунок 48) обнаружено, что полимерные системы способствуют усилению адсорбции частиц в 4,5 – 5,5 раз по сравнению с МФ. При этом штамм JM109 в большей степени (в 2-3 раза) адсорбирует оба типа частиц (МФ+C5 и MAX2) по сравнению со штаммом MN1 в широком диапазоне концентраций частиц. Таким образом, действительно, наличие фимбрий обуславливает усиление адсорбции частиц на поверхности клеток и формирование высоких локальных концентраций лекарства, что в конечном счете усиливает антибактериальную активность МФ.

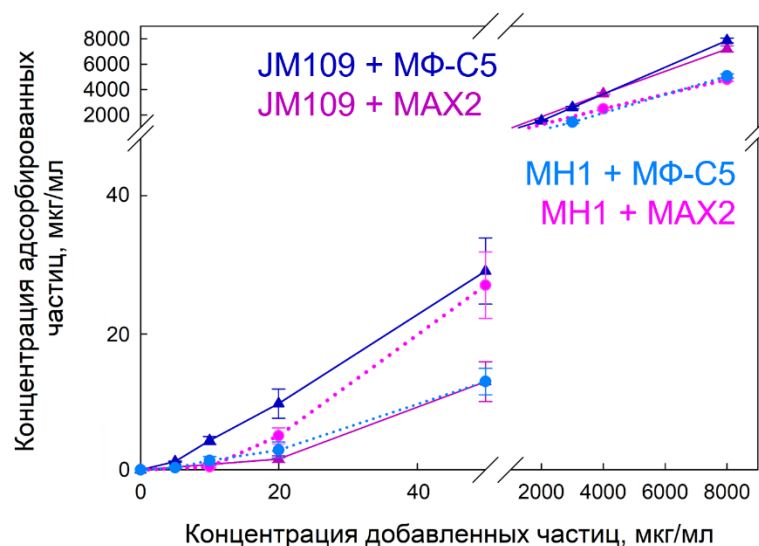


Рисунок 48. Зависимость концентрации адсорбированных частиц от исходной концентрации, добавленной к клеточной суспензии,  $1,0 \times 10^8$  клеток/мл,  $H_2O$ ,  $37^\circ C$ , 1 час.

Однако важно отметить, что для малых концентраций частиц ( $< 50$  мкг/мл), которые соответствуют экспериментам *in vitro*, штамм JM109 лучше адсорбирует комплекс МФ+С5, а для штамма MN1 наибольшее сродство наблюдается для нейтральной частиц МАХ2. Такой эффект подтверждает предположение о том, что фимбрии могут обуславливать усиление адсорбции именно отрицательно заряженных частиц на поверхности клеток. Поскольку у штамма MN1 присутствуют только жгутики, то адсорбция нейтрально заряженных частиц (МАХ2) выше, чем отрицательно заряженного полимера (МФ+С5).

### 3.6.5. Исследование адсорбции комплексов полимерных частиц на основе $\beta$ -циклодекстрина методом TEM

С целью более глубокого изучения адсорбции частиц бактериальная суспензия в присутствии частиц была исследована методом TEM. Для визуализации процесса взаимодействия частиц с поверхностью клеток был выбран штамм JM109, для которого наблюдается наилучшая адсорбция частиц.

Исследуемые полимерные носители на основе СБЭ- $\beta$ -ЦД обладают схожей структурой и аналогичным гидродинамическим радиусом, поэтому для дальнейшего изучения был выбран один тип частиц - С5 с анионной поверхностью. Комплексы МФ+С5 представляют собой гидрофильные высокогидратированные структуры, которые разрушаются под действием пучка электронов высокоэнергетического напряжения. Кроме того, поскольку в составе частиц нет атомов, которые могут хорошо поглощать поток

электронов, можно ожидать, что полимерная сетка будет плохо видна на микрофотографиях.

Действительно, при исследовании водного раствора МФ+С5 частицы не адсорбируются на поверхности или, что также возможно, не визуализируются.

Смена буфера на PBS приводит к проявлению на микрофотографиях рыхлых агрегатов частиц (Рисунок 49.А, черные области), расположенных вблизи кристаллов фосфата натрия (Рисунок 49.А, серые древообразные области). Однако в целом частицы плохо видны.

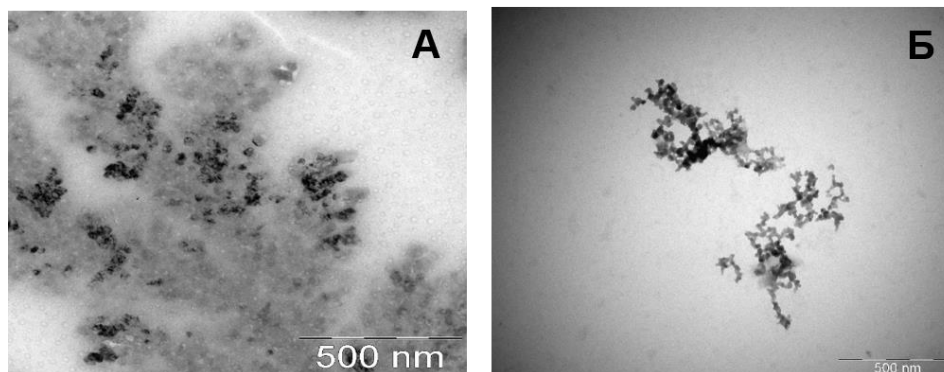


Рисунок 49. А. Микрофотография высушенных частиц МФ+С5 на медной сетке с пленкой-подложкой из винилформальдегида, PBS. Масштабный отрезок - 500 нм. Б. Микрофотография высушенных частиц С5 в воде, предварительно обработанных медным купоросом, H<sub>2</sub>O. Масштабный отрезок - 500 нм.

Для улучшения визуализации частиц было предложено использовать специфическую реакцию с ионами Cu<sup>2+</sup>. Известно, что ЦД способны образовывать комплексные соединения с ионами металлов. Вследствие ассоциации молекул ЦД образуются упорядоченные супрамолекулярные гомо- или гетерометаллические структуры (например, «сэндвич», цилиндрические, зигзагообразные и др.), при этом ионы металла координируются атомами кислорода –ОН групп ЦД. Супрамолекулярная структура также поддерживается внутри- и межмолекулярными Н-связями (Рисунок 50) [198].

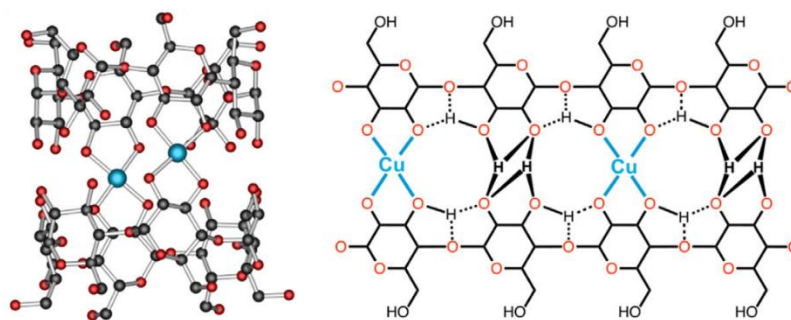


Рисунок 50. Схематическое представление супрамолекулярной архитектуры, которая образуется вследствие координации иона меди (II) вторичными гидроксильными группами  $\beta$ -циклодекстрина [198].

Кроме того, полимер C5 характеризуется выраженным отрицательным  $\zeta$ -потенциалом, поэтому возможно и образование электростатических взаимодействий между сульфогруппами полимера и ионами меди. Так, авторами была продемонстрирована адсорбция катионов металлов отрицательно заряженными полимерами на основе  $\beta$ -ЦД [119]. Таким образом, внесение  $\text{Cu}^{2+}$  к частицам должно привести к высокой степени загрузки металлом и, как следствие, улучшению визуализации частиц.

При обработке частиц C5 медным купоросом (получение комплекса C5-Cu) наблюдалось значительное улучшение визуализации полимера (Рисунок 49.Б): обнаружены агрегаты частиц, а также выраженные темные области, соответствующие полимерной сетке.

Таким образом, для обнаружения органических полимерных частиц с выраженным отрицательным зарядом методом ТЕМ можно использовать растворы  $\text{Cu}^{2+}$  в качестве удобного и доступного контрастирующего агента. При этом в случае полимеров на основе  $\beta$ -ЦД происходит не только электростатические взаимодействия, но и координация с иона металла торами ЦД. Для последующего исследования адсорбции частиц на клетках методом ТЕМ использовались частицы C5-Cu.

