

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения российской академии наук

На правах рукописи

ХВОСТОВ МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ
КОМПЛЕКСОВ АРАБИНОГАЛАКТАНА И ГЛИЦИРИЗИНОВОЙ
КИСЛОТЫ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология
Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Толстикова Татьяна Генриховна

Новосибирск – 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Циклодекстрины.....	21
1.2. Пуллулан	35
1.3. Альгинаты	39
1.4. Гиалуроновая кислота.....	41
1.5. Декстрыны.	45
1.6. Пектин	47
1.7. Хитозан.....	50
1.8. Арабиногалактан	54
1.9. Глицирризиновая кислота	60
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
2.1. Экспериментальные животные	63
2.2. Исследуемые соединения	63
2.3. Фармакологические модели и тесты	74
2.3.1. Модели экспериментальной боли	74
2.3.2. Модель воспаления	75
2.3.3. Модель острой экспериментальной гиперлипидемии у крыс, индивидуированной детергентом WR 1339	76
2.3.4. Определение гипотензивного действия	77
2.3.5. Определение протромбинового времени.....	77
2.3.6. Исследование противоописторхозной активности.....	78
2.3.7. Оценка влияния агентов на слизистую желудка.....	78
2.4. Фармакокинетические исследования	80
2.5. Исследование проницаемости ЛС на монослое клеток Caco-2.....	82
2.6. Оценка проницаемости пуромицина в клетки линии STO-TG-puro с использованием MTT-теста.....	83
2.7. Статистическая обработка.....	84
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ С АГ И НА ₂ ГК <i>IN VIVO</i>	85

3.1. Комплексы с арабиногалактаном	87
3.1.1. Исследование фармакологических свойств комплекса АСК:АГ 1:10...	87
3.1.2 Исследование фармакологических свойств комплекса НАП:АГ 1:10 ...	95
3.1.3. Исследование фармакологических свойств комплекса ИБ:АГ 1:10....	102
3.1.4. Исследование фармакологических свойств комплекса АТ:АГ 1:10....	111
3.1.5. Исследование фармакологических свойств комплекса СИМ:АГ 1:10	114
3.1.6. Исследование фармакологических свойств комплекса НФ:АГ 1:10 ...	117
3.1.7. Исследование фармакологических свойств комплекса ВФ:АГ 1:10 ...	121
3.1.8. Исследование фармакологических свойств комплекса АБЗ:АГ 1:10..	124
3.1.9. Исследование фармакологических свойств комплекса ПЗК:АГ 1:10 .	126
3.2. Комплексы с глицирризиновой кислотой.....	129
3.2.1. Исследование фармакологических свойств комплекса АТ:Na ₂ ГК 1:10	129
3.2.2. Исследование фармакологических свойств комплекса СИМ:Na ₂ ГК 1:10	131
3.2.3. Исследование фармакологических свойств комплекса ВФ:ГК 1:10 ...	134
3.2.4. Исследование фармакологических свойств комплекса ПЗК:Na ₂ ГК 1:10	135
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АГ, Na₂ГК И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ЛС <i>IN VITRO</i>	139
4.1. Исследование свойств АГ, Na ₂ ГК и их комплексов с ЛС на клеточной линии Caco-2.....	139
4.1.2. Исследование влияния АГ и Na ₂ ГК на проницаемость пуромицина в клетки линии STO-TG-риго с использованием МТТ-теста	145
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ВЫВОДЫ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В течение 19-го и 20-го века было создано и допущено до клинического применения большое количество лекарственных средств, практически по всем существующим нозологиям. Перечень лекарств, имеющихся в распоряжении современной медицины, насчитывает тысячи наименований. При этом большая их часть используется в виде твердых лекарственных форм для перорального применения (www.rls.ru). Разработка новых лекарственных молекул становится очень дорогим процессом, занимающим также значительное количество времени проходящего от синтеза такой молекулы до внедрения ее в медицинскую практику (DiMasi J. A. et al., 2003). В сложившейся ситуации на передний план выходят новые подходы, модифицирующие как физико-химические, так и фармакологические свойства хорошо известных лекарственных веществ (Tiwari G., et al., 2012). Основной целью таких модификаций является повышение эффективности и безопасности ЛС. Как известно, многие ЛС плохо растворимы в воде, имеют низкую биодоступность при пероральном применении, что является ограничением для их более широкого клинического использования. Такие ЛС относят к 2 или 4 классу, согласно Биофармацевтической классификации (Amidon G. L. et al., 1995). Кроме этого, те химические вещества, которые синтезируются в настоящее время в качестве кандидатов в ЛС, являются в подавляющем случае липофильными и это накладывает ограничения на их биодоступность при пероральном введении (Leuner C. et al., 2000; Pouton C. W. et al., 2006; Kawabata Y. et al., 2011).

Степень разработанности

Проблема биодоступности при пероральном введении плохо растворимых в воде ЛС и вновь синтезируемых молекул-кандидатов в ЛС является крайне актуальной для современной фармацевтической индустрии и требует простого и

эффективного решения. В 1995 году была разработана специальная Биофармацевтическая классификация ЛС, отражающая их растворимость в воде и проницаемость через биологические мембранны (Amidon G. L. et al., 1995). Вещества, требующие улучшения растворимости в воде, относят к 2 и 4 классам. Одним из перспективных направлений в этой области является создание водорастворимых супрамолекулярных комплексов-включений по типу «гость-хозяин», где в качестве «хозяина» выступают различные вещества, способные к образованию липофильных полостей, а в качестве «гостя» используют уже зарегистрированные лекарственные молекулы. Как правило, между молекулами ЛС и молекулами «гостя» не образуется ковалентных связей, а лишь водородные и Ван-дер-вальсовые взаимодействия. Такая слабая связь не требует больших затрат энергии на высвобождение молекулы ЛС из молекулы «хозяина», тем самым обеспечивается быстрая диссоциация таких систем с последующей абсорбцией ЛС. В качестве «хозяина» могут быть использованы вещества природного и не природного происхождения: полисахариды, полимеры, липосомы, наносферы, микросферы, мицеллы (Arima H. et al., 2015; Gaucher G. et al., 2010). Вещества из природных источников всегда использовались человеком в первую очередь. Свидетельством этому является тот факт, что большая часть применяемых сегодня ЛС имеет именно природное происхождение (Gordon M. et al., 2013). Поэтому к настоящему времени проведено большое количество исследований с использованием природных соединений в качестве средств доставки ЛС, улучшающих их растворимость в воде. Наиболее известными являются циклические олигосахариды циклодекстрины. На фармацевтическом рынке представлено большое количество готовых лекарственных препаратов с их использованием (Loftsson T. et al., 2010). Полисахариды также активно изучаются, но их применение зачастую ограничено направленной доставкой ЛС в толстую кишку или местным применением. Это связано с тем, что наиболее часто используемые полисахариды пуллулан, альгинаты, гиалуроновая кислота, декстраны, пектин, хитозан образуют вязкие растворы после растворения в воде, что задерживает высвобождение ЛС из их матрицы. Кроме того, в ЖКТ эти

полисахариды метаболизируются и высвобождают ЛС преимущественно в толстой кишке (Sinh V. R. et al., 2001).

Арабиногалактан является полисахаридом, однако, в отличие от уже применяемых в фармацевтике, имеет разветвленную структуру и не образует вязких растворов (Медведева Е. Н. и др., 2003; Odonmazig P. et al., 1994). Эти свойства делают его уникальным для использования в качестве средства доставки ЛС в ЖКТ. Для промышленного получения АГ в мире в основном используют древесину лиственниц, что свидетельствуют об огромных запасах этого вещества (Медведева Е. Н. и др., 2003). Помимо полисахаридов большой интерес представляет глицирризиновая кислота, которая является природным сапонином с амфифильной структурой. Ее источником является корень солодки *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, широко произрастающих во многих странах мира. Это соединение широко используется в пищевой промышленности и обладает разнообразными фармакологическими свойствами (Толстиков Г. А. и др., 2007). Благодаря своей химической структуре ГК способна формировать самоассоциаты – мицеллы в водном растворе (Dushkin A. V. et al., 2010; Dushkin A. V. et al., 2012). Эти мицеллы могут выступать в роли «хозяина» для солюбилизации и доставки в ЖКТ липофильных молекул ЛС («гость»).

Важным недостатком современных подходов к получению комплексов типа «гость-хозяин» является необходимость использования жидких фаз – растворов или расплавов. Это может способствовать ухудшению стабильности молекул «гостя», остаточные количества растворителя могут негативно отражаться на стабильности твердых конечных продуктов. Кроме этого, для растворения плохо растворимых веществ применяют органические растворители, что способствует загрязнению окружающей среды. Применение расплавов зачастую невозможно, так как многие лекарственные вещества термически нестабильны.

В связи с этим, перспективным способом повышения растворимости и фармакологической активности лекарственных веществ является одностадийное твердофазное механохимическое получение их композиций/твердых дисперсий,

которые в водных растворах образуют супрамолекулярные комплексы-включения. Такой подход лишен, описанных выше, недостатков.

Таким образом, механохимическое получение твердых дисперсий ЛС с растительными метаболитами арабиногалактаном и глицирризиновой кислотой является перспективным подходом к улучшению биодоступности и фармакологических свойств ЛС.

Цель исследования

Изучить фармакологические свойства супрамолекулярных комплексов-включений арабиногалактана и динатриевой соли глицирризиновой кислоты с лекарственными средствами различных групп, относящихся к 2 классу биофармацевтической классификации и оценить перспективность использования такого подхода для повышения биодоступности и улучшения фармакологических свойств лекарственных средств.

Задачи исследования

1. Провести фармакологические исследования комплексов арабиногалактана с лекарственными средствами разных фармакологических групп (относящихся к 2 классу биофармацевтической классификации) при пероральном введении:

- изучить анальгетическое и противовоспалительное действие комплексов с ацетилсалicyловой кислотой, напроксеном, ибuprofenом; гипохолестеринемическое действие комплексов с аторвастиatinом, симвастатином; гипотензивное действие комплекса с нифедипином; антикоагулянтное действие комплекса с варфарином; противоопистархозное действие комплекса с альбендазолом.
- изучить фармакокинетические параметры (биодоступность) комплексов с ибuprofenом, аторвастиatinом, симвастатином, нифедипином, варфарином, празиквантелом.

- оценить раздражающее влияние на слизистую желудка комплексов с нестериоидными противовоспалительными средствами.

2. Провести фармакологические исследования комплексов динатриевой соли глицерризиновой кислоты с лекарственными средствами разных фармакологических групп (относящихся к 2 классу биофармацевтической классификации) при пероральном введении:

- изучить гипохолестеринемическое действие комплексов с аторвастатином, симвастатином; антикоагулянтное действие комплекса с варфарином.
- изучить фармакокинетику (биодоступность) комплексов с аторвастатином, симвастатином, празиквантелом.

