

УДК 544.16; 615.322; 577.352

DOI: 10.15372/KhUR20150508

Физико-химические подходы к исследованию новых систем доставки лекарств на основе природных полисахаридов

О. Ю. СЕЛЮТИНА^{1,2}, Н. Э. ПОЛЯКОВ¹, Е. С. МЕТЕЛЕВА³, А. В. ДУШКИН³

¹Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН,
ул. Институтская, 3, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: polyakov@kinetics.nsc.ru

²Новосибирский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

³Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН,
ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630090 (Россия)

Аннотация

Использование природных олигосахаридов и полисахаридов в качестве комплексантов для доставки лекарственных соединений существенно повышает их терапевтическую активность и стабильность при хранении, а также значительно снижает побочные эффекты. Применение современных физических методов исследования молекулярных процессов позволяет получать уникальную информацию о строении, динамике и физико-химических свойствах супрамолекулярных комплексов включения лекарственных соединений. В представленном обзоре проиллюстрированы возможности применения физических методов для исследования средств доставки лекарственных соединений в твердой фазе и в растворах, а также для установления механизмов повышения биодоступности лекарственных соединений в составе комплексов включения.

Ключевые слова: системы доставки лекарств, комплексы включения, полисахариды, арабиногалактан, глицирризиновая кислота, ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных проблем медицинской химии связана с низкой растворимостью лекарственных соединений. Возможный путь ее решения – использование систем доставки в виде комплексов с хорошо растворимыми соединениями. Во многих случаях это позволяет существенно снизить действующие дозы при сохранении лечебного действия. В данном обзоре мы сосредоточимся на использовании природных полисахаридов в качестве таких систем.

В разработке современных систем доставки лекарств наиболее востребованы методы повышения растворимости и скорости растворения фармацевтических агентов. Особую

роль играет растворимость лекарств, предназначенных для перорального приема. Гидрофобная молекула лекарства способна проходить через гидрофобный липидный слой за счет пассивного транспорта (против градиента концентрации), но для этого необходима высокая концентрация лекарственного соединения во внеклеточном окружении. Между тем до 40 % выпускаемых лекарственных соединений классифицируются как практически нерастворимые. Тот факт, что почти 85 % самых популярных препаратов принимаются перорально, определяет актуальность данного направления исследований.

В ИХТТМ СО РАН (Новосибирск) разработан уникальный механохимический метод

получения водорастворимых комплексов малорастворимых и нерастворимых лекарственных веществ, который позволяет повысить растворимость исходного соединения в десятки и сотни раз [1–5]. Интересные и практически важные результаты получены с использованием природных комплексантов: полисахарида арабиногалактана (АГ) и олигосахаридов глицирризиновой кислоты (ГК) и циклодекстринов (ЦД), с широким набором лекарственных соединений (ЛС) [4, 6–26]. Образование комплексов ЛС, их строение и свойства изучены как в твердом виде методами рентгенофазового и термического анализа, так и в растворах, с использованием современных физико-химических методов: гель-проникающей хроматографии, ВЭЖХ, SPR (surface plasmon resonance) и ЯМР [6–25]. Комбинация этих методов позволила не только получить доказа-

тельства образования нековалентных комплексов включения ЛС, но и исследовать изменения физико-химических свойств ЛС в составе комплексов. Показано, что:

1) комплексообразование в десятки и сотни раз увеличивает растворимость малорастворимых ЛС и их биодоступность;

2) комплексообразование существенно повышает стабильность включенных соединений, в том числе окислительную стабильность и фотостабильность;

3) получены доказательства влияния средств доставки ЛС на проницаемость клеточных мембран, что позволило предложить механизмы усиления активности лекарств в составе супрамолекулярных комплексов.

В представленном обзоре мы постарались проиллюстрировать возможности использования физических методов в исследовании