Для визуализации адсорбции частиц была предложена другая методика: непосредственное высушивание суспензии клеток с частицами C5-Cu на подложке без последующей обработки.

При таком способе фиксации клетки представляют собой темные «отпечатки» овальной формы. Инкубация бактериальных клеток в присутствии медного купороса не приводит к визуальным изменениям формы клеток (Рисунок 51.А). При исследовании суспензии клеток с частицами C5-Cu обнаружена адсорбция агрегатов частиц на поверхности бактерий. При этом полимер «обволакивает» клетки (Рисунок 51.Б). Таким

образом, полученные микрофотографии подтверждают вышеописанные результаты об адсорбции частиц на поверхности клеток, что может являться важным фактором усиления антибактериальной активности лекарств в составе полимерных частиц.

Важно отметить, что при обработке высушенной суспензии небольшим количеством контрастирующего агента была обнаружена адсорбция частиц не только на поверхности бактерий, но и на фимбриях, что также свидетельствует об участии белковых структур во взаимодействии частиц с поверхностью клеток (Рисунок 51.В).

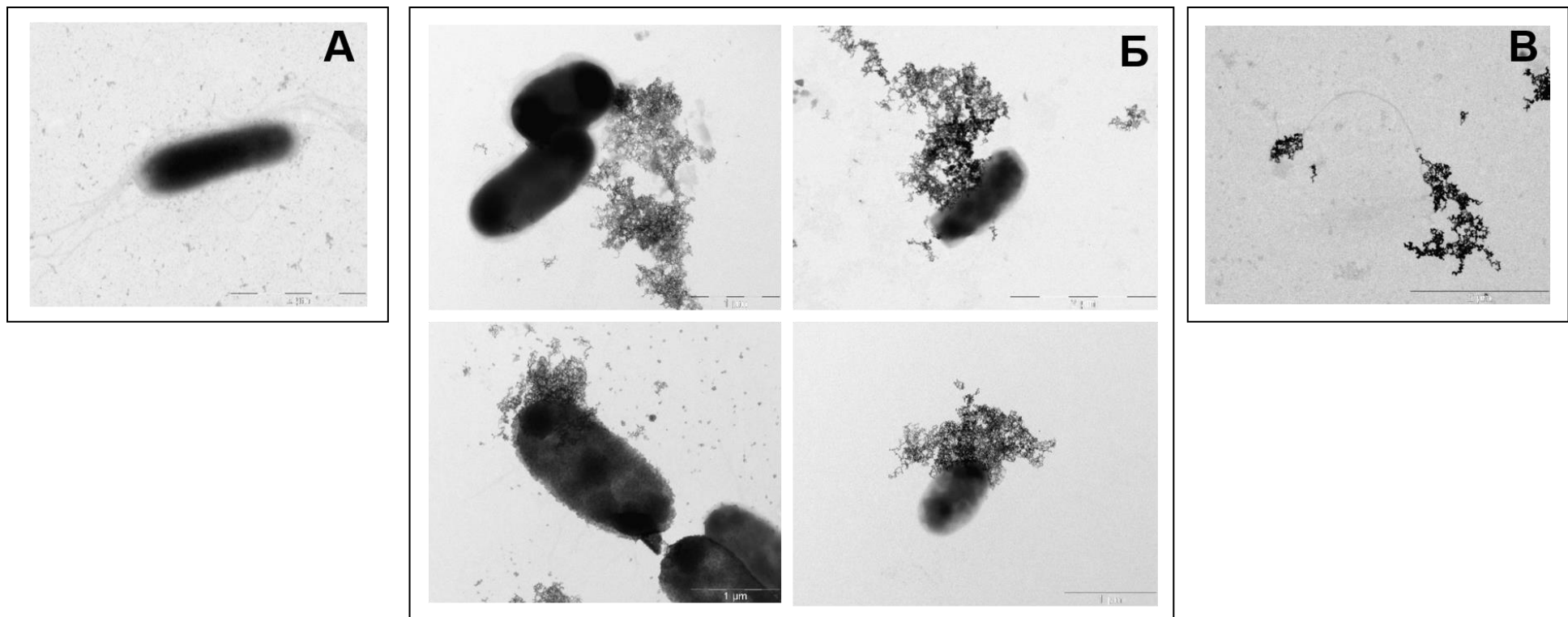


Рисунок 51. А. Микрофотография высушенной суспензии клеток *E.coli* JM09 на винилформальдегидной пленке, предварительно обработанная раствором медного купороса. Масштабный отрезок – 1 мкм. Б. Микрофотография адсорбции частиц С5-Сu на клетках *E.coli* JM09. Инкубация клеток с частицами в течение 1 часа в H<sub>2</sub>O при 37°С. Масштабные отрезки – 1 мкм, 2 мкм, 1 мкм и 1 мкм. В. Микрофотография адсорбции частиц С5-Сu на белковой фимбрии. Масштабный отрезок – 1 мкм.

## Заключение

В данной работе исследованы общие закономерности и потенциал возможного применения производных циклодекстринов для регуляции физико-химических и функциональных свойств фторхинолонов.

Определены основные механизмы образования комплексов включения типа «гость-хозяин» фторхинолонов с производными  $\beta$ -циклодекстрина, которые различаются природой заместителя (полярный незаряженный, неполярный и заряженный). Формирование комплексов основано на погружении ароматического остова фторхинолона в полость лиганда со стороны протонированной карбоксильной группы. При этом изменения в положении гетероцикла фторхинолона, который находится вне полости лиганда, обуславливают формирование дополнительных взаимодействий с заместителями циклодекстрина (гидрофобных, электростатических, водородных связей). Полимерные системы на основе циклодекстрина не изменяют механизм формирования комплексов фторхинолон-носитель. Однако, за счет того, что полимеры имеют достаточную структурную подвижность, чтобы заместители соседних торов циклодекстринов также участвовали во взаимодействиях с лекарственными молекулами, в полимерных комплексах происходит усиление эффективности связывания препарата в 10-20 раз по сравнению с мономерными циклодекстринами.

При использовании молекул моксифлоксацина в качестве темплата для формирования уникальной плотно-сшитой полимерной структуры с заданным размером пор под молекулы фторхинолонов было показано образование квазирегулярной полимерной матрицы, что не было характерно для полимеров на основе производных циклодекстринов. Кроме того, 3D-матриксные структуры позволяют достичь высокой степени загрузки лекарством (~ 85%), а также обладают выраженным замедленным профилем высвобождения препарата, степень которого зависит от плотности внутримолекулярной сшивки линкером.

Разработана методика исследования антибактериальной активности фторхинолонов *in vitro* в течение 7 дней на *E.coli*. Показано, что образование комплексов препаратов с мономерными циклодекстринами не приводит к изменениям в минимальной ингибирующей концентрации лекарства. Однако обнаружено, что полимерные системы и 3D-матриксные структуры усиливают антибактериальное действие лекарства (на 1-3 сутки), а также демонстрируют тенденцию к пролонгированному антибактериальному действию (на 4-7 сутки).



При изучении бактериальной суспензии и ультратонких срезов клеток методом просвечивающей электронной микроскопии установлено, что носители на основе циклодекстринов не изменяют механизм антибактериального действия фторхинолонов. Визуализация морфологии поверхности бактерий и адсорбции частиц показало высокую информативность при мониторинге процессов действия антибактериальных препаратов и их комплексов в системах *in vitro*.

В зависимости от анамнеза и способах введения в организм могут быть использованы различные носители на основе циклодекстрина. Так, при пероральном и ингаляционных способах введения одними из важных факторов препарата является растворимость ФХ, мукоадгезивные свойства носителя и пролонгированность действия. Таким образом, оптимальными являются комплексы ФХ с ЦД и полимерами на их основе. При внутривенном способе введения происходит сильное разбавление формуляции в плазме крови, что может привести к быстрому выбросу лекарственных молекул из носителя, поэтому наиболее перспективными лекарственными формами являются носители с наиболее медленным профилем высвобождения препарата. Выраженное замедленное высвобождение также важно для покрытий имплантов и внутрисуставных инъекций. Таким образом, для данных способов введения в организм оптимальными являются системы МАХ.

Кроме того, важно учитывать, что для инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, наличие фимбрий обуславливает усиление адсорбции частиц с отрицательным  $\zeta$ -потенциалом и, как следствие, выраженное усиление антибактериального действия. При отсутствии фимбрий предпочтительно использовать нейтрально заряженные частицы.

Результаты, полученные в данной работе, являются важным этапом в развитии области разработок высокоэффективных систем доставки и носителей лекарств с возможностью улучшения физико-химических и функциональных свойств существующих препаратов.