3. Определить *in vitro* дополнительный к солюбилизации механизм повышения биодоступности лекарственных средств из комплексов-включений с арабиногалактаном и динатриевой солью глицерризиновой кислоты.

Научная новизна

Впервые проведено изучение фармакодинамических свойств комплексов-включений арабиногалактана и динатриевой соли глицерризиновой кислоты с лекарственными средствами разных фармакологических групп (нестериоидные противовоспалительные средства: ацетилсалициловая кислота, напроксен, ибuprofen; статины: аторвастатин, симвастатин; гипотензивное средство: нифедипин; антикоагулянт: варфарин; противопаразитарные препараты: альбендазол, празиквантел) при пероральном введении, полученных одностадийным механохимическим синтезом. Для комплексов ибuproфена, аторвастатина, симвастатина, нифедипина, варфарина, празиквантела с арабиногалактаном и комплексов аторвастатина, симвастатина и празиквантела с динатриевой солью глицерризиновой кислотой впервые изучены фармакокинетические параметры. Установлено, что комплексообразование с этими растительными метаболитами повышает биодоступность ЛС, обладающих плохой растворимостью в воде, от 1,15 до 5,2 раз. Исключением является

варфарин, комплексообразование с которым приводит к повышению его водорастворимости, но снижает биодоступность.

Выявлены различия фармакокинетических параметров и фармакологического эффекта комплексов арабиногалактана и динатриевой соли глицерризиновой кислоты с одним и тем же лекарственным средством. Для статинов было показано, что биодоступность и гипохолестеринемический эффект как симвастатина, так и аторвастина выше при использовании арабиногалактана в качестве носителя. В экспериментах с варфарином, относящегося ко 2 классу БФК и имеющего 100% биодоступность, установлено, что комплексообразование с АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ приводит к уменьшению его биодоступности в 4,2 раза в случае с АГ и проявление эффекта лишь через 54 часа после введения в случае с $\text{Na}_2\text{ГК}$.

При исследовании комплексов с празиквантелем впервые обнаружено, что при комплексообразовании с АГ происходит увеличение C_{\max} в 2,7 раза по сравнению с чистым ПЗК, а при комплексообразовании $\text{Na}_2\text{ГК}$ в 2,38 раза. Однако наибольшая концентрация ПЗК в органе-мишени печени достигается после введения ПЗК: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10, что может быть связано с мицеллярным строением супрамолекулярных комплексов ГК в водных растворах.

Впервые проведено изучение арабиногалактана, динатриевой соли глицерризиновой кислоты и их комплексов с ЛС *in vitro* на модели кишечного эпителия – клетках Caco-2, позволяющих моделировать абсорбцию ЛС через ЖКТ. Показано, что арабиногалактан увеличивает трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER), что является показателем адгезии к клеткам кишечного эпителия. Динатриевая соль глицерризиновой кислоты снижает этот параметр, что является дополнительным доказательством специфического воздействия ГК на структуру клеточной мембранны. Впервые на этой модели кишечного эпителия выявлен дополнительный к солюбилизации механизм повышения биодоступности лекарственных средств из комплексов-включений с арабиногалактаном и динатриевой солью глицерризиновой кислоты, заключающийся в ингибировании трансмембранных белка переносчика Р-

гликопротеина – одного из значимых барьеров на пути ЛС из ЖКТ в системный кровоток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработка эффективных способов доставки ЛС в организм человека, в том числе через ЖКТ, и повышение их биодоступности являются одновременно большой задачей, как для фармакологов, так и для химиков. В этом направлении ведутся исследования, по объему превышающие разработки абсолютно новых химических молекул-кандидатов в ЛС. Проведенное исследование позволило доказать эффективность нового простого способа получения комплексов-включений и использование растительных метаболитов АГ и Na₂ГК в качестве средств доставки, улучшающих биодоступность ЛС из разных фармакологических групп.

Полученные данные носят фундаментальный характер и представляют высокую научную и практическую ценность. Результаты раскрывают особенности фармакодинамики и фармакокинетики ЛС из комплексов-включений с АГ и Na₂ГК. В ходе исследований были выявлены различия влияния исследуемых метаболитов на клетки кишечного эпителия (Caco-2) и установлен дополнительный к солюбилизации механизм повышения биодоступности ЛС (ингибиование P-гликопротеина).

Полученные результаты могут быть рекомендованы для включения в учебные программы дипломной и последипломной подготовки фармакологов и фармацевтов.

Данные, полученные в настоящем исследовании, могут быть с успехом использованы в фармацевтической промышленности для создания новых лекарственных форм с улучшенной биодоступностью и сниженной эффективной дозой как для уже применяемых лекарственных средств, так и для новых лекарственных молекул с низкой растворимостью в воде и плохой биодоступностью.

По исследованной технологии получены комплексы-включения новых веществ, синтезированных в ФГБОУ ВО Волгоградский государственный технический университет, для проведения доклинических испытаний в Лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН.

Методология и методы исследования

Согласно поставленной цели и задачам выбраны методологически оправданные и информативные методы исследования. За методологическую основу взято «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», также в исследовании были использованы дополнительные экспериментальные подходы, направленные на углубленное исследование механизмов повышения биодоступности. Работа выполнена на базе Лаборатории фармакологических исследований ФГБУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук.

Исследование включает в себя изучение *in vivo* фармакодинамики и фармакокинетики комплексов ЛС различных фармакологических групп с растительными метаболитами АГ и Na₂ГК. Некоторые ЛС были изучены в комплексах с обоими метаболитами для выявления различий влияния «хозяина» на фармакологические свойства ЛС. *In vitro* были изучены особенности влияния АГ и Na₂ГК на клетки кишечного эпителия и трансмембранный белок-переносчик PgP.

Исследования *in vivo* выполнены на крысах сток Wistar, золотистых хомячках и мышах линий SD-1. Исследования *in vitro* выполнены на клеточных линиях Caco-2 и STO-TG-puro.

Положения, выносимые на защиту

1. Комплексообразование с АГ приводит к снижению эффективной дозы (нифедипин, ацетилсалicyловая кислота, напроксен, ибuproфен), повышению эффективности (альбендазол, аторвастатин, симвастатин) и

повышению биодоступности (нифедипин, ибuproфен, празиквантел, аторвастатин, симвастатин) ЛС из разных фармакологических групп, относящихся ко 2 классу БФК.

2. Комплексообразование с $\text{Na}_2\text{ГК}$ приводит к повышению биодоступности ЛС из разных фармакологических групп, относящихся ко 2 классу БФК (аторвастатин, симвастатин, празиквантел).

3. Комплексообразование с АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ приводит к уменьшению биодоступности ЛС, относящихся ко 2 классу БФК и имеющих 100% биодоступность (варфарин).

4. Увеличение биодоступности ЛС из комплексов с АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ происходит за счет увеличения их растворимости в воде, уменьшения влияния трансмембранных белков переносчиков Р-гликопротеинов, адгезии АГ к клеткам кишечного эпителия и влиянию $\text{Na}_2\text{ГК}$ на свойства клеточных мембран клеток кишечного эпителия.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки.

Основные положения работы доложены на научно-практической конференции «Фундаментальные науки-медицине» (Новосибирск, Россия, 2010), международной научно-практической конференции «“BIT’s 8th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology» (Пекин, Китай, 2010), международной научно-практической конференции «Innovation in Drug Delivery: From Preformulation to Development through Innovative Evaluation Process» (Экс-ан-Прованс, Франция, 2010), международной научно-практической конференции «3rd International Conference on Drug Discovery & Therapy» (Дубай, ОАЭ, 2011),

международной научно-практической конференции «3rd International conference 3d PharmSciFair» (Прага, Чехия, 2011), международной научно-практической конференции «Current Topics in Organic Chemistry» (Новосибирск, Россия, 2011), международной научно-практической конференции «2nd Int. Conf. on Pharmaceutics & Novel drug delivery systems» (Сан-Франциско, США, 2012), научно-практической конференции «Инновации в современной фармакологии» (Казань, Россия, 2012), международной научно-практической конференции «5th International Conference on Drug Discovery and Therapy» (Дубай, ОАЭ, 2013), международной научно-практической конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, Россия, 2013), международной научно-практической конференции «15th Tetrahedron Symposium Asia Edition» (Сингапур, 2014), международной научно-практической конференции «MedChem» (Новосибирск, Россия, 2015), международной научно-практической конференции «4th Conference on Innovation in Drug Delivery: Site- specific drug delivery» (Жуан-ле-пен, Франция, 2016), всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, Россия, 2017), международной научно-практической конференции «World congress on Pharmacology and Chemistry of Natural Compounds» (Тбилиси, Грузия, 2017), международной научно-практической конференции «2nd Edition of Global Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems» (Рим, Италия, 2018), международной научно-практической конференции «Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies» (Новосибирск, Россия, 2018).

Работа была поддержана грантом РФФИ № 12-04-31137 мол_а (2012-2013) «Исследование влияния комплексирования с растительными полисахаридами на физико-химические и фармакологические свойства лекарственных средств», стипендией Президента РФ молодым ученым и аспирантам 2013-2015 гг, грантом РФФИ № 17-43-540175 р_а (2017-2018) «Создание научных основ повышения эффективности лекарственных средств для лечения описторхоза» и выполнена рамках базовой программы В.48. «Фундаментальные физико-химические исследования механизмов физиологических процессов и создание на их основе

фармакологических веществ и лекарственных форм для лечения и профилактики социально значимых заболеваний» программы СО РАН V.48.1.5: «Развитие современных подходов к фармакологическим исследованиям перспективных для медицины агентов, полученных на основе целенаправленного органического синтеза».

По профилю диссертации опубликовано 28 работ, из них 2 главы в монографиях, 2 патента РФ и 24 полнотекстовых статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Личное участие автора

Автор принимал личное участие в проведении научно-исследовательской работы на всех этапах – от планирования до обсуждения результатов и публикации результатов научного исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования и двух глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 183 страницах машинописного текста, иллюстрирована 29 таблицами и 70 рисунками. Библиографические ссылки включают 265 источника, из которых 241 – публикации зарубежных авторов.