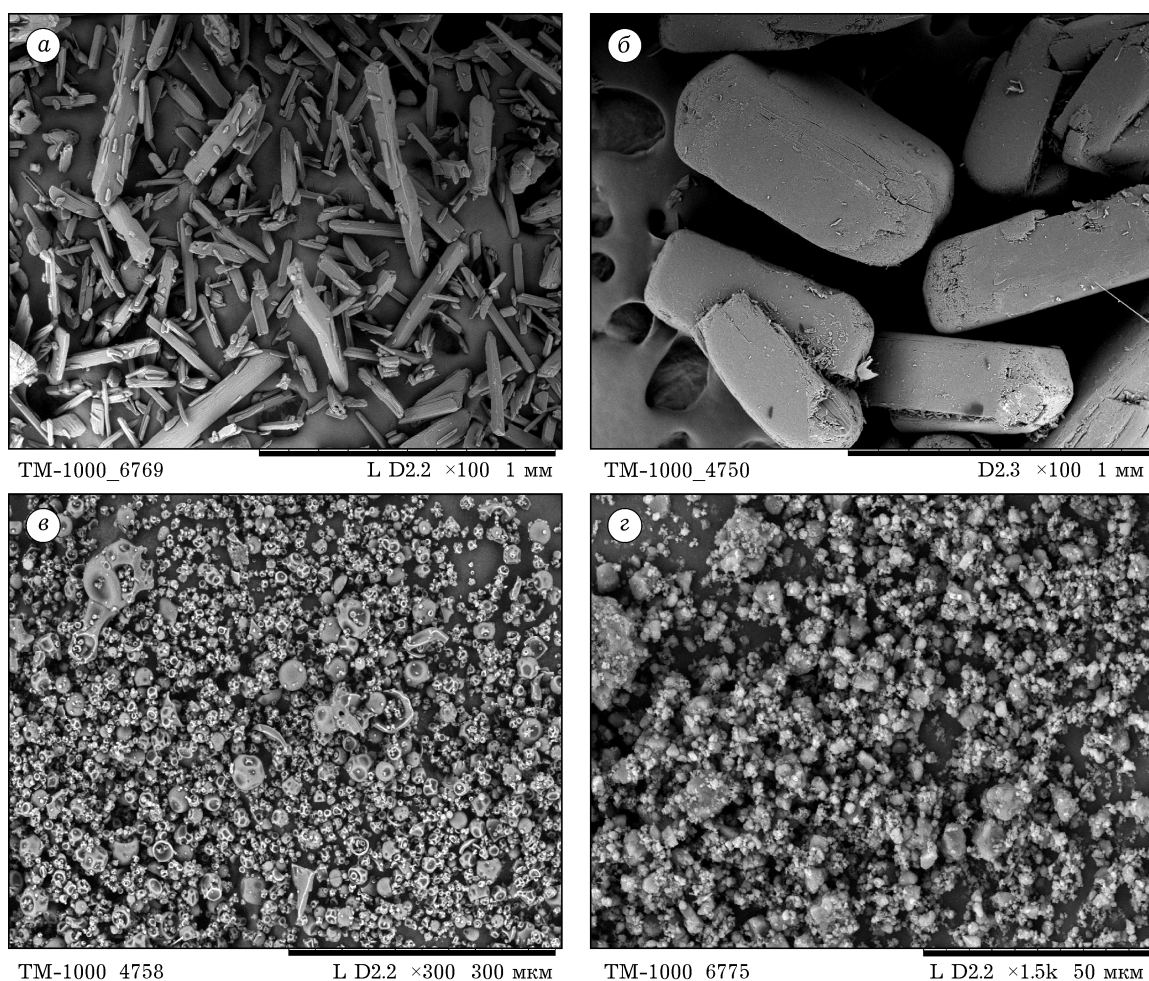


Рис. 1. Электронные микрофотографии: а – салициловая кислота исходная; б – ацетилсалициловая кислота исходная; в – арабиногалактан исходный; г – смесь арабиногалактан/салициловая кислота (10 : 1), обработанная в ВМ-1 в течение 24 ч.

средств доставки лекарственных соединений в твердой фазе и в растворах, а также в установлении механизмов повышения биодоступности лекарственных соединений в составе комплексов включения.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТВЕРДОЙ ФАЗЕ

Процесс механохимического синтеза основан на обработке порошковой смеси компонентов – полисахаридов и олигосахаридов – с лекарственными веществами в шаровых мельницах различной энергонапряженности. Механическая обработка производилась с использованием двух режимов: интенсивного (в планетарной лабораторной мельнице) и “мягкого” (в ротационной шаровой мельнице). Применение “мягкого” режима позволяет избежать таких недостатков интенсивной активации, как частичное разрушение применяемых веществ, а также облегчает возможность промышленного масштабирования процесса механической обработки. В условиях этого вида обработки можно получать твердые дисперсные системы – композитные агрегаты компонентов (рис. 1), при растворении которых происходит взаимодействие обрабатываемых веществ [27].

В работе [4] проведено сравнительное исследование свойств механохимических комплексов лекарственных препаратов с различными комплексообразователями – арабиногалактаном лиственницы сибирской и листвен-

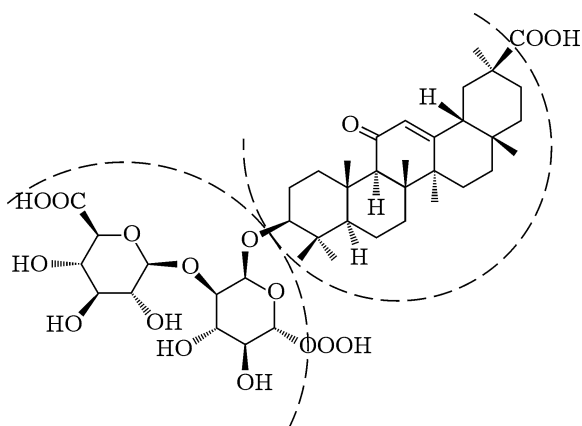


Рис. 2. Структурная формула глицирризиновой кислоты.

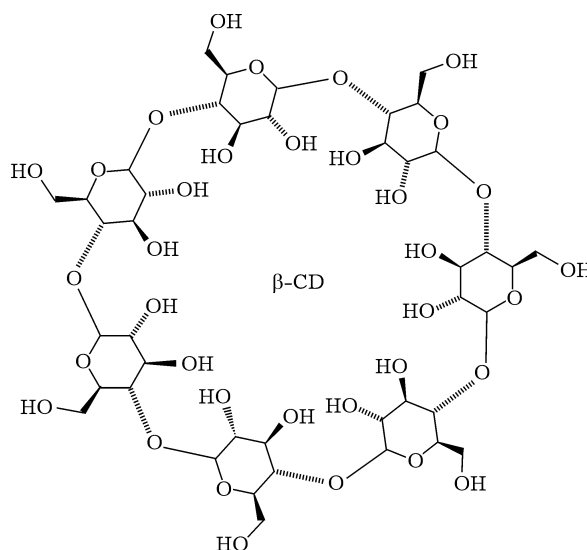


Рис. 3. Структурная формула циклодекстрина.

ницы Гмелина, глицирризиновой кислотой и β -циклодекстрином (рис. 2–4).

Образование комплексов можно определить по изменению растворимости ЛС в водном растворе полученных композиций. Во всех исследованных системах наблюдалось существенное увеличение растворимости ЛС, причем наиболее прочные межмолекулярные комплексы фиксируются с арабиногалактаном. В частности, растворимость комплексов арабиногалактана с клозапином повышается более чем в 100 раз, в то время как растворимость комплексов клозапина с β -циклодекстрином – всего в 15 раз (табл. 1). Во всех примерах механохимическая обработка компози-

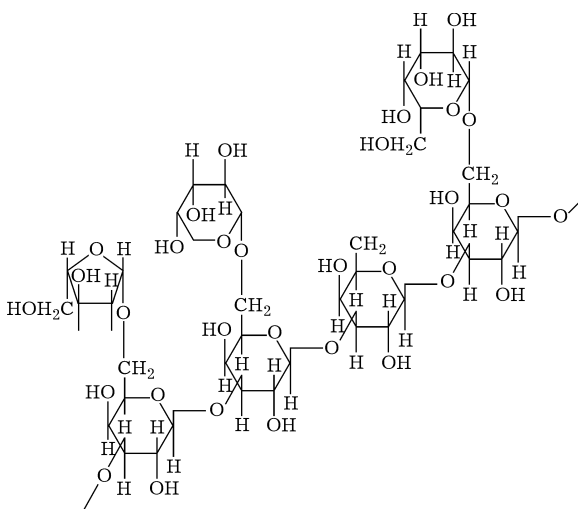


Рис. 4. Фрагмент молекулы арабиногалактана.