## Выводы

1. Установлено, что основным механизмом формирования комплексов ФХ с производными ЦД является заглубливание ароматического остова молекулы лекарства со стороны протонированной карбоксильной группы внутрь полости ЦД, а также формирование дополнительных взаимодействий между функциональными группами ФХ и заместителями в ЦД (гидрофобных, электростатических, водородных связей). Наиболее стабильные комплексы формируются для производных ЦД с гидрофобными и отрицательно заряженными заместителями. Найденные закономерности были подтверждены и обоснованы с использованием методов компьютерного моделирования.
2. Образование комплексов ФХ с производными ЦД приводит к увеличению растворимости молекул лекарства (на 20-60%), скорости растворения, изменению в характере связывания с липидным бислоем; комплексы демонстрируют высокую антибактериальную активность *in vitro* на двух штаммах *Escherichia coli*: наблюдается усиление антибактериальной активности фторхинолона моксифлоксацина на 20-40%.
3. Комплексы моксифлоксацина с полимерными системами, полученными на основе ЦД с полярным или отрицательно заряженным заместителем, характеризуются более эффективным комплексообразованием (в 10-20 раз) по сравнению с мономерными комплексами моксифлоксацин-ЦД; полимерный носитель с отрицательным  $\zeta$ -потенциалом обуславливает усиление антибактериального действия моксифлоксацина *in vitro* (в 10 раз на 1-5 сутки) и демонстрирует пролонгированное антибактериальное действие до 7 дней.
4. Инкапсулирование моксифлоксацина в полимерную матрицу ЦД методом темплатного синтеза (в качестве мономера используется комплекс ФХ-ЦД), приводит к формированию анизотропной структуры полимера с высокой степенью загрузки лекарства (~0,5 мг на 1 мг носителя) и выраженным замедленным высвобождением моксифлоксацина; системы обладают пролонгированным антибактериальным действием *in vitro*.
5. Усиление антибактериальной активности ФХ в комплексах с полимерными ЦД обусловлено защитой молекул препарата от биодеградациии, а также адсорбцией частиц на поверхности клеток и создания высокой локальной концентрации препарата. Наличие фимбрий на поверхности бактериальных клеток обуславливает предпочтительную адсорбцию частиц с отрицательным  $\zeta$ -потенциалом.

## Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.х.н. проф. Кудряшовой Е.В. за чуткое руководство, ценные замечания и рекомендации на всех этапах многолетней совместной научной работы.

Автор благодарен внутреннему рецензенту д.х.н. проф. Гладилину А.К. и оппонентам д.х.н. Марквичевой Е.А., д.б.н. Жданову Д.Д. и к.х.н. доц. Ефимовой А.А. за внимательное рассмотрение диссертационной работы и ценные комментарии.

Автор выражает особую благодарность к.х.н. доц. Ле-Дейген И.М. за всестороннюю помощь и рекомендации по интерпретации данных ИК-спектроскопии Фурье; к.ф.-м.н. в.н.с. Уповову И.В. за помощь и рекомендации по выполнению работ по компьютерному моделированию; к.х.н. доц. Белогуровой Н.Г. и к.б.н. с.н.с. Гольшеву С.А. за помощь в планировании экспериментов *in vitro* и интерпретации полученных результатов; д.х.н. проф. Еремееву Н.Л. за конструктивные замечания и предложения по улучшению научной и репрезентативной составляющих работы.

Автор благодарит весь коллектив кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за возможность реализации данной работы и внимательное отношение к научному труду.

Автор благодарен своим родным и близким за постоянную моральную поддержку на всех этапах выполнения и написания научной работы.

## Список использованной литературы

1. Thee S., Garcia-Prats A.J., Donald P.R., Hesselting A.C., Schaaf H.S. Fluoroquinolones for the treatment of tuberculosis in children // *Tuberculosis*. – 2015. – Vol. 95, № 3. – P. 229–245.
2. Zhanel G.G., Fontaine S., Adam H., Schurek K., Mayer M., Noreddin A.M., Gin A.S., Rubinstein E., Hoban D.J. A review of new fluoroquinolones: Focus on their use in respiratory tract infections // *Treat. Respir. Med.* – 2006. – Vol. 5, № 6. – P. 437–465.
3. Wang C., Han C., Geng N., Fan A., Wang Y., Yue Y., Zhang H., Xue F. Efficacy of oral moxifloxacin for aerobic vaginitis // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 35, № 1. – P. 95–101.
4. Chung J.L., Seo K.Y., Yong D.E., Mah F.S., Kim T. im, Kim E.K., Kim J.K. Antibiotic Susceptibility of Conjunctival Bacterial Isolates from Refractive Surgery Patients // *Ophthalmology*. – 2009. – Vol. 116, № 6. – P. 1067–1074.
5. Alam M.R., Hershberger E., Zervos M.J. The role of fluoroquinolones in the treatment of skin and soft tissue infection // *Curr. Infect. Dis. Rep.* – 2002. – Vol. 4, № 5. – P. 426–432.
6. Legout L., Senneville E., Stern R., Yazdanpanah Y., Savage C., Rosele B., Migaud H., Mouton Y. Treatment of bone and joint infections caused by Gram-negative bacilli with a cefepime–fluoroquinolone combination // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2006. – Vol. 12, № 10. – P. 1030–1033.
7. Hooton T.M. Fluoroquinolones and resistance in the treatment of uncomplicated urinary tract infection // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2003. – Vol. 22, № SUPPL. 2. – P. 65–72.
8. Miravittles M., Anzueto A. Moxifloxacin : a respiratory fluoroquinolone // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2008. – Vol. 9, № 10. – P. 1755–1772.
9. Herold C., Ocker M., Ganslmayer M., Gerauer H., Hahn E.G., Schuppan D. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells // *Br. J. Cancer*. – 2002. – Vol. 86, № 3. – P. 443–448.
10. Idowu T., Schweizer F. Ubiquitous nature of fluoroquinolones: The oscillation between antibacterial and anticancer activities // *Antibiotics*. – 2017. – Vol. 6, № 4. – P. 1–24.
11. Mustaev A., Malik M., Zhao X., Kurepina N., Luan G., Oppegard L.M., Hiasa H., Marks K.R., Kerns R.J., Berger J.M., Drlica K. Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes two modes of drug binding // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 18. – P. 12300–12312.
12. Nawaz M.S., Bodla R., Kant R., Singh S.P., Bhutani R., Kapoor G. Fluoroquinolone as antimicrobial agent: A Review // *Int. J. Biomed. Res.* – 2017. – Vol. 2, № 3. – P. 57–63.
13. Ezelarab H.A.A., Abbas S.H., Hassan H.A., Abuo-Rahma G.E.D.A. Recent updates of

- fluoroquinolones as antibacterial agents // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. – 2018. – Vol. 351, № 9. – P. 1–13.
14. Shen L.L., Baranowski J., Pernet A.G. Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: Specificity and Cooperativity of Drug Binding to DNA // *Biochemistry*. – 1975. – Vol. 28, № 9. – P. 3879–3885.
  15. Wohlkonig A., Chan P.F., Fosberry A.P., Homes P., Huang J., Kranz M., Leydon V.R., Miles T.J., Pearson N.D., Perera R.L., Shillings A.J., Gwynn M.N., Bax B.D. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 17, № 9. – P. 1152–1153.
  16. Laponogov I., Sohi M.K., Veselkov D.A., Pan X.S., Sawhney R., Thompson A.W., McAuley K.E., Fisher L.M., Sanderson M.R. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16, № 6. – P. 667–669.
  17. Zhanel G.G., Ennis K., Vercaigne L., Walkty A., Gin A.S., Embil J., Smith H., Hoban D.J. A Critical Review of the Fluoroquinolones. Focus on Respiratory Tract Infections // *Drugs*. – 2002. – Vol. 62, № 1. – P. 13–59.
  18. Sharma P.C., Jain A., Jain S. Fluoroquinolone antibacterials: A review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects // *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* – 2009. – Vol. 66, № 6. – P. 587–604.
  19. Sárközy G. Quinolones: A class of antimicrobial agents // *Vet. Med. (Praha)*. – 2001. – Vol. 46, № 9–10. – P. 257–274.
  20. Braga P.C., Dal Sasso M. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of gatifloxacin on the inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* adherence // *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* – 2002. – Vol. 52, № 2. – P. 109–112.
  21. Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance // *Lancet Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 6, № 10. – P. 629–640.
  22. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Chi H.P., Bush K., Hooper D.C. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12, № 1. – P. 83–88.
  23. Adjei M.D., Heinze T.M., Deck J., Freeman J.P., Williams A.J., Sutherland J.B. Transformation of the antibacterial agent norfloxacin by environmental mycobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72, № 9. – P. 5790–5793.
  24. Maia A.S., Ribeiro A.R., Amorim C.L., Barreiro J.C., Cass Q.B., Castro P.M.L., Tiritan M.E. Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

- // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1333. – P. 87–98.
25. Aminimanizani A., Beringer P., Jelliffe R. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials // Clin. Pharmacokinet. – 2001. – Vol. 40, № 3. – P. 169–187.
  26. Samra Z., Rosenberg S., Dan M. Susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to Tetracycline, Doxycycline, Erythromycin, Roxithromycin, Clarithromycin, Azithromycin, Levofloxacin and Moxifloxacin // J. Chemother. – 2011. – Vol. 23, № 2. – P. 77–79.
  27. Rodvold K.A., Danziger L.H., Gotfried M.H. Steady-state plasma and bronchopulmonary concentrations of intravenous levofloxacin and azithromycin in healthy adults // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – Vol. 47, № 8. – P. 2450–2457.
  28. Stahlmann R., Hartmut M.L. Risks associated with the therapeutic use of fluoroquinolones // Expert Opin. Drug Saf. – 2013. – Vol. 12, № 4. – P. 497–505.
  29. Mandell L., Tillotson G. Safety of fluoroquinolones: An Update // Can. J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 13, № 1. – P. 54–61.
  30. Golomb B.A., Koslik H.J., Redd A.J. Fluoroquinolone-induced serious, persistent, multisymptom adverse effects // BMJ Case Rep. – 2015. – P. 1–10.
  31. Dharnidharka V.R., Nadeau K., Cannon C.L., Harris H.W., Rosen S. Ciprofloxacin overdose: Acute renal failure with prominent apoptotic changes // Am. J. Kidney Dis. – 1998. – Vol. 31, № 4. – P. 710–712.
  32. Tibbitt M.W., Dahlman J.E., Langer R. Emerging Frontiers in Drug Delivery // J. Am. Chem. Soc. – 2016. – Vol. 138, № 3. – P. 704–717.
  33. Efthimiadou E.K., Sanakis Y., Katsaros N., Karaliota A., Psomas G. Transition metal complexes with the quinolone antibacterial agent pipemidic acid: Synthesis, characterization and biological activity // Polyhedron. – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 1148–1158.
  34. Sadeek S.A., El-Shwiniy W.H., El-Attar M.S. Synthesis, characterization and antimicrobial investigation of some moxifloxacin metal complexes // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. – 2011. – Vol. 84, № 1. – P. 99–110.
  35. Kondaiah S., Reddy G.B., Rajesh D., Vijayakumr B. Synthesis , Characterization and Biological Activity of Moxifloxacin -Cu ( II ) Metal Complex. – 2017. – Vol. 4, № 12. – P. 1138–1145.
  36. Soayed A.A., Refaat H.M., El-Din D.A.N. Metal complexes of moxifloxacin-imidazole mixed ligands: Characterization and biological studies // Inorganica Chim. Acta. – 2013. – Vol. 406. – P. 230–240.
  37. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Safronova A.S., Yakimov I.D., Kolmogorov I.M.,

- Deygen D.M., Burova T. V., Grinberg N. V., Grinberg V.Y., Kudryashova E. V. Moxifloxacin interacts with lipid bilayer, causing dramatic changes in its structure and phase transitions // *Chem. Phys. Lipids.* – 2020. – Vol. 228, № 104891. – P. 1–10.
38. Sohrabi S., Haeri A., Mahboubi A., Mortazavi A., Dadashzadeh S. Chitosan gel-embedded moxifloxacin niosomes: An efficient antimicrobial hybrid system for burn infection // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol. 85. – P. 625–633.
39. Furneri P.M., Fresta M., Puglisi G., Tempera G. Ofloxacin-loaded liposomes: In vitro activity and drug accumulation in bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44, № 9. – P. 2458–2464.
40. Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. Экспериментальные методы исследования механизма взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами // *Биоорганическая химия.* – 2020. – Vol. 46, № 4. – P. 340–359.
41. Gupta P. V., Nirwane A.M., Nagarsenker M.S. Inhalable Levofloxacin Liposomes Complemented with Lysozyme for Treatment of Pulmonary Infection in Rats: Effective Antimicrobial and Antibiofilm Strategy // *AAPS PharmSciTech.* – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 1454–1467.
42. Deygen I.M., Seidl C., Kölmel D.K., Bednarek C., Heissler S., Kudryashova E. V., Bräse S., Schepers U. Novel Prodrug of Doxorubicin Modified by Stearoylspermine Encapsulated into PEG-Chitosan-Stabilized Liposomes // *Langmuir.* – 2016. – Vol. 32, № 42. – P. 10861–10869.
43. Dillen K., Vandervoort J., Van Den Mooter G., Verheyden L., Ludwig A. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles // *Int. J. Pharm.* – 2004. – Vol. 275, № 1–2. – P. 171–187.
44. Pircalabioru G.G., Chifiriuc M.-C. Nanoparticulate drug-delivery systems for fighting microbial biofilms – from bench to bedside // *Future Microbiol.* – 2020. – Vol. 15. – P. 679–698.
45. Gupta H., Aqil M., Khar R.K., Ali A., Bhatnagar A., Mittal G. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery // *J. Drug Target.* – 2011. – Vol. 19, № 6. – P. 409–417.
46. Kumar G., Sharma S., Shafiq N., Khuller G.K., Malhotra S. Optimization, In Vitro–InVivo Evaluation, and Short-Term Tolerability of Novel Levofloxacin-Loaded PLGA Nanoparticle Formulation // *Pharm. Nanotechnol.* – 2012. – Vol. 101, № 6. – P. 2165–2176.
47. Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. Системы доставки фторхинолонов: новые перспективы в борьбе с туберкулезом // *Биоорганическая Химия.* – 2017. – Vol. 43, № 5. – P. 464–480.

48. Motwani S.K., Chopra S., Talegaonkar S., Kohli K., Ahmad F.J., Khar R.K. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2008. – Vol. 68, № 3. – P. 513–525.
49. Cacicedo M.L., Islan G.A., Drachemberg M.F., Alvarez V.A., Bartel L.C., Bolzán A.D., Castro G.R. Hybrid bacterial cellulose-pectin films for delivery of bioactive molecules // *New J. Chem.* – 2018. – Vol. 42, № 9. – P. 7457–7467.
50. Garg T., Rath G., Goyal A.K. Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis // *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* – 2016. – Vol. 44, № 3. – P. 997–1001.
51. Bowman K., Leong K.W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery // *Int. J. Nanomedicine.* – 2006. – Vol. 1, № 2. – P. 117–128.
52. Islan G.A., De Verti I.P., Marchetti S.G., Castro G.R. Studies of ciprofloxacin encapsulation on alginate/pectin matrixes and its relationship with biodisponibility // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 167, № 5. – P. 1408–1420.
53. Ngwuluka N.C., Ochekepe N.A., Aruoma O.I. Naturapolyceutics: The science of utilizing natural polymers for drug delivery // *Polymers (Basel).* – 2014. – Vol. 6, № 5. – P. 1312–1332.
54. de Miranda J.C., Martins T.E.A., Veiga F., Ferraz H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs // *Brazilian J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 47, № 4. – P. 665–681.
55. Řezanka M. Synthesis of substituted cyclodextrins // *Environ. Chem. Lett.* – 2019. – Vol. 17, № 1. – P. 49–63.
56. Crini G., Fourmentin S., Fenyvesi É., Torri G., Fourmentin M., Morin-Crini N. Cyclodextrins, from molecules to applications // *Environ. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. 1361–1375.
57. Biwer A., Antranikian G., Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 59, № 6. – P. 609–617.
58. Brewster M.E., Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2007. – Vol. 59, № 7. – P. 645–666.
59. Loftsson T., Jarho P., Másson M., Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery system // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 335–346.
60. Szejtli J. *Cyclodextrin Technology.* – Springer Science & Business Media, 2014. – 450 p.
61. Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2004. – Vol. 3, № 12. – P. 1023–1035.