В диссертации использованы результаты кандидатской диссертации Борисова С.А., в части исследования комплексов АСК, ИБ, НАП с АГ, ввиду наличия совместных исследований и публикаций по данным исследованиям.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному консультанту д.б.н. проф. Т. Г. Толстиковой за неоценимую помощь в интерпретации полученных результатов и написании диссертационной работы. Автор благодарит

коллектив группы механохимии органических соединений ИХТМ СО РАН и лично руководителя. д.х.н проф. А. В. Душкина за синтез, физико-химические и фармакокинетические исследования супрамолекулярных комплексов. Автор благодарит д.м.н. Н. А. Жукову за помощь в проведении гистоморфологических исследований и интерпретации результатов и к.б.н. Т. С. Фролову за помощь в проведении исследований *in vitro*. Автор искренне признателен всем сотрудникам лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН за помощь в экспериментальной работе. Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории наночастиц (зав. д.х.н. А. А. Онищук) ИХКГ СО РАН за помощь в проведении фармакокинетических исследований ибuproфена. Автор выражает благодарность сотрудникам Лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ИЦИГ СО РАН, зав. лаб., д.б.н. Мордвинов В.А. за исследования комплекса с альбендазолом. Автор выражает благодарность к.х.н. А. А. Черноносову за помощь в проведении фармакокинетических исследований варфарина и нифедипина.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

До конца 19 века для борьбы с заболеваниями человек использовал в основном растения, которые применялись как целиком, так и отдельными частями (Lullmann H. et al., 2000). Очевидным недостатком такой терапии является одновременное попадание в организм большего количества разных химических веществ, которые помимо лечебного действия могут обладать и выраженными токсическими эффектами. Понимание этого факта привело в 19 веке – веке расцвета химии, к выделению индивидуальных молекул, обладающих биологической активностью. Яркими примерами таких веществ служат ацетилсалициловая кислота и парацетамол (Siepmann J. et al., 2012). Спустя 200 лет такой способ создания новых лекарственных веществ все еще актуален, наряду с более современными методами направленного синтеза. Открытые на заре фармакологии вещества все еще служат людям, являясь важными компонентами терапии многих заболеваний. Однако, с появлением индивидуальных веществ, обладающих определенным биологическим действием, вопрос токсических побочных эффектов остался актуальным. Только в отличие от растений, токсические действия индивидуальных химических веществ были обусловлены их собственными свойствами. Как правило, такие лекарства принимали в той форме, в которой они были синтезированы, как например кристаллический порошок ацетилсалициловой кислоты. Не потребовалось много времени, чтобы такой известный для нее побочный эффект, как ульцерогенная активность, манифестирувал у пациентов того времени. Описаны летальные случаи, вызванные прободением желудка после приема ацетилсалициловой кислоты (Yeomans N. D. et al., 2011; Hawthrone A.B. et al., 1991). Кроме побочных действий индивидуальные вещества могут иметь плохую растворимость в воде, иметь неприятный вкус и короткие сроки хранения, быть не стабильными и не удобными для приема больными и др. Все эти факторы потребовали создания лекарственных форм, которые учитывают все особенности того или иного

вещества, имеют строго определенную дозировку и именно их мы сегодня именуем «лекарством». Не смотря на выраженный прогресс в создании лекарств, проблему токсических побочных действий не удалось до конца решить и в настоящее время.

В течение 19го и 20го века было создано и допущено до клинического применения большое количество лекарственных средств, практически по всем существующим нозологиям. Перечень лекарств, имеющихся в распоряжении современной медицины, насчитывает тысячи наименований (www.rls.ru). Разработка новых лекарственных молекул становится очень дорогим процессом, занимающим также значительное количество времени проходящего от синтеза такой молекулы до внедрения ее в медицинскую практику (DiMasi J. A. et al., 2003). В сложившейся ситуации на передний план выходят новые подходы, модифицирующие как физико-химические, так и фармакологические свойства хорошо известных лекарственных веществ (Tiwari G. et al., 2012). Основными целями таких модификаций является повышение эффективности и безопасности ЛС. Как известно, многие ЛС плохо растворимы в воде и это является ограничением для их более широкого клинического применения. Согласно Биофармацевтической Системе Классификации, такие ЛС относятся ко 2му Классу (плохая растворимость в воде/хорошая проницаемость) или к 4му Классу (плохая растворимость в воде/плохая проницаемость) веществ (Amidon G. L. et al., 1995). Используя различные подходы у таких ЛС можно повысить растворимость в воде, не изменяя при этом их липофильных свойств, а это в итоге приведет к их лучшей проницаемости через биологические мембранны. К таким подходам относятся: уменьшение размера частиц, образование солей и твердых дисперсий, экструзия расплавов, сушка распылением, комплексобразование, образование микроэмulsionей, липосом и применение не водных растворителей (Loftsson T. et al., 2005). Разрабатываемые новые формы доставки способны улучшать биодоступность, замедлять или регулировать высвобождение ЛС, доставлять их более целенаправленно к органам-мишеням независимо от способа введения.

Таблица 1 – Биофармацевтическая классификация ЛС, при пероральном введении (Amidon G. L. et al., 1995).

Класс	Растворимость в воде	Проницаемость через липофильтрующую мембрану
I	Высокая	Высокая
II	Низкая	Высокая
III	Высокая	Низкая
IV	Низкая	Низкая

Пути введения ЛС в организм можно разделить на интраваскулярный и экстраваскулярный. При первом способе введения, ЛС полностью попадает в кровоток через вену или артерию и его биодоступность составляет 100%. В данном случае основным требованием к веществу является хорошая растворимость в воде. Экстраваскулярный способ введения включает в себя следующие пути: оральный, сублингвальный, трансбукиальный, внутримышечный, подкожный, кожный, ингаляционный, ректальный и трансорбитальный. Во всех этих случаях для проникновения в кровоток, ЛС должно абсорбироваться из места введения. Чаще всего под этим процессом понимают транспорт молекул ЛС через различные мембранны и полости, которые все вместе составляют «функциональную» макроскопическую мембрану. Примерами таких барьеров служат клетки и межклеточное пространство между просветом кишечника/желудка и капиллярной кровью, кожа. Каждый из компонентов такой мембранны в той или иной степени влияет на транспорт ЛС и может ограничивать скорость всего процесса абсорбции. Большинство ЛС проникают через мембранны путем пассивной диффузии, естественного процесса при котором молекулы перемещаются по градиенту концентрации и не требуют затраты энергии на такое перемещение. Таким образом, чем выше концентрация молекул ЛС в месте абсорбции, тем больше молекул достигнет кровотока. Некоторые ЛС легко проникают через мембрану, а некоторые с трудом. Это зависит от степени мембранный проницаемости конкретной лекарственной

молекулы. Основными факторами, влияющими на проницаемость, являются молекулярная масса молекулы, ее липофильность и заряд. Комбинация этих трех свойств является определяющей при преодолении мембранных барьеров *in vivo*. Так, маленькая липофильная не заряженная лекарственная молекула гораздо легче преодолеет клеточную мембрану, чем большая гидрофильная и имеющая заряд (Katzung B. G. et al., 2015). Кроме свойств самой молекулы очень большой вклад в абсорбцию ЛС вносят свойства самой мембраны, а именно ее толщина. Под этой величиной понимают расстояние, которое необходимо преодолеть молекуле от места всасывания до кровеносного капилляра. Чем короче это расстояние, тем выше проницаемость. Толщина мембран может варьировать в широком диапазоне от 0,005 до 0,01 мкм у клеточных мембран и до нескольких миллиметров на некоторых участках кожного покрова. Помимо собственно мембраны, в структуре барьера преодолеваемого молекулами ЛС при абсорбции, практически всегда присутствует вода. На структуру воды на поверхности мембраны сильно влияет способность поверхности образовывать водородные связи с молекулами воды. В сущности, ни одна молекула не адсорбируется на поверхности графита, поскольку он является абсолютно гидрофобным. Самоассоциация молекул воды в этом случае значительно сильнее, чем взаимодействие с гидрофобной поверхностью. Этот феномен аналогичен гидрофобному эффекту, который наблюдается при растворении не полярных растворителей в воде. Тогда как при контакте воды с гидрофильными поверхностями, например материалами на основе кремния, происходит формирование водной пленки, в которой водородные связи между молекулами воды частично замещаются связями между молекулами воды и поверхностью. В результате этих связей более чем на порядок происходит снижение подвижности молекул воды непосредственно адсорбированных на поверхности. Такой водный слой в толщину не превышает пары молекул воды. На клеточных мембранах молекулы воды связаны с фосфолипидами, белками и другими структурными элементами, что в результате приводит к наличию водного слоя толщиной около 1 нм, называемого также неподвижным водным слоем (UWL – unstirred water

layer). В случае слизистого эпителия, содержащего слизистые клетки, которые продуцируют слизь – гелеобразную жидкость, состоящую из воды (~95%) и муцина, толщина НВС может быть значительно больше и доходить до 100 мкм. В качестве примера можно привести слизистые слои желудочно-кишечного тракта, дыхательного тракта, областей носоглотки и гортани, а также репродуктивных органов. В условиях *in vitro*, в отсутствии движения толщина НВС может быть гораздо большей даже при отсутствии слизи. Таким образом, наряду с наличием собственно клеточной мембранны, структуры воды на ее поверхности могут иметь значительное влияние на проявление ЛС своего биологического эффекта, в том числе и на способности проникать через различные мембранные барьеры (Loftsson T. et al., 2007).

Одним из перспективных направлений для улучшения биодоступности ЛС является создание водорастворимых супрамолекулярных комплексов-включений по типу «гость-хозяин», где в качестве «хозяина» выступают различные вещества, способные к образованию липофильных полостей, а в качестве «гостя» используют уже зарегистрированные лекарственные молекулы. Как правило, между молекулами ЛС и молекулами «гостя» не образуется ковалентных связей, а лишь водородные и Ван-дер-вальсовые взаимодействия. Такая слабая связь не требует больших затрат энергии на высвобождение молекулы ЛС из молекулы «хозяина», тем самым обеспечивается быстрая диссоциация таких систем с последующей абсорбцией ЛС. В качестве «хозяина» могут быть использованы вещества природного и не природного происхождения: полисахариды, полимеры, липосомы, наносферы, микросферы, мицеллы (Arima H. et al., 2015). Все вещества, используемые для доставки ЛС в живой организм должны быть не токсичными, биосовместимыми и биодеградируемыми и не вызывать иммунного ответа (Bonnet V. et al., 2015).

Среди всех природных полимеров полисахариды являются наиболее интересными в качестве носителей ЛС ввиду своей биосовместимости, биодеградируемости, гидрофильности, хорошей стабильности, безопасности, не токсичности и адгезивным свойствам (Liu Z. et al., 2008).

1.1. Циклодекстрины.

ЦД были впервые открыты более 100 лет назад (Lakkakula R. J. et al., 2014). Однако, только лишь недавно они стали доступны в виде очищенных фармацевтических субстанций. К настоящему времени, на мировом фармацевтическом рынке доступно более 30 продуктов, содержащих ЦД. Фармацевтическая индустрия в основном использует ЦД в качестве комплексирующего агента для повышения водорастворимости плохо растворимых ЛС, повышения их биодоступности и стабильности. На фармацевтическом рынке представлено большое количество готовых лекарственных препаратов с использованием ЦД (таблица 1). Кроме этого, ЦД могут быть использованы для снижения ульцерогенного эффекта ЛС, превращения жидкого ЛС в микрокристаллический или аморфный порошок, для предотвращения лекарственного взаимодействия, доставки нуклеиновых кислот, пептидов, гормонов, кислорода (Lakkakula R. J. et al., 2014; Cometti B. 2015).