ТАБЛИЦА 1

Увеличение растворимости различных лекарственных соединений (ЛС) в составе комплексов с олигосахаридами и полисахаридами

ЛС	Комплексант/ЛС (массовое соотношение)	Увеличение растворимости, разы	Ссылка
Клозапин (азалептин)	Арабиногалактан (1 : 10) ^а	44	[4]
	Арабиногалактан (1 : 10) ^б	205	[4]
	Арабиногалактан (1 : 10) ^в	107.9	[4]
	Пектин (1 : 10) ^б	408	[4]
	Гидроксиэтилкрахмал (1 : 10) ^в	55	[4]
	β -Циклодекстрин (1 : 10) ^в	15.1	[4]
Нифедипин	Глицирризиновая кислота (1 : 10) ^б	22	[4]
	Арабиногалактан (1 : 10) ^б	69	[4]
	Арабиногалактан (1 : 20) ^б	137	[4]
Симвастатин	Глицирризиновая кислота (1 : 10) ^б	5.1	[4]
	Глицирризиновая кислота (1 : 10) ^б	260	[4]
	Арабиногалактан (1 : 10) ^а	36.7	[4]
Альбендазол	Арабиногалактан (1 : 10) ^а	33	[4]
	Арабиногалактан (1 : 10) ^в	580	[4]
	Гидроксиэтилкрахмал (1 : 10) ^в	31.3	[4]
	β -Циклодекстрин (1 : 6) ^а	13	[4]
	β -Циклодекстрин (1 : 6) ^в	30	[4]
	Пектин (1 : 5) ^б	45	[4]
	β -Циклодекстрин (1 : 6) ^б	19.7	[4]
Лютеин	Арабиногалактан (1 : 20) ^в	36 000	[26]
	Глицерам (1 : 20) ^в	30 000	[26]
Зеаксантин	Арабиногалактан (1 : 20) ^в	42 000	[26]
	Глицерам (1 : 20) ^в	18 000	[26]
Ибупрофен	Арабиногалактан (1 : 10) ^в	284	[1]
	Глицирризиновая кислота (1 : 10) ^в	14.7	[1]

^аСмешение без механической обработки.

^бМеханическая обработка в планетарной мельнице, ускорение 40g.

^вМеханическая обработка в шаровой мельнице, ускорение 1g.

ций приводит к существенному повышению прочности связывания ЛС. Концентрация ЛС в этих исследованиях контролировалась методом ВЭЖХ [4, 23].

Рентгенофазовый анализ показал, что в необработанных смесях присутствуют рефлексы, характерные для кристаллических структур лекарственных веществ. После механической обработки в мельницах они существенно уменьшаются или полностью исчезают. Это означает, что происходит частичная или полная потеря кристалличности лекарственных веществ. Данный эффект может быть связан с молекулярным диспергированием ЛС в твер-

дую фазу комплексообразователя и с образованием твердых растворов или комплексов. Это предположение подтверждено также данными термического анализа о поведении фазового перехода плавления при механической обработке смеси [4].

Изучение изменений свойств арабиногалактана после активации в планетарной мельнице производилось также методом ¹H ЯМР в порошкообразной субстанции АГ. В спектрах ЯМР наблюдалась широкая линия, обусловленная диполь-дипольным взаимодействием, не усредняемым в твердых телах, а также относительно узкая линия шириной при-

мерно 6 кГц. Это указывает на наличие некой подвижной фазы, интегральная интенсивность которой достигает почти 15 % от количества ядер ¹H в образце. Принимая во внимание, что содержание влаги в порошкообразном образце не превышает 2 % по массе, можно предположить, что наблюдаемая подвижная фаза относится к фрагментам боковых цепей макромолекул АГ. Повышенная подвижность фрагментов макромолекулы может способствовать образованию межмолекулярных комплексов ЛС-АГ при механической активации в твердом состоянии и в водных растворах [3].

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ И СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТВОРАХ

Исследованию подвижности ЛС в супрамолекулярных агрегатах методом ¹H ЯМР-спектроскопии посвящен целый ряд работ [2, 5, 6, 26]. Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации (*T*₁ и *T*₂ соответственно) очень чувствительны к изменению подвижности молекул [28, 29]. При комплексообразовании диффузионная подвижность молекул снижается, что приводит к уменьшению наблюдаемого времени релаксации. В случае быстрого обмена между комплексом и раствором спад сигнала ЯМР носит моноэкспоненциальный характер, а в случае медленного обмена (по сравнению с временем релаксации) кинетика спада становится би- или триэкспоненциальной:

$$I(t) = P_1 \exp(-t/T_{21}) + P_2 \exp(-t/T_{22}) + P_3 \exp(-t/T_{23})$$

Предэкспоненциальные множители в этом случае соответствуют доле протонов с различной вращательной подвижностью. Так, при условии равновесия между закомплексованной и свободной формами лекарственного вещества в случае биэкспоненциальной кинетики компонента *P*₁ относится к доле молекул в комплексе, а *P*₂ – к доле молекул в растворе. Типичные значения времени спин-спиновой релаксации для молекул в растворе составляют 0.5–1 с, в комплексе – 0.03–0.15 с [5, 22]. Данные о временах спин-спиновой релаксации для комплексов арабиногалактана с различными ЛС приведены в табл. 2 [5].