62. Jicsinszky L., Caporaso M., Gaudino E.C., Giovannoli C., Cravotto G., Martel B. Synthesis of randomly substituted anionic cyclodextrins in ball milling // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 3. – P. 1–16.
63. Loftsson T., Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications // *Int. J. Pharm.* – 2007. – Vol. 329, № 1–2. – P. 1–11.
64. Jambhekar S.S., Breen P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex // *Drug Discov. Today*. – 2016. – Vol. 21, № 2. – P. 356–362.
65. Zhou D., Hao H., Ma Y., Zhong H., Dai Y., Cai K., Mukherjee S., Liu J., Bian H. Specific Host-Guest Interactions in the Crown Ether Complexes with K<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Revealed from the Vibrational Relaxation Dynamics of the Counteranion // *J. Phys. Chem. B*. – 2020. – Vol. 124, № 41. – P. 9154–9162.
66. Chamseddin C., Jira T. Complexation of Achiral Calixarenes with Chiral Pharmaceutical Substances: A Circular Dichroism Study // *Curr. Pharm. Anal.* – 2013. – Vol. 9, № 1. – P. 121–129.
67. Jeon W.S., Kim H.J., Lee C., Kim K. Control of the stoichiometry in host-guest complexation by redox chemistry of guests: Inclusion of methylviologen in cucurbit[8]uril // *Chem. Commun.* – 2002. – № 17. – P. 1828–1829.
68. Zhang D., Cheng J., Wei L., Song W., Wang L., Tang H., Cao D. Host-Guest Complexation of Monoanionic and Dianionic Guests with a Polycationic Pillararene Host: Same Two-Step Mechanism but Striking Difference in Rate upon Inclusion // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 11, № 6. – P. 2021–2026.
69. Singh M., Sharma R., Banerjee U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins // *Biotechnol. Adv.* – 2002. – Vol. 20, № 5–6. – P. 341–359.
70. Del Valle E.M.M. Cyclodextrins and their uses: A review // *Process Biochem.* – 2004. – Vol. 39, № 9. – P. 1033–1046.
71. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Uporov I. V., Kudryashova E. V. Thermodynamics and molecular insight in guest–host complexes of fluoroquinolones with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives, as revealed by ATR-FTIR spectroscopy and molecular modeling experiments // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2017. – Vol. 409, № 27. – P. 6451–6462.
72. Femminò S., Penna C., Bessone F., Caldera F., Dhakar N., Cau D., Pagliaro P., Cavalli R., Trotta F.  $\alpha$ -cyclodextrin and  $\alpha$ -cyclodextrin polymers as oxygen nanocarriers to limit hypoxia/reoxygenation injury: Implications from an in vitro model // *Polymers (Basel)*. – 2018. – Vol. 10, № 2. – P. 1–14.
73. Gong L., Li T., Chen F., Duan X., Yuan Y., Zhang D., Jiang Y. An inclusion complex of

- eugenol into  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 196. – P. 324–330.
74. Aigner Z., Berkesi O., Farkas G., Szabó-Révész P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – Vol. 57, № 1. – P. 62–67.
  75. Kicuntod J., Sangpheak K., Mueller M., Wolschann P., Viernstein H., Yanaka S., Kato K., Chavasiri W., Pongsawasdi P., Kungwan N., Rungrotmongkol T. Theoretical and experimental studies on inclusion complexes of pinostrobin and  $\beta$ -cyclodextrins // *Sci. Pharm.* – 2018. – Vol. 86, № 1. – P. 1–15.
  76. Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Упоров И.В., Кудряшова Е.В. Исследование физико-химических свойств и структуры комплекса моксифлоксацина с метил- $\beta$ -циклодекстрином // *Коллоидный Журнал.* – 2017. – Vol. 79, № 5. – P. 627–635.
  77. Jansook P., Ogawa N., Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications // *Int. J. Pharm.* – 2018. – Vol. 535, № 1–2. – P. 272–284.
  78. Sukhoverkov K. V., Le-Deygen I.M., Egorov A.M., Kudryashova E. V. Physicochemical Properties of the Inclusion Complex of Moxifloxacin with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Synthesized by RESS // *Russ. J. Phys. Chem. B.* – 2018. – Vol. 12, № 7. – P. 1193–1204.
  79. Brewster M.E., Loftsson T. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1 .Drug Solubilization and Stabilization // *J. Pharm. Sci.* – 1996. – Vol. 85, № 10. – P. 1017–1025.
  80. Loftsson T., Ma'sson M., Brewster M.E. Self-Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes // *Pharm. Assoc. J Pharm Sci.* – 2004. – Vol. 93, № 5. – P. 1091–1099.
  81. Yuan Z., Ye Y., Gao F., Yuan H., Lan M., Lou K., Wang W. Chitosan-graft- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release // *Int. J. Pharm.* – 2013. – Vol. 446, № 1–2. – P. 191–198.
  82. Yang C., Li H., Goh S.H., Li J. Cationic star polymers consisting of  $\alpha$ -cyclodextrin core and oligoethylenimine arms as nonviral gene delivery vectors // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28, № 21. – P. 3245–3254.
  83. Sicard-Roselli C., Perly B., Le Bas G. The respective benefits of X-ray crystallography and NMR for the structural determination of the inclusion complex between butylisothiocyanate and alpha-cyclodextrin // *J. Incl. Phenom.* – 2001. – Vol. 39, № 3–4. – P. 333–337.
  84. Chow D.D., Karara A.H. Characterization, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen- $\beta$ -cyclodextrin complex system // *Int. J. Pharm.* – 1986. – Vol. 28, № 2–3. – P. 95–101.

85. Ferrazza R., Rossi B., Guella G. DOSY-NMR and raman investigations on the self-aggregation and cyclodextrin complexation of vanillin // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – Vol. 118, № 25. – P. 7147–7155.
86. Upadhyay S.K., Kumar G. NMR and molecular modelling studies on the interaction of fluconazole with  $\beta$ -cyclodextrin // *Chem. Cent. J.* – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 1–9.
87. Cameron K.S., Fletcher D., Fielding L. An NMR study of cyclodextrin complexes of the steroidal neuromuscular blocker drug Rocuronium Bromide // *Magn. Reson. Chem.* – 2002. – Vol. 40, № 4. – P. 251–260.
88. Kane R.N., Kuchekar B. Preparation, physicochemical characterization, dissolution and formulation studies of telmisartan cyclodextrin inclusion complexes // *Asian J. Pharm.* – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 52–59.
89. Sun W., Wang Z.H., She M.Y., Yang Z., Jin X.L., Wang Y.Q., Shi Z., Li J.L. Study on the inclusion behavior and solid inclusion complex of 5-amino-6-methyl-2-benzimidazolone with cyclodextrins // *Chinese Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 27, № 7. – P. 1077–1082.
90. Misiuk W., Jozefowicz M. Study on a host-guest interaction of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin with ofloxacin // *J. Mol. Liq.* – 2015. – Vol. 202. – P. 101–106.
91. Jagdale S.C., Mohanty P., Chabukswar A.R., Kuchekar B.S. Dissolution Rate Enhancement, Design and Development of Buccal Drug Delivery of Darifenacin Hydroxypropyl  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes // *J. Pharm.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–11.
92. Negi J.S., Singh S. Spectroscopic investigation on the inclusion complex formation between amisulpride and  $\gamma$ -cyclodextrin // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 92, № 2. – P. 1835–1843.
93. Higuchi T., Connors K.A. Phase solubility techniques // *Adv Anal Chem Instrum.* – 1965. – Vol. 4. – P. 117–212.
94. Elbashir A.A., Dsugi N.F.A., Aboul-Enein H.Y. Supramolecular study on the interaction between ofloxacin and methyl  $\beta$ -cyclodextrin by fluorescence spectroscopy and its analytical application // *J. Fluoresc.* – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 355–361.
95. Sali N., Csepregi R., Kőszegi T., Kunsági-Máté S., Sente L., Poór M. Complex formation of flavonoids fisetin and geraldol with  $\beta$ -cyclodextrins // *J. Lumin.* – 2018. – Vol. 194, № February. – P. 82–90.
96. Banjare M.K., Behera K., Banjare R.K., Pandey S., Ghosh K.K. Inclusion complexation of imidazolium-based ionic liquid and  $\beta$ -cyclodextrin: A detailed spectroscopic investigation // *J. Mol. Liq.* – 2020. – Vol. 302. – P. 112530.
97. Scott R.L. Some comments on the Benesi-Hildebrand equation // *Recl. des Trav. Chim. des*