ЦД это природные циклические олигосахариды с гидрофильной внешней поверхностью и липофильной центральной полостью. Они состоят из (α -1,4)-связанных α -D-глюкопиранозных единиц. В результате взаимодействия этих единиц между собой формируется структура, напоминающая усеченный конус, в котором вторичные гидрокси группы выступают наружу в более широкой части, а первичные гидрокси группы в узкой.

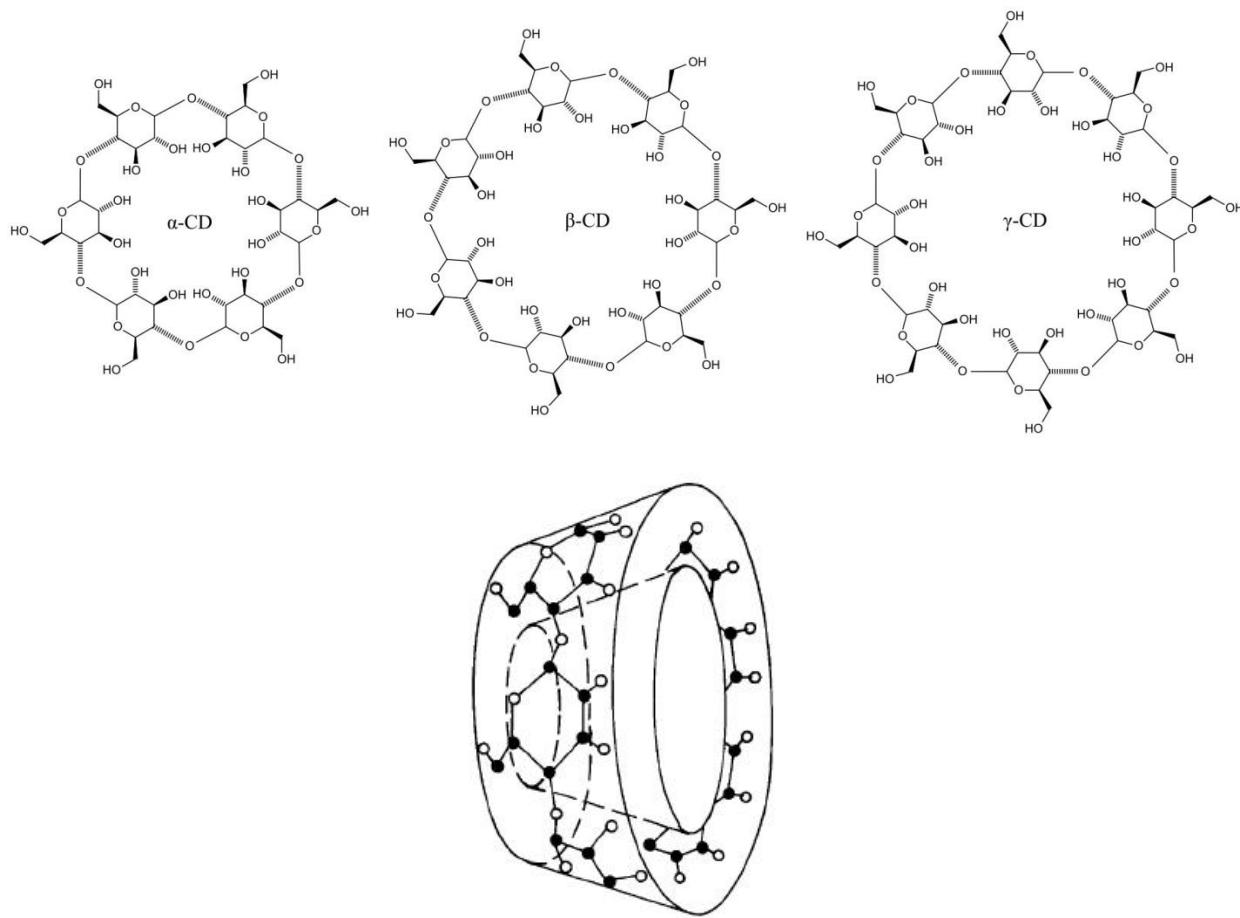
Такое строение обеспечивает гидрофильность внешней поверхности, тогда как липофильность внутренней полости сравнима с водным раствором этанола (Frömming K.-H. et al., 1994). Наиболее часто встречающиеся природные ЦД состоят из 6 (α -циклодекстрин), 7 (β -циклодекстрин) и 8 (γ -циклодекстрин) глюкопиранозных единиц. Несмотря на то, что природные ЦД и их комплексы гидрофильны, их растворимость в воде весьма ограничена, особенно это характерно для β -циклодекстрина.

Таблица 2 – Готовые лекарственные препараты с использованием ЦД
(Loftsson T. et al., 2010)

ЛС/Циклодекстрин	Торговое наименование	Форма выпуска	Компания (страна)
<i>α-Cyclodextrin (αCD)</i>			
Alprostadil	Caverject Dual	Intravenous solution	Pfizer (Europe)
Cefotiam-hexetil HCl	Pansporin T	Tablet	Takeda (Japan)
Limaprost	Opalmon	Tablet	Ono (Japan)
PGE1	Prostavastin	Parenteral solution	Ono (Japan); Schwarz (Europe)
<i>β-Cyclodextrin (βCD)</i>			
Benazeate HCl	Ulgut, Lonmiel	Capsule	Teikoku (Japan); Shionogi (Japan)
Cephalosporin	Meiact	Tablet	Meiji Seika (Japan)
Cetirzine	Cetrizin	Chewable tablet	Losan Pharma (Germany)
Chlordiazepoxide	Transilium	Tablet	Gador (Argentina)
Dexamethasone	Glymesason	Ointment, tablet	Fujinaga (Japan)
Dextromethorphan	Rynathisol	Synthelabo (Europe)	
Diphenhydramine and chlortheophylline	Stada-Travel	Chewable tablet	Stada (Europe)
Ethinylestradiol and drospirenone	Yaz	Tablet	Bayer (Europe, USA)
Iodine	Mena-Gargle	Solution	Kyushin (Japan)
Meloxicam	Mobitil	Tablet and suppository	Medical Union (Egypt)
Nicotine	Nicorette	Sublingual tablet	Pfizer (Europe)
Nimesulide	Nimedex	Tablets	Novartis (Europe)
Nitroglycerin	Nitropen	Sublingual tablet	Nihon Kayaku (Japan)
Omeprazole	Omebeta	Tablet	Betafarm (Europe)
PGE2	Prostarmon E	Sublingual tablet	Ono (Japan)
Piroxicam	Brexin, Flogene, Cicladon	Tablet, suppository	Chiesi (Europe); Aché (Brazil)
Tiaprofenic acid	Surgamyl	Tablet	Roussel-Maestrelli (Europe)
<i>2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD)</i>			
Cisapride	Propulsid	Suppository	Janssen (Europe)
Indometacin	Indocid	Eye drop solution	Chauvin (Europe)
Itraconazole	Sporanox	Oral and intravenous solution	Janssen (Europe, USA)
Mitomycin	MitoExtra, Mitozytrex	Intravenous infusion	Novartis (Europe)
<i>Sulfoxylether β-cyclodextrin sodium salt (SBEβCD)</i>			
Aripiprazole	Abilify	Intramuscular solution	Bristol-Myers Squibb (USA); Otsuka Pharm. (USA)
Maropitant	Cerenia	Parenteral solution	Pfizer Animal Health (USA)
Voriconazole	Vfend	Intravenous solution	Pfizer (USA, Europe, Japan)
Ziprasidone mesylate	Geodon, Zeldox	Intramuscular solution	Pfizer (USA, Europe)
<i>Randomly methylated β-cyclodextrin (RMβCD)</i>			
17β-Estradiol	Aerodiol	Nasal spray	Servier (Europe)
Chloramphenicol	Clorocil	Eye drop solution	Oftalder (Europe)
<i>γ-Cyclodextrin (γCD)</i>			
Tc-99 Teboroxime ^a	CardioTec	Intravenous solution	Squibb Diagnostics (USA)
<i>2-Hydroxypropyl-γ-cyclodextrin (HPγCD)</i>			
Diclofenac sodium salt	Voltaren Ophtha	Eye drop solution	Novartis (Europe)
Tc-99 Teboroxime ^a	CardioTec	Intravenous solution	Bracco (USA)

Считается, что этому способствуют достаточно сильные связи между молекулами ЦД в кристаллическом состоянии (Loftsson T. et al., 1996). Произвольное замещение гидрокси групп, даже на гидрофобные остатки, например метокси-группы, приводит к значительному улучшению их растворимости в воде. Основной причиной улучшения растворимости после такого замещения является превращения кристаллического ЦД в аморфную смесь изомерных производных.

Рисунок 1 – Структура циклодекстринов.



Основными производными ЦД, представляющими интерес для фармацевтической индустрии являются: гидроксипропил производные β - и γ -циклогексстринов, произвольно метилированный β -циклогексстрин, сульфобутилэфир β -циклогексстрина и, так называемые, разветвленные ЦД, как глюкозил- β -циклогексстрин (Loftsson T. et al., 2005).

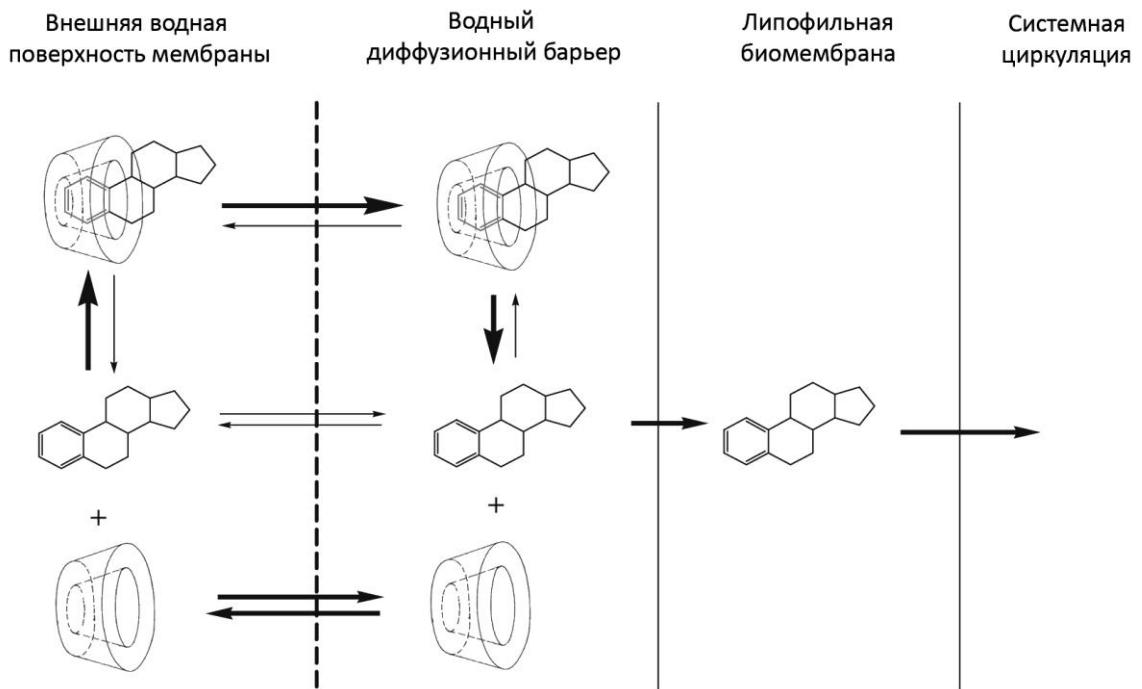
Молекулы ЦД имеют достаточно большой размер (молекулярный вес находится в диапазоне от 1000 до 2000 Даальтон) с большим количеством доноров и акцепторов водорода и, вследствие этого, плохо абсорбируются через биологические мембранны. В отличие от γ -циклогексстрина, природные α - и β -циклогексстрин не гидролизуются человеческой слюной и амилазами поджелудочной железы (Evaluation of certain food additives and contaminants 2002), но все три подвергаются ферментации кишечной микрофлорой. Природные и химически модифицированные ЦД, не токсичны, так ЛД₅₀ для β -циклогексстрина