Аналогичным образом по изменению подвижности различных фрагментов внутри одного полимера можно определить, какие из фрагментов полимерной цепи или клубка непосредственно участвуют в образовании комплексов. Для арабиногалактана кинетика спада сигнала ЯМР в водном растворе демонстрирует триэкспоненциальный характер. Предполагается, что короткие времена релаксации соответствуют внутренним протонам, а длинные – внешним протонам полимерного клубка. Механическая активация в планетарной мельнице приводит к увеличению подвижности внутренних фрагментов макромолекулы и снижению их доли (табл. 3) [22].

Метод ЯМР позволяет получить информацию о строении и устойчивости комплексов ле-

ТАБЛИЦА 2

Времена спин-спиновой релаксации для комплексов арабиногалактана (АГ) с лекарственными веществами

Образцы	<i>P</i> ₁ , %	<i>T</i> ₂₁ , мс	<i>P</i> ₂ , %	<i>T</i> ₂₂ , мс
Исходный АГ	80	17	22	250
АГ после обработки в планетарной мельнице	65	25	35	250
Клозапин/АГ (1 : 20), без обработки	88	90	12	1000
То же, после обработки в планетарной мельнице	90	40	10	1000
Мезапам/АГ (1 : 20), без обработки	55	50	45	250
То же, после обработки в планетарной мельнице	90	30	10	250
Диазепам/АГ (1 : 20), без обработки	100*	150	0	–
То же, после обработки в планетарной мельнице	20	60	80	800
Индометацин/АГ (1 : 20), без обработки	58	50	42	900
То же, после обработки в планетарной мельнице	67	40	33	900

* Моноэкспонента.

ТАБЛИЦА 3

Параметры кинетики спада сигнала ЯМР макромолекул арабиногалактана (АГ) в водных растворах

Образцы АГ	P_1 , %	T_{21} , мс	P_2 , %	T_{22} , мс	P_3 , %	T_{23} , мс
Исходный	24.5±4.9	1.6±0.4	41.7±5.2	12±4	33±8	77±20
После 10 мин обработки в планетарной мельнице	14.6±0.5	2.0±0.2	49.2±1.7	41±2	36.2±1.9	199±9

карственных соединений с различными комплексами. Образование комплекса зачастую сопровождается изменением электронного окружения протонов молекулы-гостя, что проявляется в ЯМР-спектре как изменение химического сдвига соответствующих протонов. Таким образом, записывая спектры при различных концентрациях комплексанта и измеряя изменение химического сдвига, можно определить стехиометрию комплексов и константу их стабильности. Кроме того, этот метод позволяет определить, какой именно частью молекулы взаимодействует с комплексантом [24].

Эта методика применялась, к примеру, при анализе комплексов олигосахарида β -циклодекстрина с β -иононом (БИ), ненасыщенным кетоном, получаемым в ходе метаболизма каротиноидов. В работе [24] показано, что *транс*- β -ионин образует комплексы 2 : 1 (ЦД/БИ) с β -циклодекстрином и комплексы 1 : 1 с 2-гидропропил- β -циклодекстрином в водных растворах. При этом все комплексы демонстрируют высокую стабильность, которая значительно снижается при добавлении метанола в раствор.

Параметры комплексов в растворах можно определять также методами оптической спектроскопии по изменению оптической плотности раствора молекулы-гостя на определенной длине волны в зависимости от концентрации комплексанта. Этот метод, как и описанный выше метод ЯМР, позволяет получать информацию о стехиометрии и стабильности комплексов в растворе [25].

Методы оптической спектроскопии также дают информацию о защитных свойствах комплексов в растворе. Известно, что многие лекарственные соединения отличаются низкой стабильностью в растворах: фоточувствительностью, подверженностью к окислению посредством свободных радикалов, образующихся в организме в естественных условиях, и т. д. Комплексообразование с природными по-

лисахаридами в ряде случаев может существенно повысить стабильность лекарственного вещества и защитить его от нежелательных воздействий. Так, в работах [16, 26] исследовано влияние различных комплексантов на окислительную стойкость молекул каротиноидов – лютеина и зеаксантина. Эти каротиноиды выполняют важную защитную роль в сетчатке глаз человека и других млекопитающих, и их недостаток может привести к повреждениям глаза коротковолновым видимым светом и активными формами кислорода, итогом чего может стать возрастная макулярная дегенерация – основная причина необратимой слепоты в развитых странах мира. Лютеин и зеаксантин не вырабатываются в организме человека и должны поступать с пищей. С другой стороны, чрезвычайно низкая растворимость в воде и нестабильность ограничивают их практическое применение в качестве компонентов пищи или лекарственных препаратов. Получение супрамолекулярных комплексов зеаксантина и лютеина с глицирризиновой кислотой, ее динатриевой солью и природным полисахаридом арабиногалактаном позволит свести к минимуму эти недостатки и откроет перспективы использования комплексов этих каротиноидов в пищевой промышленности, а также для производства лекарственных препаратов с повышенной растворимостью и стабильностью. Формирование супрамолекулярных комплексов исследовано с помощью ЯМР-релаксации, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и оптических методов поглощения [16, 26]. Авторы показали, что комплексы с полисахаридами повышают растворимость каротиноидов более чем в 1000 раз. Также исследована окислительная стойкость каротиноидов в реакции с молекулами озона, пероксильными радикалами и ионами металлов в воде и органических растворителях. Обнаружено

значительное увеличение стойкости к окислению лютеина и зеаксантина в составе комплексов с арабиногалактаном и глицирризиновой кислотой. Окислительная стойкость каротиноидов в данной работе исследована методом оптической спектроскопии. Эксперименты показали, что арабиногалактан максимально связывается с каротиноидами и наиболее сильно влияет на их окислительную стабильность [26].