- Pays-Bas. – 1956. – Vol. 75, № 7. – P. 787–789.
98. Barri T., Trtić-Petrović T., Karlsson M., Jönsson J.Å. Characterization of drug-protein binding process by employing equilibrium sampling through hollow-fiber supported liquid membrane and Bjerrum and Scatchard plots // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – Vol. 48, № 1. – P. 49–56.
  99. Скуредина А.А., Копнова Т.Ю., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В. Физико-химические свойства комплексов включения «гость-хозяин» ципрофлоксацина с производными  $\beta$ -циклодекстрина. – 2020. – Vol. 61, № 4. – P. 16–24.
  100. Wei Y., Zhang J., Zhou Y., Bei W., Li Y., Yuan Q., Liang H. Characterization of glabridin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – Vol. 159. – P. 152–160.
  101. Blanka S., Tóké B. Characterization and Molecular Modelling of Cyclodextrin / Fluoroquinolone Inclusion Complexes // *Acta Medica Marisiensis.* – 2011. – Vol. 57, № 2. – P. 116–120.
  102. Ruz V., Froeyen M., Busson R., González M.M., Baudemprez L., Van Den Mooter G. Characterization and molecular modeling of the inclusion complexes of 2-(2-nitrovinyl) furan (G-0) with cyclodextrines // *Int. J. Pharm.* – 2012. – Vol. 439, № 1–2. – P. 275–285.
  103. Szente E., Szejtli J., Kis G.L. Spontaneous opalescence of aqueous  $\gamma$ -cyclodextrin solutions: Complex formation or self-aggregation? // *J. Pharm. Sci.* – 1998. – Vol. 87, № 6. – P. 778–781.
  104. Ryzhakov A., Do Thi T., Stappaerts J., Bertolotti L., Kimpe K., Sá Couto A.R., Saokham P., Van den Mooter G., Augustijns P., Somsen G.W., Kurkov S., Inghelbrecht S., Arien A., Jimidar M.I., Schrijnemakers K., Loftsson T. Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions // *J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 105, № 9. – P. 2556–2569.
  105. Loftsson T., Saokham P., Sá Couto A.R. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrinac complexes in aqueous solutions // *Int. J. Pharm.* – 2019. – Vol. 560, № February. – P. 228–234.
  106. Rao J.P., Geckeler K.E. Cyclodextrin supramacromolecules: Unexpected formation in aqueous phase under ambient conditions // *Macromol. Rapid Commun.* – 2011. – Vol. 32, № 5. – P. 426–430.
  107. Miyauchi M., Kawaguchi Y., Harada A. Formation of supramolecular polymers constructed by cyclodextrins with cinnamamide // *J. Incl. Phenom.* – 2004. – Vol. 50, № 1–2. – P. 57–62.
  108. Haimhoffer Á., Rusznyák Á., Réti-Nagy K., Vasvári G., Váradi J., Vecsernyés M., Bácskay I., Fehér P., Ujhelyi Z., Fenyvesi F. Cyclodextrins in drug delivery systems and their effects

- on biological barriers // *Sci. Pharm.* – 2019. – Vol. 87, № 4. – P. 1–20.
109. Chen G., Jiang M. Cyclodextrin-based inclusion complexation bridging supramolecular chemistry and macromolecular self-assembly // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – Vol. 40, № 5. – P. 2254–2266.
  110. Harata K. Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state // *Chem. Rev.* – 1998. – Vol. 98, № 5. – P. 1803–1827.
  111. Harata K., Takenaka Y., Yoshida N. Crystal structures of 6-deoxy-6-monosubstituted  $\beta$ -cyclodextrins. Substituent-regulated one-dimensional arrays of macrocycles // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* – 2001. – № 9. – P. 1667–1673.
  112. Loftsson T., Moya-Ortega M.D., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 68, № 5. – P. 544–555.
  113. Kurkov S. V, Madden D.E., Carr D., Loftsson T. The Effect of Parenterally Administered Cyclodextrins on the Pharmacokinetics of Coadministered Drugs // *J. Pharm. Sci.* – 2012. – Vol. 101, № 12. – P. 4402–4408.
  114. Brewster M.E., Anderson W.R., Meinsma D., Moreno D., Webb A.I., Pablo L., Estes K.S., Derendorf H., Bodor N., Sawchuk R., Cheung B., Pop E. Intravenous and oral pharmacokinetic evaluation of a 2-hydroxypropyl-  $\beta$ -cyclodextrin-based formulation of carbamazepine in the dog: Comparison with commercially available tablets and suspensions // *J. Pharm. Sci.* – 1997. – Vol. 86, № 3. – P. 335–339.
  115. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review // *AAPS PharmSciTech.* – 2005. – Vol. 2, № 6. – P. 329–357.
  116. Carrier R.L., Miller L.A., Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability // *J. Control. Release.* – 2007. – Vol. 123, № 2. – P. 78–99.
  117. Sainz-Rozas P.R., Isasi J.R., González-Gaitano G. Binding of dibenzofuran and its derivatives to water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin polymers // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2005. – Vol. 173, № 3. – P. 248–257.
  118. Argenziano M., Haimhoffer A., Bastiancich C., Jicsinszky L., Caldera F., Trotta F., Scutera S., Alotto D., Fumagalli M., Musso T., Castagnoli C., Cavalli R. In vitro enhanced skin permeation and retention of imiquimod loaded in  $\beta$ -cyclodextrin nanosponge hydrogel // *Pharmaceutics.* – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 1–17.
  119. He J., Li Y., Wang C., Zhang K., Lin D., Kong L., Liu J. Rapid adsorption of Pb, Cu and Cd from aqueous solutions by  $\beta$ -cyclodextrin polymers // *Appl. Surf. Sci.* – 2017. – Vol. 426. – P. 29–39.
  120. Alsbaiee A., Smith B.J., Xiao L., Ling Y., Helbling D.E., Dichtel W.R. Rapid removal of

- organic micropollutants from water by a porous  $\beta$ -cyclodextrin polymer // *Nature*. – 2016. – Vol. 529, № 7585. – P. 190–194.
121. García-Padial M., Martínez-Ohárriz M.C., Isasi J.R., Zornoza A. Sorption and Release of Natural Phenolic Antioxidants in Different Cyclodextrin Polymers // *J. Agric. Food Chem.* – 2017. – Vol. 65, № 24. – P. 4905–4910.
122. Pellicer J.A., Rodríguez-López M.I., Fortea M.I., Gabaldón Hernández J.A., Lucas-Abellán C., Mercader-Ros M.T., Serrano-Martínez A., Núñez-Delicado E., Cosma P., Fini P., Franco E., García R., Ferrándiz M., Pérez E., Ferrándiz M. Removing of Direct Red 83:1 using  $\alpha$ - and HP- $\alpha$ -CDs polymerized with epichlorohydrin: Kinetic and equilibrium studies // *Dye. Pigment.* – 2018. – Vol. 149. – P. 736–746.
123. Anne J.M., Boon Y.H., Saad B., Miskam M., Yusoff M.M., Shahrman M.S., Zain N.N.M., Lim V., Raoov M.  $\beta$ -Cyclodextrin conjugated bifunctional isocyanate linker polymer for enhanced removal of 2,4-dinitrophenol from environmental waters // *R. Soc. Open Sci.* – 2018. – Vol. 5, № 8. – P. 1–22.
124. Hemine K., Skwierawska A., Kernstein A., Kozłowska-Tylingo K. Cyclodextrin polymers as efficient adsorbents for removing toxic non-biodegradable pimavanserin from pharmaceutical wastewaters // *Chemosphere.* – 2020. – Vol. 250. – P. 126250.
125. Shan T., Chen J., Yang L., Jie S., Qian Q. Radiation preparation and characterization of pH-sensitive hydrogel of acrylic acid/cyclodextrin based copolymer // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 2009. – Vol. 279, № 1. – P. 75–82.
126. Garcia-Fernandez M.J., Tabary N., Chai F., Cazaux F., Blanchemain N., Flament M.P., Martel B. New multifunctional pharmaceutical excipient in tablet formulation based on citric acid-cyclodextrin polymer // *Int. J. Pharm.* – 2016. – Vol. 511, № 2. – P. 913–920.
127. Moya-Ortega M.D., Alvarez-Lorenzo C., Sigurdsson H.H., Concheiro A., Loftsson T.  $\gamma$ -Cyclodextrin hydrogels and semi-interpenetrating networks for sustained delivery of dexamethasone // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – Vol. 80, № 3. – P. 900–907.
128. Hishiya T., Asanuma H., Komiyama M. Spectroscopic anatomy of molecular-imprinting of cyclodextrin. Evidence for preferential formation of ordered cyclodextrin assemblies // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124, № 4. – P. 570–575.
129. Egawa Y., Shimura Y., Nowatari Y., Aiba D., Juni K. Preparation of molecularly imprinted cyclodextrin microspheres // *Int. J. Pharm.* – 2005. – Vol. 293, № 1–2. – P. 165–170.
130. Trotta F., Caldera F., Cavalli R., Soster M., Riedo C., Biasizzo M., Uccello Barretta G., Balzano F., Brunella V. Molecularly imprinted cyclodextrin nanosponges for the controlled delivery of L-DOPA: perspectives for the treatment of Parkinson's disease // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2016. – Vol. 13, № 12. – P. 1671–1680.