при пероральном введении мышам, крысам и собакам превышает 12,5, 18,8 и 5 г/кг, соответственно (Irie T. et al., 1997). Однако, β -цикодекстрин способен ингибировать амилазы млекопитающих, тем самым превращая перевариваемые крахмалы в не перевариваемые вещества. Согласно проведенным в течение 52 недель исследованиям, были установлены предельные дозировки для крыс и собак, безопасные для ежедневного введения: <600 мг/кг и <1800 мг/кг, соответственно (Bellringer M. E. et al., 1995). Гидроксипропил-замещенный β -цикодекстрин был изучен в ходе клинических испытаний, где было установлено, что в дозах 16-24 г в день *per os* он вызывает диарею. На основании этих данных было рекомендовано не превышать суточную дозу в 16 грамм (Irie T. et al., 1997). Природные ЦД и их производные используются в составе средств для местного и перорального применения, но лишь α -цикодекстрин и гидрофильные производные β - и γ -цикодекстринов могут быть введены в состав парентеральных лекарственных форм. γ -цикодекстрин в водных растворах образует видимые агрегаты и, тем самым, становится не пригодным для парентерального использования (Szente L. et al., 1998). β -ЦД не может быть использован для парентеральных лекарственных форм ввиду своей нефротоксичности. Липофильные производные ЦД, как например метилированные ЦД, в некотором количестве абсорбируются из ЖКТ в системный кровоток и, как было показано авторами (Irie T. et al., 1997), являются токсичными при парентеральном введении. В настоящее время пероральное применение метилированного β -ЦД ограничено его возможными токсическими эффектами. Все три природных ЦД включены в национальные фармакопеи США, ЕС, а также одобрены FDA (food and drug administration, США) в качестве пищевых добавок.

В водных растворах ЦД способны образовывать комплексы-включения с различными ЛС путем захвата во внутреннюю полость молекулы ЛС или, чаще всего, некоторой липофильной ее части. В процессе такого комплексообразования не происходит формирования или разрушения ковалентных связей. Молекулы ЛС

в таком комплексе находятся в быстром равновесии со свободными молекулами в растворе.

Рисунок 2 – Механизм увеличения биодоступности ЛС из комплекса с ЦД (Loftsson T. et al., 2005).



Движущие силы комплексообразования включают в себя высвобождение из внутренней полости ЦД молекул воды, богатых энталпийей; электростатические взаимодействия; ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия; водородные связи; высвобождение конформационной цепи и перенос заряда (Loftsson T. et al., 1996; Liu L. et al., 2002). Чаще всего циклодекстрины образуют комплексы с соотношением молекул ЛС к молекулам ЦД равным 1:1, однако, могут формироваться и комплексы с соотношением 1:2 (Brewster M. E. et al., 1999). Для получения комплексов ЛС:ЦД применяются различные методы: растворение, копреципитация, нейтрализация, сус펜дирование, перемешивание и перемалывание (Hirayama F. et al., 1987; Hedges A. R. et al., 1998). В большинстве случаев для успешного получения комплексов необходимо наличие некоторого количества воды. В растворе комплексы обычно получают путем добавления избытка ЛС к водному раствору ЦД. Полученная суспензия

уравновешивается при определенной температуре (в течение 1 недели или меньше) и затем фильтруется/центрифугируется для получения чистого раствора ЛС:ЦД. Для получения комплекса в твердой форме, вода из водного раствора комплекса удаляется испарением (например, сушка распылением) или сублимацией (например, лиофилизацией). По разным причинам, как например, соблюдение изотонических свойств растворов для парентерального введения или общего объема твёрдых лекарственных форм, необходимо как можно в меньшем количестве включать ЦД в готовую ЛФ. Применяются различные методы для улучшения эффективности комплексообразования (Loftsson T. et al., 1999б; Loftsson T. et al., 2012). К ним относятся добавление полимеров в комплексообразующую среду (Loftsson T. et al., 2004), ионизация ЛС, образование солей (Krishnamoorthy R. et al., 1996; Redenti E. et al., 2001), добавление к среде гидрокси карбоксиловых кислот (Redenti E. et al., 2000), летучих кислот или оснований (Loftsson T. et al., 2004б), органических солей (Loftsson T. et al., 2003а), и косольвентов (Li P. et al., 1998). Однако, даже в идеальных условиях, комплексообразование с ЦД приводит к четырехкратному увеличению массы твердой лекарственной формы (Loftsson T. et al., 1999б).

Химическая структура ЦД (например, большое количество доноров и акцепторов водорода), их молекулярная масса и очень низкий коэффициент распределения в смеси октанол/вода (приблизительно, $\log P_{\text{o/w}}$ находится в диапазоне от -3 до 0) не способствуют легкому проникновению через биологические мембранны (Amidon G. L. et al., 1995; Lipinski C. A. et al., 2001). Экспериментально было установлено, что лишь незначительное количество гидроильных ЦД и ЛС:ЦД комплексов способны проникать через такие липоильные мембранны, как кожа и слизистая ЖКТ (Irie T. et al., 1999). Свободно проникать через биологические мембранны могут лишь свободные молекулы ЛС, находящиеся в равновесии с комплексом ЛС:ЦД (Uekama K. et al., 1998). Как правило, ЦД не усиливают проницаемость гидроильных водорастворимых ЛС через липоильные биологические мембранны, а избыток ЦД приводит к ухудшению проницаемости ЛС через мембранию (Loftsson T. et al., 2001б; Loftsson

Т. et al., 2003б). Будут ЦД усиливать или ухудшать проницаемость ЛС через биологическую мембрану зависит от физико-химических свойств ЛС (например, растворимость в воде), состава лекарственной формы (например, водная или не водная) и физиологического строения мембранных барьера (например, наличие водного диффузионного слоя). Большинство биологических мембран являются липофильными с внешней водной поверхностью, которая формирует структурированный водный слой на поверхности мембраны. В случае, если для абсорбции ЛС наличие такого слоя является ограничивающим фактором, ЦД способны усилить их проницаемость. Однако, в большинстве случаев, ЦД не способны усиливать проницаемость ЛС через липофильный мембранный барьер, а избыток ЦД приводит к нарушению абсорбции (Loftsson T. et al., 2003б). Из этого правила есть одно исключение, липофильные ЦД, как например метилированные β -ЦД, способны проникать через слизистую (например, полости носа) и улучшать абсорбцию ЛС путем ослабления барьерной функции биологической мембраны (Marttin E. et al., 1998). Таким образом, необходимо строго контролировать количество ЦД в лекарственной форме, поскольку их избыток или недостаток может повлиять на оптимальную биодоступность ЛС (Loftsson T. et al., 2005).

Пероральные лекарственные формы с ЦД.

Наиболее удобными ЛФ для человека являются те, которые применяются перорально. При таком способе введения достигается максимальный комплаенс и комфорт больных, принимающих ЛС (Dhirendra K. et al., 2009; Sharma N. et al., 2016). В случае с ЦД этот путь также занимает лидирующее место. Как правило, гидрофильные ЦД не улучшают биодоступность ЛС, относящихся к I классу БФК (Amidon G. L. et al., 1995). Однако, ЦД могут быть использованы для уменьшения локальных побочных действий и повышения степени абсорбции ЛС. Для веществ II класса характерно ограниченная растворимость в воде и высокая проницаемость через биологические мембранные, в этом случае водорастворимые комплексы ЛС/ЦД будут улучшать диффузию ЛС через водный слой, и повышать

их абсорбцию слизистой ЖКТ. Таким образом, комплексирование ЛС этого класса с ЦД приведет к улучшению их биодоступности. На биодоступность веществ, относящиеся к III классу БФК, комплексирование с ЦД не оказывает значительного влияния. ЛС из IV класса не растворимы в воде и с трудом проникают через липофильные биологические мембранны. Такими примерами могут служить относительно большие липофильные молекулы. В случае комплексирования таких веществ с ЦД возможно улучшения их растворимости в воде и, как следствие, повышение биодоступности. Помимо средств уже выведенных на фармацевтический рынок, не прекращается работа по получению новых супрамолекулярных комплексов ЦД с другими ЛС: позаконазол с β -ЦД и 2,6-ди-О-метил- β -ЦД (Tang P. et al., 2016), рокситромицин с β -ЦД и гидроксипропил β -ЦД в составе наночастиц из поли лакто-ко-гликолевой кислоты (PLGA) (Masood F. et al., 2016), ралоксилен с гидроксипропил β -ЦД в виде сухой суспензии (Lu R. et al., 2015), телмисартан с β -ЦД (Aline P. et al., 2015), норфлоксацин с β -ЦД (Mendes C. et al., 2015).

Подъязычные лекарственные формы с ЦД.

Подъязычный путь введения ЛС, является одним из самых эффективных способов избежать эффекта первого прохождения в печени (Harris D. et al., 1992). Однако, для того чтобы проникнуть в системный кровоток, ЛС сначала должно раствориться в слюне. В ротовой полости содержится не большое количество слюнной жидкости и поэтому это накладывает ограничение на величину терапевтической дозы, она не может быть большой. Кроме этого в таких ЛФ, как правило, применяют различные усилители растворимости.