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ АССОЦИАТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Водорастворимые полисахариды находят широкое применение в медицине и в пищевой промышленности. Одна из основных физико-химических характеристик этих полимеров – молекулярные массы, которые изменяются в пределах от $\sim 10^3$ до $\sim 10^7$ Да. В технологических процессах получения продуктов на основе таких полимеров их макромолекулы могут подвергаться механическим воздействиям, что приводит к частичной деструкции – разрыву цепей. В результате уменьшается средняя молекулярная масса и возрастает полидисперсность [1, 22]. Эти деструктивные изменения могут быть наиболее выражены в “сухих” технологических процессах, например, в измельчении, таблетировании, смещении и т. д. Примером таких процессов служит механохимическое твердофазное получение супрамолекулярных комплексов лекарственных веществ с водорастворимыми полимерами (полисахаридами) – основы лекарственных средств повышенной эффективности [2]. При этом в результате частичной деструкции полимеров могут изменяться их токсикологические характеристики, которые необходимо контролировать в процессе создания новых лекарственных препаратов и пищевых продуктов.

В работе [30] изучены молекулярно-массовые характеристики полисахаридов (декстранов 10, 40, 70; гидроксиэтилкрахмала 200/0.5; арабиногалактанов из лиственницы и камеди акации) при их механической обработке ударно-истирающими воздействиями в ротационной и планетарной мельницах методом гель-фильтрационной жидкостной хроматографии. Полученные хроматограммы приведены на рис. 5.

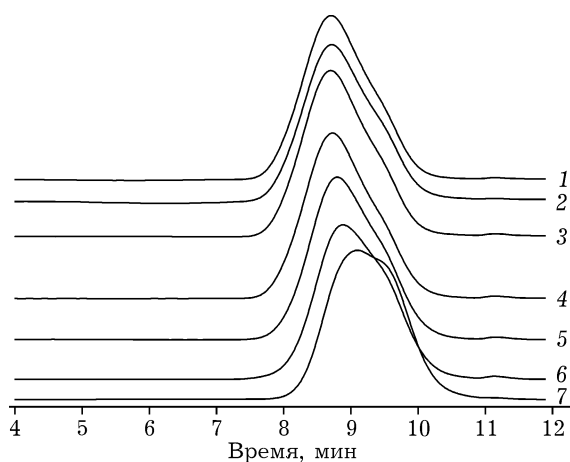


Рис. 5. Гель-хроматограммы раствора гидроксиэтилкрахмала: 1 – исходный, 2–4 – обработанный в мельнице ВМ-1 в течение 2 (2), 4 (3) и 24 ч (4), 5–7 – обработанный в мельнице АГО-2 в течение 5 (5), 10 (6), 20 мин (7).

Расчетные характеристики молекулярно-массовых распределений исследованных полисахаридов до и после механической обработки приведены в табл. 4. Видно, что при использовании интенсивного режима механической обработки (планетарная мельница) значительно снижаются молекулярные массы полисахаридов и несколько изменяется их полидисперсность M_w/M_n . По мере увеличения молекулярной массы M_w исходных полимеров степень механодеструкции повышается. Интересно отметить, что макромолекулы с высокой степенью “разветвления” – ГЭК и АГ – деструктируются на приблизительно равные фрагменты. Во всех полисахаридах не происходит значительного увеличения степени полидисперсности, вероятно, из-за преимущественной механодеструкции их высокомолекулярных фракций. Очевидно, что характер механодеструкции связан со строением макромолекул полисахаридов и физико-химическими механизмами разрыва их цепей. В работе [31] предложена модель механодеструкции линейных синтетических полимеров, согласно которой наибольшую вероятность разрыва при механическом воздействии имеют звенья, расположенные в середине макромолекулы. При качественном рассмотрении характер механодеструкции ГЭК и АГ близок к этой модели. В случае декстранов и фибрегама механизм механодеструкции может быть иным. Однако, несмотря на содержатель-

ТАБЛИЦА 4

Характеристики молекулярно-массового распределения полисахаридов

Образец	Способ получения	M_n , кДа	M_w , кДа	M_w/M_n	Молекулярно-массовое распределение полисахаридов, кДа	
					10 %*	90 %*
Фибрегам	Исходный	146.6	256.7	1.8	<75.9	<528.2
	М/о в АГО-2 (40g), 20 мин	31.4	55.2	1.8	<16.3	<113.5
	М/о в ВМ-1 (1g), 4 ч	120.3	231.6	1.9	<60.3	<478.4
Арабиногалактан	Исходный	13.9	17.3	1.2	<9.0	<27.9
	М/о в АГО-2 (40g), 20 мин	9.3	11.2	1.2	<6.1	<18.4
	М/о в ВМ-1 (1g), 4 ч	13.1	16.3	1.2	<8.1	<26.2
Гидроксиэтилкрахмал	Исходный	47.9	116.9	2.4	<20.9	<265.3
	М/о в АГО-2 (40g), 20 мин	26.6	55.2	2.1	<12.7	<118.9
	М/о в ВМ-1 (1g), 4 ч	45.6	105.5	2.3	<20.0	<237.6
Декстран 70	Исходный	30.9	76.4	2.5	<14.0	<174.7
	М/о в АГО-2 (40g), 20 мин	22.7	54.8	2.4	<10.4	<123.5
	М/о в ВМ-1 (1g), 4 ч	29.6	73.5	2.5	<13.4	<169.2
Декстран 40	Исходный	24.6	38.0	1.5	<13.3	<72.3
	М/о в АГО-2 (40g), 20 мин	19.5	31.9	1.6	<10.4	<61.3
	М/о в ВМ-1 (1g), 4 ч	24.3	37.4	1.5	<13.0	<71.2
Декстран 10	Исходный	8.3	13.4	1.6	<4.2	<26.4
	М/о в АГО-2 (40g), 20 мин	8.0	12.1	1.5	<41.9	<22.7
	М/о в ВМ-1 (1g), 4 ч	8.3	13.4	1.6	<4.2	<26.3

* Условное разделение массовой доли “легкой” и “тяжелой” фракций.

ность полученных результатов, для их детальной интерпретации необходимы дальнейшие исследования.