131. Emami J. In vitro-in vivo correlation: From theory to applications // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2006. – Vol. 9, № 2. – P. 31–51.
132. Lu Y., Kim S., Park K. In vitro-in vivo correlation: Perspectives on model development // *Int. J. Pharm.* – 2011. – Vol. 418, № 1. – P. 142–148.
133. Davanço M.G., Campos D.R., Carvalho P. de O. In vitro – In vivo correlation in the development of oral drug formulation: A screenshot of the last two decades // *Int. J. Pharm.* – 2020. – Vol. 580, № March. – P. 119210.
134. Kamimura J.A., Santos E.H., Hill L.E., Gomes C.L. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin // *LWT - Food Sci. Technol.* – 2014. – Vol. 57, № 2. – P. 701–709.
135. Liang H., Yuan Q., Vriesekoop F., Lv F. Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 135, № 3. – P. 1020–1027.
136. Rodríguez-López M.I., Mercader-Ros M.T., Pellicer J.A., Gómez-López V.M., Martínez-Romero D., Núñez-Delicado E., Gabaldón J.A. Evaluation of monoterpene-cyclodextrin complexes as bacterial growth effective hurdles // *Food Control.* – 2020. – Vol. 108, № February. – P. 106814.
137. Роспотребнадзор. Определение Чувствительности Микроорганизмов К Антибактериальным Препаратам Териальным Препаратам: Методические Указания. Мук 4.2.1890-04. // Методические Указания. – 2004. – № ББК 52.64. – 1–91 р.
138. Dev A., Mohan J.C., Sreeja V., Tamura H., Patzke G.R., Hussain F., Weyeneth S., Nair S. V., Jayakumar R. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – Vol. 79, № 4. – P. 1073–1079.
139. Huang D., Zuo Y., Zou Q., Zhang L., Li J., Cheng L., Shen J., Li Y. Antibacterial chitosan coating on nano-hydroxyapatite/polyamide66 porous bone scaffold for drug delivery // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2011. – Vol. 22, № 7. – P. 931–944.
140. Almekhlafi S., Thabit A.A.M. Formulation and evaluation of lomefloxacin HCl as semisolid dosage forms // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 1242–1248.
141. Azhdarzadeh M., Lotfipour F., Zakeri-Milani P., Mohammadi G., Valizadeh H. Anti-bacterial performance of azithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system against different gram-negative and gram-positive bacteria // *Adv. Pharm. Bull.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 17–24.
142. Valizadeh H., Mohammadi G., Ehyaei R., Milani M., Azhdarzadeh M., Zakeri-Milani P., Lotfipour F. Antibacterial activity of clarithromycin loaded PLGA nanoparticles // *Pharmazie.* – 2012. – Vol. 67, № 1. – P. 63–68.

143. Livermore D.M. Antibiotic uptake and transport by bacteria // *Scand J Infect Dis.* – 1991. – Vol. 74. – P. 15–22.
144. Seltmann G., Holst O. Cell Wall Models. In: *The Bacterial Cell Wall.* – Springer, Berlin, Heidelberg, 2002. – 204–218 p.
145. Сычева М.В., Васильченко А.С., Кульсарин А.А., Рогожин Е.А., Пешкова Ю.И., Карташова О.Л. Применение электроаналитических и сепарационных методов исследования для оценки механизма биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* – 2016. – Vol. 1. – P. 1–8.
146. Halder S., Yadav K.K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Haldar S., Karmakar S., Sen T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents // *Springerplus.* – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 1–14.
147. Proft T., Baker E.N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - Structure, assembly and their role in disease // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66, № 4. – P. 613–635.
148. Dillen K., Bridts C., Van der Veken P., Cos P., Vandervoort J., Augustyns K., Stevens W., Ludwig A. Adhesion of PLGA or Eudragit®/PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas* // *Int. J. Pharm.* – 2008. – Vol. 349, № 1–2. – P. 234–240.
149. Chen C.Z., Cooper S.L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23, № 16. – P. 3359–3368.
150. Strand S.P., Vårum K.M., Østgaard K. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: Adsorption and flocculation // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 71–81.
151. Harish Prashanth K. V., Tharanathan R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview // *Trends Food Sci. Technol.* – 2007. – Vol. 18, № 3. – P. 117–131.
152. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage // *Int. J. Food Microbiol.* – 2004. – Vol. 95, № 2. – P. 147–155.
153. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane // *Microbiol. Rev.* – 1992. – Vol. 56, № 3. – P. 395–411.
154. Aytac Z., Yildiz Z.I., Kayaci-Senirmak F., Tekinay T., Uyar T. Electrospinning of cyclodextrin/linalool-inclusion complex nanofibers: Fast-dissolving nanofibrous web with prolonged release and antibacterial activity // *Food Chem.* – 2017. – Vol. 231. – P. 192–201.
155. Jug M., Kosalec I., Maestrelli F., Mura P. Analysis of triclosan inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin and its water-soluble polymeric derivative // *J. Pharm. Biomed. Anal.* –



2011. – Vol. 54, № 5. – P. 1030–1039.
156. Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В. Влияние молекулярной архитектуры наночастиц сульфобутилового эфира  $\beta$ -циклодекстрина на физико-химические свойства комплексов с моксифлоксацином // Коллоидный Журнал. – 2018. – Vol. 80, № 3. – P. 330–337.
157. Hoang Thi T.H., Chai F., Leprêtre S., Blanchemain N., Martel B., Siepmann F., Hildebrand H.F., Siepmann J., Flament M.P. Bone implants modified with cyclodextrin: Study of drug release in bulk fluid and into agarose gel // Int. J. Pharm. – 2010. – Vol. 400, № 1–2. – P. 74–85.
158. Gollwitzer H., Ibrahim K., Meyer H., Mittelmeier W., Busch R., Stemberger A. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology // J. Antimicrob. Chemother. – 2003. – Vol. 51, № 3. – P. 585–591.
159. Jeong Y. Il, Na H.S., Seo D.H., Kim D.G., Lee H.C., Jang M.K., Na S.K., Roh S.H., Kim S. Il, Nah J.W. Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity // Int. J. Pharm. – 2008. – Vol. 352, № 1–2. – P. 317–323.
160. Baghdan E., Raschpichler M., Lutfi W., Pinnapireddy S.R., Pourasghar M., Schäfer J., Schneider M., Bakowsky U. Nano spray dried antibacterial coatings for dental implants // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2019. – Vol. 139, № February. – P. 59–67.
161. Taha M., Chai F., Blanchemain N., Neut C., Goube M., Maton M., Martel B., Hildebrand H.F. Evaluation of sorption capacity of antibiotics and antibacterial properties of a cyclodextrin-polymer functionalized hydroxyapatite-coated titanium hip prosthesis // Int. J. Pharm. – 2014. – Vol. 477, № 1–2. – P. 380–389.
162. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene. – 1985. – Vol. 33, № 1. – P. 103–119.
163. Goddard J.M., Caput D., Williams S.R., Martin D.M. Cloning of human purine-nucleoside phosphorylase cDNA sequences by complementation in Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – Vol. 80. – P. 4281–4285.
164. Van Doorslaer X., Dewulf J., Van Langenhove H., Demeestere K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 500–501. – P. 250–269.
165. Blokhina S. V., Sharapova A. V., Ol'khovich M. V., Volkova T. V., Perlovich G.L. Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials // Eur. J. Pharm. Sci. – 2016. – Vol. 93. – P. 29–37.
166. Sun J., Sakai S., Tauchi Y., Deguchi Y., Cheng G., Chen J., Morimoto K. Protonation