Для различных липофильных ЛС было показано, что комплексирование с ЦД приводит к повышению их биодоступности. В качестве примера можно привести комплексирование 2-гидроксипропил- β -циклогексстраина с 17 β -эстрадиолом, андростендиолом, кломипрамином и даназолом (Hoon T. J. et al., 1993; Friðriksdóttir H. et al., 1996; Brown G. A. et al., 2002; Yoo S. D. et al., 1999; Badawy S. I. F. et al., 1996). В большинстве случаев, наблюдаемое увеличение

биодоступности ЛС в комплексах с ЦД было результатом повышения их растворимости в воде и скорости растворения. Однако, нельзя исключать непосредственного воздействия ЦД на слизистую полости рта в качестве усилителя проницаемости. С точки зрения токсикологии, ЦД в виде подъязычной ЛФ очень близок к пероральной форме, поскольку его большая гидрофильная молекула не проникает через слизистую полости рта, а проглатывается и поступает в ЖКТ. Для применения ЦД в подъязычных ЛФ существует одно ограничение, оно связано с объемом конечной композиции. Ярким примером этому служит разработка комплекса Δ^9 -тетрагидроканнабинола с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином. Терапевтической дозой Δ^9 -тетрагидроканнабинола является 1 мг, для образования водорастворимого комплекса с таким количеством фармакона потребовалось 400 мг 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, что является чрезмерным количеством для сублингвального введения. Однако, при использовании другого ЦД – частично метилированного β -циклодекстрина, удалось снизить массу ЛФ до 25 грамм, что позволило создать сублингвальную форму Δ^9 -тетрагидроканнабинола (Järvinen T. et al., 2003).

Назальные лекарственные формы с ЦД

Назальный путь введения ЛС, является еще одним способом избежать эффекта первого прохождения через печень (Behl C. R. et al., 1998). Как при пероральном или сублингвальном способах введениях для попадания в системный кровоток молекулы ЛС должны быть растворены в водосодержащих жидкостях носовой полости. ЦД применяются для улучшения растворения липофильных ЛС в таких жидкостях. Однако, липофильные ЦД могут взаимодействовать с биологической мембраной, усиливая при этом проницаемость комплексируемых молекул, в особенности пептидов (Marttin E. et al., 1998). Для назальной доставки ЛС чаще всего используют метилированные циклодекстрины, поскольку установлено, что они обладают выраженным свойством усиливать абсорбцию (Merkus F. W. H. M. et al., 1999). Первые ЛФ для

назального введения на основе ЦД содержали стероидные гормоны и пептиды (Irie T. et al., 1992; Hermens W. A. et al., 1990; Matsubara K. et al., 1995; Kublik H. et al., 1996). Были получены многообещающие результаты, как, например, в композициях, содержащих производные метилированных ЦД, где удалось в три раза повысить биодоступность прогестерона по сравнению с его суспензией (Schipper N. G. et al., 1990). В экспериментах на крысах было установлено, что биодоступность инсулина возросла с 0 до 100% после его введения в комплексе с метилированными ЦД (Merkus F. W. et al., 1991). Однако, при последующих клинических исследованиях была обнаружена более низкая биодоступность инсулина при интраназальном введении в виде комплекса с ЦД, что подтверждает известный факт о значительных видовых различиях такого способа введения ЛС (Merkus F. W. H. M. et al., 1999). Другими примерами успешного использования ЦД при интраназальном введении служат комплексы с дигидроэрготамином, мидазоламом, ацикловиром и низкомолекулярными гепаринами (Marttin E. et al., 1997; Loftsson T. et al., 2001a; Chavanpatil M. D. et al., 2004; Yang T. et al., 2004). Как и в случае с сублингвальным введением, ЦД после интраназального введения с помощью реснитчатого эпителия попадают в ЖКТ, поэтому местный раздражающий эффект практически отсутствует. При сравнении влияния диметил-β-ЦД и других агентов для улучшения интраназальной абсорбции, как, например, бензалкониум хлорида, на частоту движения ресничек реснитчатого эпителия носовой полости *in vitro*, было установлено, что ЦД в меньшей степени влияет на этот физиологический процесс (Romeijn S. G. et al., 1996). Ограничением для использования ЦД в виде назальных ЛФ является объем жидкости равный 25-150 мкл., которой может быть распылен в каждый носовой ход (Behl C. R. et al., 1998). На сегодняшний день существует коммерческий продукт – Aerodiol, выпускаемой фирмой Servier (Франция), который представляет собой спрей, состоящий из эстрадиола, растворенного в растворе частично метилированного β-ЦД (Loftsson T. et al., 2005).

Ингаляционный способ доставки ЛС с ЦД

Чаще всего, ингаляционный способ доставки ЛС применяется для терапии легочных заболеваний, как например бронхиальной астмы, хронического обструктивного бронхита и др. (Washington N. et al., 2001). Однако, такой путь введения является перспективным и для системного введения ЛС, поскольку он лишен эффекта первого прохождения через печень и разрушения ЛС в просвете ЖКТ. Легкие обладают огромной поверхностью, плотно окутанной капиллярной сетью, при этом в легких крайне слабо выражена ферментативная активность. Основным ограничением для ЛС при таком способе введения служит низкая растворимость и скорость растворения в воде. Нерастворимые частицы выводятся из легких при помощи мукоцилиарного транспорта в верхних отделах дыхательных путей и при помощи макрофагов в альвеолах (Washington N. et al., 2001). В случае ингаляционного введения, применение ЦД аналогично описанным выше сублингвальному и назальному, а именно, для улучшения стабильности, растворимости и скорости растворения в воде нерастворимых и химически не стабильных ЛС. В конечном итоге это приведет к уменьшению клиренса, повышению абсорбции и более быстрому наступлению терапевтического эффекта. Кроме этого, при комплексообразовании с ЦД возможно перевести жидкое ЛС в твердую форму, два несовместимых ЛС можно смешать в одной порошкообразной ЛФ, уменьшить неприятные органолептические свойства, а также снизить местное раздражающее действие ЛС на легкие.

Абсорбция ЦД из легких происходит заметно лучше, чем из ЖКТ, что накладывает ограничения на тип ЦД, который можно безопасно использовать. Как правило, те ЦД, которые допущены для парентерального введения, можно использовать и для ингаляционного (Irie T. et al., 1997; Cabral Marques H. M. et al., 1991). Наиболее безопасными для парентерального использования считаются γ -ЦД, 2-гидрокиспропил- β -ЦД и сульфобутилэфир β -ЦД. Для ингаляционной доставки ЛС в виде комплекса с ЦД используют порошковые ингаляторы, в которых дозированный порошок выделяется после прокалывания специальной капсулы (Prime D. et al., 1997). Существует ряд коммерчески доступных ингаляторов:

Diskhaler (GlaxoSmithKline), в нем повышенено количество вдыхаемого сальбутамола за счет его комплексообразования с γ -ЦД и диметил- β -ЦД; Microhaler (GlaxoSmithKline), в нем повышена вдыхаемая фракция беклометазона дипропионата за счет комплексообразования с 2-гидроксипропил- β -ЦД (Leite Pinto J. M. et al., 1999). Кроме этого, отмечено, что в присутствии различных ЦД увеличивается абсорбция ЛС введенных интратрахеально (Shao Z. et al., 1994; Shao Z. J. et al., 1996; Wall D. A. et al., 1994).

Инъекционные лекарственные формы с ЦД

Инъекционные ЛФ липофильных не растворимых в воде ЛС обычно состоят из смеси воды, органических ко-сольвентов и сурфактантов. Для применения органических растворителей существуют ограничения, которые включают в себя выпадения осадка ЛС, боль при введении, вероятность развития воспаления и гемолиза после инъекции (Strickley R. G. et al., 2004). В некоторых случаях для предотвращения подобных побочных действий возможно создание водорастворимого пролекарства, которое хорошо растворяется в воде и не требует наличия дополнительных органических растворителей. Отрицательной стороной в этом случае может служить изменение фармакокинетики самого ЛС, поскольку будет требоваться дополнительное время для перехода пролекарства в фармакологически эффективную форму (Loftsson T. et al., 1991; Dietzel K. et al., 1990). Применение ЦД (2-гидроксипропил- β -ЦД и сульфобутилэфир β -ЦД) в инъекционных ЛФ может служить заменой органическим растворителям, сурфактантам и пролекарствам. Помимо очевидного снижения вероятных побочных эффектов от растворителей, применение ЦД не влечет за собой изменения фармакокинетики ЛС, что было показано в ряд исследований (Rajewski R. A. et al., 1996; Stella V. J. et al., 1997). После парентерального введения, и в особенности после внутривенного, молекулы ЛС быстро и количественно высвобождаются из комплекса с ЦД посредством разбавления, конкурентного замещения и связывания молекул ЛС с белками плазмы крови и тканями (Washington N. et al., 2001). Однако, поскольку ЦД быстро выводятся почками они

могут способствовать также и быстрой элиминации липофильных не растворимых в воде молекул ЛС (Stella V. J. et al., 1999).

Глазные лекарственные формы с ЦД

Для офтальмологии наиболее предпочтительными являются ЛФ в виде водных капель с низкой вязкостью. Внешний слой роговицы глаза является липофильным эпителием, что влечет необходимость наличия липофильных свойств у ЛС для проникновения через этот биологический барьер внутрь глаза. Однако, на поверхности роговицы присутствует водный слой толщиной около 8 мкм и для преодоления этого диффузационного барьера на пути к роговице необходимо чтобы ЛС было растворимо в воде (Washington N. et al., 2001). Кроме этого, только одна капля объемом 0,03-0,05 мл может быть одновременно нанесена на поверхность глаза, большие объемы жидкости быстро отводятся от глаза через носослезный канал или непосредственно на кожу лица. Другим фактором, ограничивающим абсорбцию ЛС, является постоянное выделение слезной жидкости, которая разбавляет и смывает ЛС с поверхности глаза, тем самым уменьшая время его контакта с поверхностью роговицы. Полное вымывание ЛС с глазной поверхности происходит за 5-6 минут. Кроме этого, слезная жидкость содержит белки и муцины, которые могут связываться с молекулами ЛС и препятствовать их проникновению через роговицу (Achouri D. et al., 2013). В совокупности, описанные физиологические особенности глаза приводят к тому, что лишь <5% ЛС нанесенного местно на поверхность глазного яблока абсорбируются внутрь (Urtti A. et al., 1993; Loftsson T. et al., 1999a; Fangueiro J. F. et al., 2016). При использовании ЦД как солюбилизатора, возможно увеличить растворимость в воде и перейти на местное применение таких ЛС, которые до этого применялись только системно (Loftsson T. et al., 1999a; Loftsson T. et al., 2002). Примером этому служит ацетазоламид, который избирательно ингибит карбоангидразу и используется перорально в дозе 1000 мг для лечения глаукомы. Его растворимость в воде составляет 0,7 мг/мл, тогда как в 20% водном растворе 2-гидроксипропил-β-ЦД возрастает до 7 мг/мл. Такое

значительное увеличение растворимости может быть использовано для создания глазных капель с этим ЛС (Loftsson T. et al., 1994). Кроме этого, ЦД используют для уменьшения раздражающего действия ЛС на глаз и для повышения химической стабильности ЛС, входящих в водные глазные ЛФ (Loftsson T. et al., 1999a; Suhonen P. et al., 1995; Zhang Z. et al., 2016). В некоторых случаях для стабилизации супрамолекулярных комплексов с ЦД, например γ -ЦД и 2-гидроксипропил- γ -ЦД, используют полоксамер 407, который также способствует более медленному высвобождению молекул ЛС из образуемых агрегатов (Jansook P. et al., 2016). В настоящее время зарегистрировано несколько глазных капель с использованием ЦД: Clorocil®, Edol (хлорамфеникол), Voltaren Ophthalmic®, Novartis (диклофенак), Indocid®, Merck Sharp & Dohme-Chibret (индометацин) (Achouri D. et al., 2013).