Отдельного обсуждения заслуживают результаты, полученные по арабиногалактану из древесины лиственницы. При использовании интенсивного режима механической обработки (планетарная мельница и ротационная мельница со смешанной шаровой загрузкой) значительно уменьшается молекулярная масса макромолекул арабиногалактана. Согласно полученным данным, его макромолекулы с $M_w = 17.3$ кДа ($M_n = 13.9$ кДа) в особо жестких условиях механической обработки количественно “разбиваются” на два практически равных фрагмента с $M_w = 8.3$ кДа ($M_n = 7.7$ кДа). Степень полидисперсности M_w/M_n при этом уменьшается до 1.08. Полученные данные позволяют предположить, что нативные макромолекулы АГ состоят из двух одинаковых по молекулярной массе фрагментов с относительно непрочной связью, которая разрывается в условиях интенсивной механической обработки. Интересно отметить,

что макромолекулы АГ с $M_n \sim 9$ кДа также являются основным продуктом химической деструкции АГ из канадской лиственницы [32].

Из данных табл. 4 также следует, что в “мягких” условиях механической обработки можно практически избежать механодеструкции исследуемых полисахаридов. По нашему мнению, в большинстве случаев эти условия механической обработки предпочтительны, поскольку в технологических процессах приготовления композиций, которые в дальнейшем будут использоваться для получения БАД и лекарственных средств, желательно избегать заметного изменения молекулярно-массовых характеристик полимерных материалов. В противном случае могут потребоваться дополнительные испытания и стандартизация полученных продуктов.

Другая возможность применения гель-хроматографического метода продемонстрирована нами для исследования структуры водных растворов ГК, в том числе в присутствии малорастворимых лекарственных веществ [1]. Метод гель-проникающей хроматографии по-

зволяет идентифицировать и определить размеры самоассоциатов/мицелл, а также оценить диапазон концентраций их существования. С другой стороны, для получения твердых композиций ГК с лекарственными веществами мы использовали механохимический подход, развиваемый в ИХТТМ СО РАН [12, 13]. Он выгодно отличается получением супрамолекулярных комплексов в одну стадию, отсутствием жидких фаз (растворов или расплавов), возможностью получения твердых дисперсий веществ, не имеющих совместной растворимости или разлагающихся при плавлении. Для сравнительной оценки прочности связывания молекул фармаконов в межмолекулярные комплексы или мицеллы ГК в водных растворах мы использовали критерий повышения растворимости изученных малорастворимых лекарственных субстанций [13] с установленной фармакологической активностью.

На рис. 6 представлены гель-хроматограммы водных растворов ГК. Во всех диапазонах исследованных концентраций наблюдаются пики высокомолекулярных образований с молекулярной массой 46–67 кДа, в то время как молекулярная масса ГК составляет 836.96 Да.

Характеристики молекулярно-массовых распределений (ММР) приведены в табл. 5.

Площади пиков линейно пропорциональны концентрациям анализируемых растворов. Расчет площадей пиков относительно известных количеств стандартов-декстранов показывает, что в них сосредоточена практически вся масса ГК в исследуемых образцах. Таким образом, в гель-хроматограммах наблюдаются самоассоциаты ГК – мицеллы. По нашим оценкам, критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) приблизительно равна 0.0001 мас. % (0.001 мМ). В разбавленных растворах (0.01–0.001 мас. %) наблюдается только один тип мицелл с массой ~66 кДа,

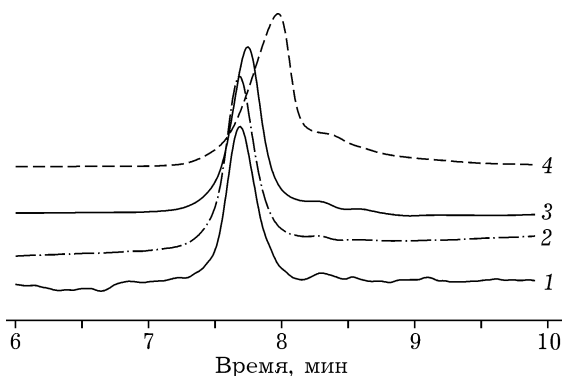


Рис. 6. Гель-хроматограммы раствора глицирризиновой кислоты в различных концентрациях, мас. %: 0.001 (1), 0.01 (2), 0.1 (3), 0.5 (4).

который характеризуется очень малой степенью полидисперсности ($M_w/M_n = 1.08-1.06$). При повышении концентрации растворов ГК до 0.5 мас. % (см. рис. 5, табл. 5) масса мицелл уменьшается, увеличивается их полидисперсность, образуются мицеллы с массой, примерно равной 46 кДа. Таким образом, в водных растворах в диапазоне концентраций 0.0001–0.5 мас. % глицирризиновая кислота практически полностью самоассоциирована в мицеллы, причем наиболее стабильны мицеллы с ММ ~ 66 кДа, состоящие приблизительно из 80 молекул ГК.

В табл. 5 также приведены данные о ММР мицелл в водных растворах дисперсий системы ГК/ибупрофен. Аналогичные данные получены в системах ГК/сибазон, ГК/бутадион и ГК/азалептин. Таким образом, в водных растворах композиций ГК – фармакон растворенные вещества также самоассоциированы в мицеллы, стабильные в широком диапазоне концентраций, как и в растворах исходной ГК. Учитывая полученные результаты, мы считаем, что повышение водорастворимости малорастворимых фармаконов происходит за счет их включения в мицеллы/самоассоциаты ГК. В ее молекуле присутству-

ТАБЛИЦА 5

Молекулярно-массовые характеристики образцов глицирризиновой кислоты (ГК)

Образцы	Концентрация в исследуемом растворе, мас. %							
	0.001		0.01		0.1		0.5	
	T_1, c	M_w/M_n	T_1, c	M_w/M_n	T_1, c	M_w/M_n	T_1, c	M_w/M_n
Исходный	7.59	65930/61010	7.59	66200/62470	7.67	60730/57290	7.92	45300/36500
ГК/ибупрофен (10 : 1)	7.58	69400/65300	7.57	65200/61670	7.66	48550/39000	7.91	69020/67180