- equilibrium and lipophilicity of olamufloxacin (HSR-903), a newly synthesized fluoroquinolone antibacterial // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2003. – Vol. 56, № 2. – P. 223–229.
167. Langlois M.-H., Montagut M., Dubost J.-P., Grellet J., Saux M.-C. Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin // *Eur. J. Pharm. Biopharm. Anal.* – 2005. – Vol. 37. – P. 389–393.
  168. Loftsson T., Petersen D.S. Cyclodextrin solubilization of ETH-615, a zwitterionic drug. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 1998. – Vol. 24, № 4. – P. 365–370.
  169. Gunasekaran S., Rajalakshmi K., Kumaresan S. Vibrational analysis, electronic structure and nonlinear optical properties of Levofloxacin by density functional theory // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2013. – Vol. 112. – P. 351–363.
  170. Goyne K.W., Chorover J., Kubicki J.D., Zimmerman A.R., Brantley S.L. Sorption of the antibiotic ofloxacin to mesoporous and nonporous alumina and silica // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – Vol. 283, № 1. – P. 160–170.
  171. Koester L.S., Guterres S.S., Roch M. Le, Zuanazzi J.A., Bassani V.L. Ofloxacin - beta-Cyclodextrin Complexation // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2001. – Vol. 27, № 6. – P. 533–540.
  172. Chao J., Meng D., Li J., Xu H., Huang S. Preparation and study on the novel solid inclusion complex of ciprofloxacin with HP- $\beta$ -cyclodextrin // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2004. – Vol. 60, № 3. – P. 729–734.
  173. Liu Y., Yuan X. Preparation and characterization of a ternary inclusion complex comprising the norfloxacin/ $\beta$ -cyclodextrin complex incorporated in a liposome // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2015. – Vol. 82, № 3. – P. 311–321.
  174. Yu X., Zipp G.L., Ray Davidson G.W. The effect of Temperature and pH on the solubility of Quinolone compounds: estimation of heat and fusion // *Pharm. Res.* – 1994. – Vol. 11, № 4. – P. 522–527.
  175. Saltzman W.M., Kyriakides T.R. Cell Interactions with Polymers // *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition.* – Elsevier, 2014. – 385–406 p.
  176. Schulz M., Olubummo A., Binder W.H. Beyond the lipid-bilayer: Interaction of polymers and nanoparticles with membranes // *Soft Matter.* – 2012. – Vol. 8, № 18. – P. 4849–4864.
  177. Hammoud Z., Khreich N., Auezova L., Fourmentin S., Elaissari A., Greige-Gerges H. Cyclodextrin-membrane interaction in drug delivery and membrane structure maintenance // *Int. J. Pharm.* – 2019. – Vol. 564, № December 2018. – P. 59–76.
  178. Скуреедина А.А., Ле-Дейген И.М., Белогурова Н.Г., Е.В. К. Регуляция свойств липидных мембран при взаимодействии 2-гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрином. Молекулярные детали. // *Биоорганическая химия.* – 2020. – Vol. 46, № 5. – P. 505–516.

179. Donova M. V., Nikolayeva V.M., Dovbnaya D. V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin alters growth, activity and cell envelop features of sterol-transforming mycobacteria // *Microbiology*. – 2007. – Vol. 153, № 6. – P. 1981–1992.
180. Hatzi P., Mourtas S., G. Klepetsanis P., Antimisiaris S.G. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition // *Int. J. Pharm.* – 2007. – Vol. 333, № 1–2. – P. 167–176.
181. Angelini G., Campestre C., Boncompagni S., Gasbarri C. Liposomes entrapping  $\beta$ -cyclodextrin/ibuprofen inclusion complex: Role of the host and the guest on the bilayer integrity and microviscosity // *Chem. Phys. Lipids*. – 2017. – Vol. 209. – P. 61–65.
182. Raza K., Kumar P., Kumar N., Malik R. Pharmacokinetics and biodistribution of the nanoparticles // *Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic Acids*. – 2017. – P. 166–186.
183. Сандерс Д., Фриш К.К. Химия полиуретанов. – Москва «Химия», 1968. – 1–472 р.
184. Panova T. V., Kostenko S.N., Efimova A.A., Evtushenko E.G., Plamper F., Richtering W., Yaropolov A.I., Yaroslavov A.A. Electrostatic complexes between thermosensitive cationic microgels and anionic liposomes: Formation and triggered release of encapsulated enzyme // *Eur. Polym. J.* – 2019. – Vol. 119, № July. – P. 222–228.
185. Baier G., Musyanovych A., Dass M., Theisinger S., Landfester K. Cross-Linked Starch Capsules Containing dsDNA Prepared in Inverse Miniemulsion as “Nanoreactors” for Polymerase Chain Reaction // *Biomacromolecules*. – 2010. – Vol. 11, № 4. – P. 960–968.
186. Baier G., Baumann D., Siebert J.M., Musyanovych A., Mailänder V., Landfester K. Suppressing unspecific cell uptake for targeted delivery using hydroxyethyl starch nanocapsules // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13, № 9. – P. 2704–2715.
187. Paiphansiri U., Dausend J., Musyanovych A., Mailänder V., Landfester K. Fluorescent polyurethane nanocapsules prepared via inverse miniemulsion: Surface functionalization for use as biocarriers // *Macromol. Biosci.* – 2009. – Vol. 9, № 6. – P. 575–584.
188. Yilgor I., Yilgor E., Guler I.G., Ward T.C., Wilkes G.L. FTIR investigation of the influence of diisocyanate symmetry on the morphology development in model segmented polyurethanes // *Polymer (Guildf)*. – 2006. – Vol. 47, № 11. – P. 4105–4114.
189. Teo L.S., Chen C.Y., Kuo J.F. Fourier transform infrared spectroscopy study on effects of temperature on hydrogen bonding in amine-containing polyurethanes and poly(urethane-urea)s // *Macromolecules*. – 1997. – Vol. 30, № 6. – P. 1793–1799.
190. Liu F., Antoniou J., Li Y., Majeed H., Liang R., Ma Y., Ma J., Zhong F. Chitosan/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for tea polyphenol encapsulation // *Food Hydrocoll.* – 2016. – Vol. 57. – P. 291–300.
191. Du X., Song N., Yang Y.W., Wu G., Ma J., Gao H. Reverse micelles based on  $\beta$ -

- cyclodextrin-incorporated amphiphilic polyurethane copolymers for protein delivery // *Polym. Chem.* – 2014. – Vol. 5, № 18. – P. 5300–5309.
192. Adam A.M.A., Refat M.S., Saad H.A. Quick and simple formation of different nanosized charge-transfer complexes of the antibiotic drug moxifloxacin: An efficient way to remove and utilize discarded antibiotics // *Comptes Rendus Chim.* – 2015. – Vol. 18, № 9. – P. 914–928.
  193. Elshafie H.S., Sakr S.H., Sadeek S.A., Camele I. Biological Investigations and Spectroscopic Studies of New Moxifloxacin/Glycine-Metal Complexes. // *Chem. Biodivers.* – 2019. – Vol. 16, № 3. – P. 1800633.
  194. Szabó Z.I., Deme R., Mucsi Z., Rusu A., Mare A.D., Fiser B., Toma F., Sipos E., Tóth G. Equilibrium, structural and antibacterial characterization of moxifloxacin- $\beta$ -cyclodextrin complex // *J. Mol. Struct.* – 2018. – Vol. 1166. – P. 228–236.
  195. Suzuki M., Kajtár M., Szejtli J., Vikmon M., Fenyvesi E. Induced circular-dichroism spectra of complexes of cyclomalto-oligosaccharides and azo dyes containing naphthalene nuclei // *Carbohydr. Res.* – 1992. – Vol. 223, № C. – P. 71–80.
  196. Ma M., Li D.Q. New organic nanoporous polymers and their inclusion complexes // *Chem. Mater.* – 1999. – Vol. 11, № 4. – P. 872–874.
  197. Liu L., Zhu S. A study on the supramolecular structure of inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with prazosin hydrochloride // *Carbohydr. Polym.* – 2007. – Vol. 68, № 3. – P. 472–476.
  198. Prochowicz D., Kornowicz A., Justyniak I., Lewiński J. Metal complexes based on native cyclodextrins: Synthesis and structural diversity // *Coord. Chem. Rev.* – 2016. – Vol. 306. – P. 331–345.
  199. Pinchuk L. A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of “biostable” polyurethanes // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 1994. – Vol. 6, № 3. – P. 225–267.
  200. Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26, № 35. – P. 7457–7470.
  201. Bouvier M., Chawla A.S., Hinberg I. In vitro degradation of a poly(ether urethane) by trypsin // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1991. – Vol. 25, № 6. – P. 773–789.
  202. Li B., Zhang T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 44, № 9. – P. 3468–3473.
  203. Hubicka U., Krzek J., Zuromska B., Walczak M., Zylewski M., Pawłowski D. Determination of photostability and photodegradation products of moxifloxacin in the

- presence of metal ions in solutions and solid phase. Kinetics and identification of photoproducts // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2012. – Vol. 11, № 2. – P. 351–357.
204. Otto K., Elwing H., Hermansson M. The role of type 1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 1999. – Vol. 15, № 1. – P. 99–111.
205. Chao Y., Zhang T. Probing roles of lipopolysaccharide, type 1 fimbria, and colanic acid in the attachment of *Escherichia coli* strains on inert surfaces // *Langmuir.* – 2011. – Vol. 27, № 18. – P. 11545–11553.
206. Stenstrom T.-A., Kjelleberg S. Fimbriae mediated nonspecific adhesion of *Salmonella typhimurium* to mineral particles // *Arch Microbiol.* – 1985. – Vol. 143. – P. 6–10.