Лекарственные формы для местного нанесения на кожу с ЦД.

Считается, что основным барьером на пути абсорбции ЛС через кожные покровы является самый внешний слой кожи – роговой слой эпидермиса. Усилители проницаемости, применяемые в ЛФ для местного нанесения на кожу, как, например, жирные кислоты или спирты, проникают внутрь этого слоя и временно снижают его барьерные свойства. Гидрофильные ЦД не проникают в роговой слой и не оказывают влияние на его защитные свойства (Rajewski R. A. et al., 1996; Matsuda H. et al., 1999; Uekama K. et al., 1998; Loftsson T. et al., 2001b). Однако, ЦД могут быть использованы в комбинированных ЛФ, где их ролью будет являться повышения концентрации ЛС на поверхности рогового слоя, а стандартные усилители проницаемости будут снижать барьерные свойства кожи (Adachi H. et al., 1992; Adachi H. et al., 1993). Такая комбинированная ЛФ была изучена в эксперименте *in vitro*. Использовали крем, в который добавляли 2-гидроксипропил- β -ЦД и экстрактmonoэфира глицерина для трансдермальной доставки тестостерона через кожу мыши (Loftsson T. et al., 1998). При добавлении только 2-гидроксипропил- β -ЦД, проницаемость тестостерона увеличивалась на 60%, при добавлении экстракта monoэфира глицерина проницаемость

тестостерона увеличивалась на 40%. Однако, при добавлении в крем обоих веществ, проницаемость тестостерона через кожу возрастала до 80%.

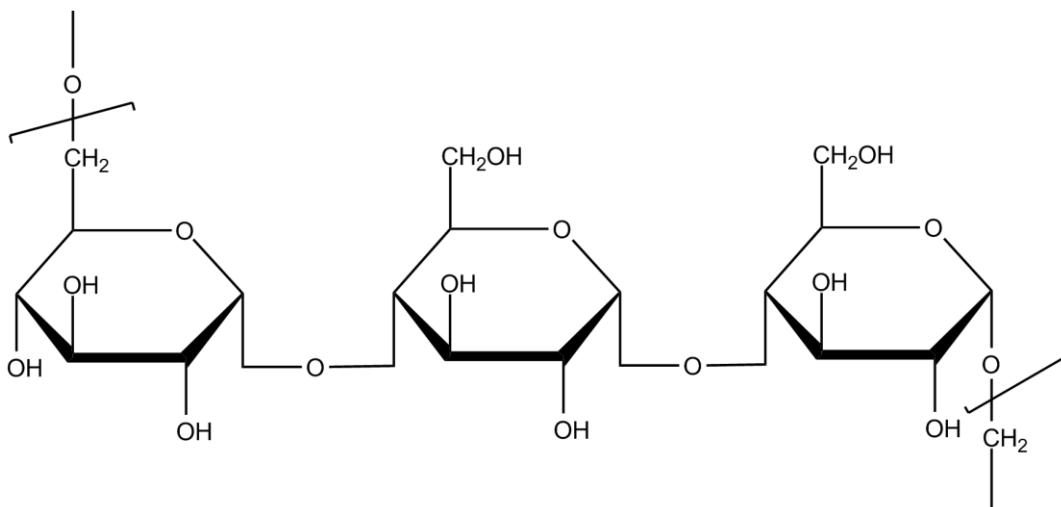
ЦД могут быть использованы и для снижения проницаемости через кожу некоторых веществ. Например, при добавлении избытка 2-гидроксипропил- β -ЦД к средству от загара, происходило снижение трансдермальной проницаемости оксибензона, основного поглотителя УФ излучения (Felton L. A. et al., 2002). Аналогичный эффект был обнаружен и при комплексообразовании оксибензона с гидроксипропил- β -ЦД (Felton L. A. et al., 2004).

1.2. Пуллулан

Пуллулан (ПУЛ) – полисахарид, состоящий из мальтотриозных единиц, который впервые был выделен Бернье (Bernier) в 1958 году. В его структуре три глюкозных единицы в мальтотриозе соединены гликозидной связью α (1→4), тогда как последовательные мальтотриозные единицы соединены друг с другом гликозидной связью α (1→4). Молекулярный вес находится в диапазоне от 5 до 900 кДа. Пуллулан получают из крахмала посредством гриба *Aureobasidium pullulans* (Vipul D. et al., 2013).

На протяжении длительного времени этот полисахарид использовали в Японии в качестве пищевой добавки и вспомогательного вещества при производстве лекарств. Кроме того, пуллулан признан безопасным и разрешен к применению в США. Полностью безопасной, считается доза до 10 грамм в сутки, при приеме больших количеств могут наблюдаться незначительные симптомы со стороны ЖКТ (Vipul D. et al., 2013).

Рисунок 3 – Химическое строение Пуллулана.



В сухом состоянии ПУЛ представляет собой белый порошок без запаха и вкуса, а при растворении в воде в количестве 5-10% образует не гигроскопичные вязкие растворы. Распад полимера начинается при температуре 250°C, а при температуре 280°C происходит обугливание. ПУЛ очень хорошо растворим в воде, биодеградируем, не подвержен воздействию ферментов ЖКТ человека (Vipul D. et al., 2013). Кроме нативного ПУЛ, возможно получение различных синтетических производных, которые увеличивают его активность и расширяют области применения.

В пищевой промышленности ПУЛ применяется как источник пищевых волокон. Он не подвержен воздействию амилаз млекопитающих и оказывает стимулирующий эффект на рост полезных бифидобактерий (Yoneyama M. et al., 1990).

ПУЛ можно использовать вместо крахмала в различных мучных изделиях при этом достигается увеличения срока годности, поскольку ПУЛ является сложно усвояемым источником углерода для бактерий, плесени и грибов, которые являются причиной порчи продуктов, а также ПУЛ лучше, чем крахмал удерживает воду, что препятствует быстрому высыханию. Кроме этого, ПУЛ можно использовать как наполнитель для напитков, соусов, в качестве стабилизатора в составе майонеза, также он обладает адгезивными свойствами.

Рисунок 4 – Химические структуры наиболее распространенных производных пуллулана (Vipul D. et al., 2013).

Schematic chemical structure of the most common pullulan derivatives.

Type of reaction	Schematic chemical structure of substituted pullulan (P-OH)
Etherification	P-O-CH ₃ (permethylation) P-O-(CH ₂) ₂₋₃ -CH ₃ (alkylation) P-O-CH ₂ -COOH (carboxymethylation) P-O-(CH ₂) ₂₋₃ -CH ₂ -NH ₃ ⁺ (cationization)
Etherification	P-O-CH ₂ -CH ₂ -CN (cyanoethylation) P-O-(CH ₂) ₁₋₄ -Cl (chloroalkylation) P-O-CH ₂ -CH ₂ -(S=O)-CH ₃ (sulfinyl) P-O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ Na P-O-CH ₂ -CH ₂ -N(CH ₂ CH ₃)
Esterification	P-O-CO-CH ₂ -CH ₂ -COOH (succinoylation) PA-O-CO-CH ₂ -CH ₂ -CO-sulfodimethoxine P-O-CO-CH ₂ -CH ₂ -CO-cholesterol P-abietate P-stearate PA-folate P-cinnamate P-biotin
Urethane derivatives	P-O-CO-NH-CH ₂ -CH(OH)-CH ₃ P-O-CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺ P-O-CO-NH-R (R = phenyl or hexyl) P-O-CO-NH-phenyl
Chlorination	P-CH ₂ -Cl (C ₆ substitution)
Sulfation	P-O-SO ₃ Na
Azido-pullulan	P-CH ₂ -N ₂
Oxidation	P-COOH (C ₆ oxidation) Glycosidic ring opening (periodate oxidation)
CMP/hydrazone derivative	P-O-CH ₂ -CO-NH-doxorubicin P-O-CH ₂ -CO-NH-antibody

При высыхании раствора ПУЛ (обычно 5-10%) образуются прозрачные и не проницаемые для кислорода воздуха пленки, которые обладают отличными механическими свойствами. При попадании таких пленок в воду или ротовую полость происходит их быстрое растворение. Благодаря таким свойствам они могут быть применены в качестве защитных оболочек для пищевых продуктов для предотвращения преждевременного окисления жиров и витаминов.

В фармацевтической промышленности ПУЛ и его производные могут быть использованы как водорастворимый стоматологический адгезив, а также в качестве стабилизатора окраски при производстве таблеток или гранул, покрытых сахар содержащей оболочкой. Кроме этого, применение ПУЛ позволяет улучшать стабильность, биосовместимость и биодеградируемость микросфер, образуемых циклодекстринами (Fundueanu, G. et al., 2003). Производные ПУЛ могут быть

использованы в качестве коньюгатов при производстве вакцин. Вирус, ковалентно связанный с ПУЛ, достоверно усиливает выработку иммуноглобулинов G и M и снижает количество иммуноглобулинов E, при этом сам вирус надежно инактивируется. ПУЛ с молекулярной массой в диапазоне 30 – 90 кДа может быть использован в качестве кровезаменителя. Также этот полисахарид может применяться в качестве ингредиента в различных косметических средствах (Singh R. S. et al., 2008).

Поскольку ПУЛ, как и другие полисахариды, обладает сродством к лектино-подобным рецепторам клеток печени (Seymour L. W. et al., 1991; Toth C. A. et al., 1985), он может быть использован для адресной доставки лекарственных средств в этот орган. Авторами (Xi K. et al., 1996) был синтезирован коньюгат ПУЛ и интерферона и проведено изучение его активности *in vitro* и *in vivo*. В ходе экспериментов было установлено, что после внутривенного введения интерферон концентрируется в печени и проявляет более длительный противовирусный эффект. Авторами (Scomparina A. et al., 2011) был получен коньюгат ПУЛ с доксорубицином и изучен его цитотоксический эффект. На клеточных линиях КВ и MCF7 было показано, что его значения IC₅₀ превышает таковое для свободного доксорубицина. Такое различие объясняется более длительным высвобождением лекарственного средства из супрамолекулярной системы.

В большей степени для адресной доставки различных лекарств изучают различные синтетические производные ПУЛ: ПУЛ с холестерином, пуллулан ацетат, карбокси метил ПУЛ, ПУЛ с диэтилен триамин пентауксусной кислотой, сукцинат ПУЛ и др. При этом применяются различные виды частиц ПУЛ: наночастицы, наногели, липосомы, микросфера и коньюгаты. Перечень лекарственных средств также обширен и включает инсулин, доцетаксел, адриамицин, доксорубицин, клоназепам, эпирубицин, индометацин и др. (Singh R. S. et al., 2015). Большинство опубликованных работ по этой тематике, как правило, описывает эксперименты *in vitro*.