ют гидрофильный (два глюкоуроновых остатка) и гидрофобный (тритерпеновый) фрагменты (см. рис. 2). Скорее всего, в мицелле молекулы ГК ориентированы гидрофобными фрагментами внутрь, а гидрофильными частями – на внешнюю поверхность самоассоциата. При этом молекулы фармакона могут как находиться во внутренней гидрофобной части мицеллы, так и комплексовать с внешними гидрофильными фрагментами. К сожалению, на основе полученных в настоящей работе экспериментальных данных сложно сделать вывод о таких тонких механизмах взаимодействия молекул фармаконов с самоассоциатами ГК. В целом, ММ мицелл ГК в присутствии фармаконов на 5–7 % выше во всем диапазоне исследованных концентраций ГК. Таким образом, полученные данные подтверждают предположение о возможности включения молекул фармаконов в мицеллы ГК.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАНОМОДИФИЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СРЕДСТВ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Важную информацию о механизме изменения биодоступности лекарственных препаратов в составе супрамолекулярных комплексов с природными полисахаридами можно получить при исследовании влияния комплексантов на свойства клеточных мембран. Известно, что гидрофобная молекула лекарственного соединения может проходить через гидрофобный липидный бислой клеточной мембраны за счет простой диффузии против градиента концентрации. Однако в естественных условиях такая диффузия затрудняется тем, что внеклеточное окружение – это преимущественно водная среда, и гидрофобная молекула ЛС в ней практически нерастворима. Комплексообразование с различными полисахаридами, к примеру циклодекстрином, позволяет решить эту проблему за счет существенного повышения растворимости. Благодаря этому можно достичь высокой концентрации ЛС во внеклеточной среде и тем самым повысить проницаемость клеточной мембраны для этого соединения [33, 34].

Однако в случае комплексообразования различных ЛС с глицирризиновой кислотой биодоступность лекарственных препаратов в составе комплексов может повышаться не

только за счет увеличения растворимости, но и благодаря взаимодействию глицирризиновой кислоты с клеточной мембраной. Для изучения механизма усиления биодоступности ЛС в составе комплексов с ГК исследовано влияние глицирризиновой кислоты на свойства клеточных мембран. В работах [35, 36] изучено влияние ГК на физические и функциональные свойства клеточных мембран различными физико-химическими методами. В качестве модельной системы выбраны эритроциты. В частности, исследовано влияние ГК на упругость клеточных мембран. Метод атомно-силовой микроскопии в жидкости позволяет получить информацию о распределении модуля Юнга по поверхности клетки, без нарушения ее целостности. Сила действия на кантилевер атомно-силового микроскопа со стороны клетки $F(\Delta z)$ выражается следующим образом:

$$F(\Delta z) = \frac{2E_{\text{кл}}}{\pi(1 - \eta_{\text{кл}}^2) \tan \alpha} \Delta z^2$$

где $E_{\text{кл}}$ – модуль Юнга мембраны; $\eta_{\text{кл}}$ – отношение Пуассона для клетки; α – половинный угол острия зонда. Для анализа в данных работах рассматривался весь множитель

$\xi = \frac{2E_{\text{кл}}}{\pi(1 - \eta_{\text{кл}}^2) \tan \alpha}$. Обнаружено, что после обработки клеток растворами ГК в концентрации 0.05 и 0.5 ммоль/л снижается модуль Юнга мембран эритроцитов, т. е. клетки становятся более мягкими (табл. 6) [35, 36].

В работе [35] также изучено влияние ГК на проницаемость мембран эритроцитов для модельной молекулы формиата натрия. С этой целью использован метод ЯМР с добавлением парамагнитных ионов. Клеточная мембрана формирует границу между внутриклеточным и внеклеточным окружением и может быть проницаема для таких малых молекул, как формиат натрия. Добавление в раствор

ТАБЛИЦА 6

Среднее значение параметра ξ и ширина его распределения для образцов, обработанных ГК в разных концентрациях

Образцы	ξ , Н/м ²	Ширина распределения ξ
Контроль	$3 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$
0.05 ммоль/л ГК	$9 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}
0.5 ммоль/л ГК	$5 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$

парамагнитных ионов приводит к тому, что в наблюдаемом ЯМР-спектре значительно уширяется сигнал от протонов, находящихся в растворе. Таким образом, в наблюдаемый сигнал ЯМР для протонов формиата натрия вносят вклад только протоны, которые находятся внутри клетки и не подвержены влиянию парамагнитных ионов. При выходе из клетки в раствор они теряют свою магнитную метку. При этом время обмена между клеткой и окружением можно вычислить по наблюдаемому времени спин-решеточной релаксации T_1 : $1/T_1 = 1/T_{обм} + 1/T_{вн}$ где $T_{обм}$ – время обмена; $T_{вн}$ – время спин-решеточной релаксации протонов внутри клетки. Время обмена, в свою очередь, напрямую связано с проницаемостью клеточной мембраны [35].

С помощью данного метода обнаружено, что увеличение проницаемости мембран эритроцитов для формиата натрия наблюдается уже при концентрации ГК 0.01 ммоль/л. С дальнейшим ростом концентрации ГК проницаемость уменьшается слабо. Максимальный зафиксированный эффект соответствует концентрации ГК 1 ммоль/л и примерно равен 50 % [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известные физико-химические методы позволяют получить широкий спектр информации о свойствах систем доставки на основе супрамолекулярных комплексов лекарственных соединений с природными полисахаридами. Эта информация включает в себя термодинамические параметры комплексообразования, молекулярно-массовые характеристики средств доставки, стехиометрию комплексов, а также защитные свойства комплексов, в частности влияние комплексообразования на фотостабильность и окислительную стойкость лекарственных соединений. Кроме того, современные физико-химические методы позволяют получить данные о механизме изменения биодоступности лекарственных веществ в присутствии комплексантов. Таким образом, применение комплексного физико-химического подхода к изучению средств доставки лекарственных препаратов может открыть новые перспективы в их использовании.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-04-02538).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Душкин А. В., Метелева Е. С., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Долгих М. П., Толстиков Г. А. // *Химия уст. разв.* 2010. Т. 18, № 4. С. 517–525.
- 2 Dushkin A. V., Meteleva E. S., Tolstikova T. G., Tolstikov G. A., Polyakov N. E., Medvedeva E. N., Neverova N. A., Babkin V. A. // *Russ. Chem. Bull.* 2008. Vol. 6. P. 1299–1307.
- 3 Dushkin A. V., Meteleva E. S., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Tolstikov G. A. // *Chem. Sust. Dev.* 2010. Vol. 18. P. 719–728.
- 4 Душкин А. В., Метелева Е. С., Чистяченко Ю. С., Халиков С. С. // *Фунд. исследования.* 2013. № 1. P. 741–749.
- 5 Dushkin A. V., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Tolstikov G. A. // *The Complex World of Polysaccharides. InTech.* 2012. P. 573–602.
- 6 Polyakov N. E., Khan V. K., Taraban M. B., Leshina T. V. // *J. Phys. Chem. B.* 2008. Vol. 112. P. 4435–4440.
- 7 Polyakov N. E., Khan V. K., Taraban M. B., Leshina T. V., Salakhutdinov N. F., Tolstikov G. A. // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109. P. 24526–24530.
- 8 Polyakov N. E., Kispert L. D. // *Beta Carotene: Dietary Sources, Cancer and Cognition.* NY: Nova Science Publ., 2009. P. 191–230.
- 9 Polyakov N. E., Leshina T. V. // *The Open Conf. Proc. J.* 2011. Vol. 2. P. 64–72.
- 10 Polyakov N. E., Leshina T. V., Konovalova T. A., Hand E. O., Kispert L. D. // *Free Rad. Biol. Med.* 2004a. Vol. 36. P. 872–880.
- 11 Polyakov N. E., Leshina T. V., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Konovalova T. A., Kispert L. D. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. Vol. 113. P. 275–282.
- 12 Polyakov N. E., Leshina T. V., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Konovalova T. A., Kispert L. D. // *J. Phys. Chem. B.* 2010. Vol. 114. P. 14200–14204.
- 13 Polyakov N. E., Leshina T. V., Hand E., Petrenko A., Kispert L. D. // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2004b. Vol. 161. P. 261–267.
- 14 Polyakov N. E., Leshina T. V., Salakhutdinov N. F., Kispert L. D. // *J. Phys. Chem. B.* 2006a. Vol. 110. P. 6991–6998.
- 15 Polyakov N. E., Leshina T. V., Salakhutdinov N. F., Konovalova T. A., Kispert L. D. // *Free Rad. Biol. Med.* 2006b. Vol. 40. P. 1804–1809.
- 16 Polyakov N. E., Magyar A., Kispert L. D. // *J. Phys. Chem. B.* 2013. Vol. 117. P. 10173–10182.
- 17 Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Bryzgalov A. O. // *Mini-Reviews Med. Chem.* 2009. Vol. 9. P. 1317–1328.
- 18 Yuan C., Du L., Jin Z., Xu X. // *Carbohydrate Polymers.* 2013. Vol. 91(1). P. 385–389.
- 19 Yuan C., Jin Z., Xu X. // *Carbohydrate Polymers.* 2012. Vol. 89(2). P. 492–496.
- 20 Pinho E., Grootveld M., Soares G., Henriques M. // *Carbohydrate Polymers.* 2014. Vol. 101. P. 121–135.
- 21 Polyakov N. E., Kispert L. D. // *Carbohydrate Polymers.* 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.016
- 22 Душкин А. В., Метелева Е. С., Чистяченко Ю. С., Поляков Н. Э. // *Фунд. исследования.* 2013. № 1. P. 789–796.
- 23 Душкин А. В., Сунцова Л. П., Халиков С. С. // *Фунд. исследования.* 2013. № 1. P. 448–457.
- 24 Polyakov N. E., Leshina T. V., Hand E. O., Petrenko A., Kispert L. D. // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2004. Vol. 161. P. 261–267.

- 25 Polyakov N. E., Leshina T. V., Salakhutdinov N. F., Kispert L. D., *J. Phys. Chem.* 2006. Vol. 110. P. 6991–6998.
- 26 Apanasenko I. E., Selyutina O. Yu., Polyakov N. E., Suntsova L. P., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Vachali P., Bernstein P. S. // *Archives Biochem. Biophys.* 2015. Vol. 572. P. 58–65.
- 27 Душкин А. В. // *Химия уст. разв.* 2004. Т. 12, № 3. С. 251–274.
- 28 Emsley J. W., Freeney J., Sutcliffe L. H. // *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* Pergamon Press: Oxford, 1965.
- 29 Popova M. V., Tchernyshev Y. S., Michel D. // *Langmuir.* 2004. Vol. 20. P. 632–636.
- 30 Душкин А. В., Метелева Е. С., Толстикова Т. Г., Павлова А. В., Хвостов М. В. // *Хим. фарм. журн.* 2012. № 7. С. 70–73.
- 31 Grassie N. and Scott G. Cambridge University Press, 1985. P. 201–207.
- 32 Prescott J. H., Enriquez P., Jung C., Menz E., Groman E. V. // *Carbohydrate Res.* 1995. Vol. 278. P. 113–128.
- 33 Masson M., Loftsson T., Stefansson E. // *Proc. of the Ninth Int. Symp. on Cyclodextrins.* 1999. P. 363–366.
- 34 Loftsson T., Vogensen S. B., Brewster M. E., Konrádsdyttir F. // *J. Pharm. Sci.* 2007. Vol. 96(10). P. 2532–2546.
- 35 Selyutina O. Yu., Polyakov N. E., Korneev D. V., Zaitsev B. N. // *Drug Deliv.* 2014. DOI: 10.3109/10717544.2014.919544.
- 36 Селютина О. Ю., Поляков Н. Э., Корнеев Д. В., Зайцев Б. Н. // *Изв. АН, сер. хим.* 2014. № 5. P. 1201–1204.