1.3. Альгинаты

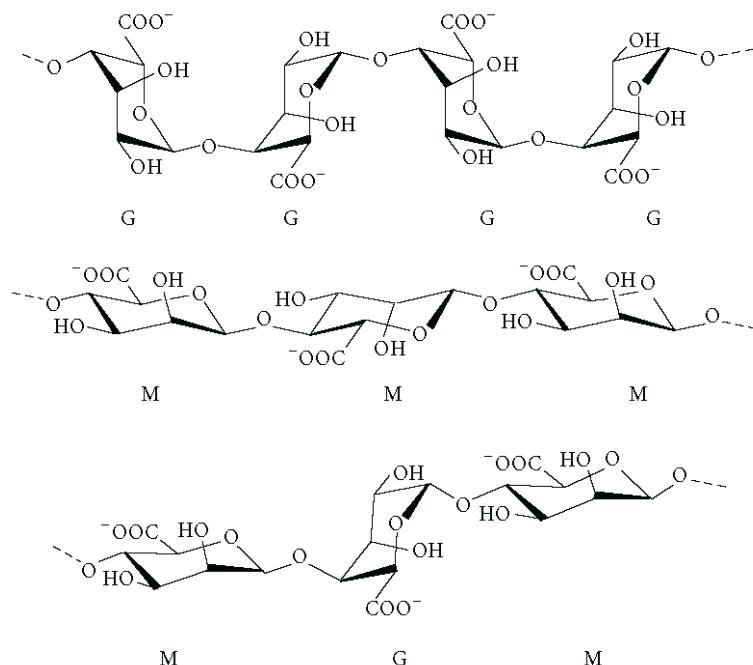


Рисунок 5 – Структура альгинатов.

Альгинаты (АЛГ) это общее название различных природных не разветвленных полиионных полисахаридов состоящих из повторяющихся единиц β -D-маннуроновой кислоты (M) и α -L-гуллуроновой кислоты (G) связанных между собой 1→4 гликозидными связями. Молекулярный вес этих полисахаридов может варьировать в широком диапазоне, от 32 до 400 кг/моль. Основным источником АЛГ являются различные виды бурых водорослей *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* (Sosnik A. et al., 2014). Структуру альгинатов составляют гомополимерные блоки MM или GG с вкраплением гетерополимерных блоков MG или GM. Соотношение этих блоков различается в зависимости от источника получения АЛГ. При добавлении воды альгиновая кислота за счет межмолекулярного взаимодействия образует вязкий «кислотный гель». Механизм гелеобразования объясняется моделью «яичной коробки», где один двухвалентный катион взаимодействует с четырьмя –COOH группами.

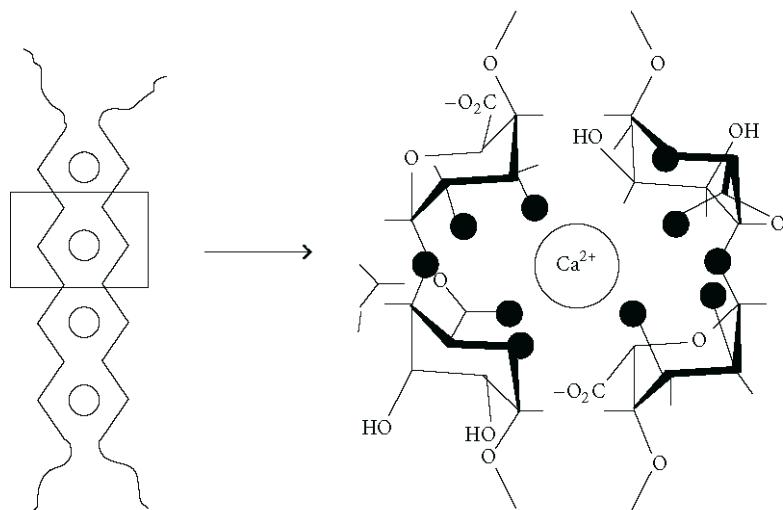


Рисунок 6 – Схематическое изображение и координация иона кальция с помощью модели «яичной коробки». Темные круги представляют атомы кислорода, вовлеченные в координацию иона кальция (Braccini I. et al. 2001).

После гелеобразования, молекулы воды физически захватываются внутрь альгиновой матрицы, но при этом сохраняют подвижность и способность покинуть ее. Это свойство на протяжении более трех десятилетий используется для инкапсулирования различных ЛС, белков, генов и клеток. АЛГ обладают мукоадгезивными свойствами, полностью биосовместимы и не вызывают раздражения при попадании в живой организм. Их используют для производства лекарственных форм, в составе ранозаживляющих повязок, а также для остановки кровотечений в качестве гемостатика. Коммерчески доступными являются более 200 видов АЛГ (Tønnesen H. H. et al., 2002).

АЛГ является гидрофильным полимером, поэтому высвобождение инкапсулированных в него молекул ЛС может происходить разными путями. Водорастворимые вещества, как правило, покидают матрицу путем диффузии, тогда как плохо-растворимые в воде вещества высвобождаются путем разрушения матрицы АЛГ. Высвобождение маленьких молекул происходит быстро, поскольку диаметр пор матрицы альгинатов составляет примерно 5 нм (Boontheekul T. et al., 2005). Однако, при необходимости возможно физическое

или химическое связывание молекулы ЛС с матрицей, что позволит пролонгировать его высвобождение (Sosnik A. et al., 2014).

Однако, не смотря на широкое использование в биологии и медицине, не утихают споры о таких нежелательных побочных эффектах АЛГ, как иммуногенность. Она может быть вызвана как качеством и чистотой биоматериала, так и благодаря непосредственной иммуногенности АЛГ, в связи с возможным наличием в составе конечного продукта следов тяжелых металлов, эндотоксинов, белков или полифенольных соединений (Kurt I. et al., 2011; Lee K. Y. et al., 2012).

Сами по себе АЛГ не перерабатываются млекопитающими, поскольку для этого у них нет необходимых ферментов (например, альгиназы), которые могли бы разъединить цепочки полимера, однако ионные поперечно сшитые альгинатные гели могут быть растворены посредством высвобождения двухвалентного иона, обеспечивающего сшивание. Этот процесс происходит путем реакции обмена с окружающей средой на одновалентный катион, такой как Na^+ . Тем не менее, даже при этом средняя молекулярная масса большинства коммерчески доступных АЛГ остается большой для преодоления почечного барьера и полного выведения с мочой (Al-Shamkhani A. et al., 1995). Для повышения биодеградации АЛГ используют частичное окисление его цепей. В таком виде АЛГ может разрушаться в водной среде и использоваться в качестве носителя ЛС и клеток (Lee K. Y. et al., 2012).

1.4. Гиалуроновая кислота

Гиалуроновая кислота (ГЛК) – природный линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся единиц N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты с моносахаридами, которые связаны вместе посредством чередующихся β -1,3 и β -1,4 гликозидных связей (Meyer K. et al., 1934). Поскольку значения pK_a карбоксильных групп ГЛК составляют 3-4, то в условиях физиологического pH 7,4 эти функциональные группы находятся в

ионизированном состоянии, а сама ГЛК является полианионом и обозначается как гиалуронан (Laurent T. C. et al., 1992). Молекулярные массы ГЛК могут находиться в достаточно широком диапазоне от 20 до 4000 кДа. В растворах цепи ГЛК образуют произвольные спирали. В таких условиях полисахарид является крайне гидрофильным и окружен молекулами воды, которые связаны с ним при помощи водородных связей. Благодаря таким физико-химическим свойствам растворы ГЛК очень вязкие и эластичные (Schante C. E. et al., 2011).

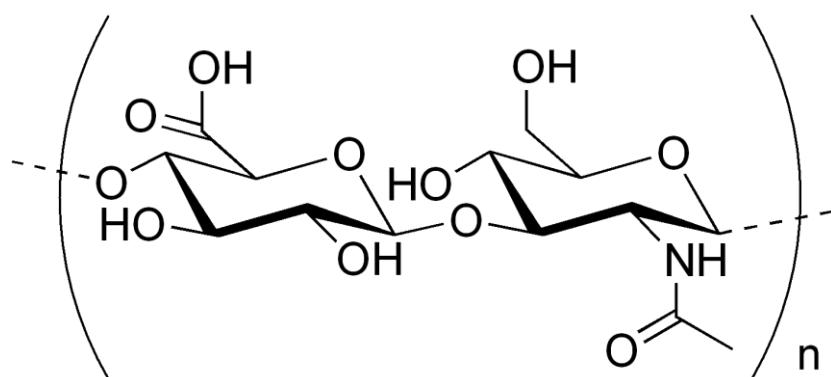


Рисунок 7 – Структура гиалуроновой кислоты.

В природе ГЛК в основном встречается во внеклеточном матриксе соединительной ткани и в большом количестве в стекловидном теле глазного яблока. Кроме этого, она играет важную роль в функционировании клетки, поскольку оказывает влияние на пролиферацию, миграцию и модулирование внутриклеточных сигналов (Raemdonck K. et al., 2013).

Для фармацевтики ГК представляет интерес в связи с тем, что является биодеградируемым, биосовместимым, не токсичным и не иммуногенным полимером. Кроме этого ГЛК может быть химически модифицирована путем реакций перекрестного сшивания или конъюгации со своими функциональными группами (Tripodo G. et al., 2015). В медицине ГА применяют для лечения остеоартритов (Hyalgan®, Artz®, Orthovisc®, Healon® и др.), в глазной и пластической хирургии (Bionect®, Conngettivina®, Jossalind®), а также в тканевой инженерии (Liao Y.-H. et al., 2005). В качестве носителя ГЛК используют для

рецептор-опосредованной доставки ЛС в противоопухолевой терапии (коньюгаты с доксорубицином, паклитакселом, цисплатином), для доставки белков, пептидов и нуклеотидов, противовоспалительных средств (коньюгаты с метотрексатом, дексаметазоном, метилпреднизалоном), а также для доставки контрастных агентов, поскольку ГЛК способна специфически опознавать рецепторы, экспрессия которых повышенна в различных нездоровых клетках (Tripodo G. et al., 2014).

Большое внимание ГЛК привлекает в качестве системы доставки лекарств в кожу. Как известно, кожные покровы покрыты роговым слоем, непроницаемым барьером для различного рода веществ, в том числе и для ЛС (Liao Y.-H. et al., 2005). На мировом фармацевтическом рынке существует препарат под торговой маркой Solaraze®, который представляет собой гель, содержащий гиалуронат натрия и 3% диклофенака натрия. Основным показанием для него является актинический кератоз, заболевание кожи, вызванное длительным воздействием солнечного излучения. Как правило, оно появляется на коже головы, лица, спины и рук у людей со светлой кожей и в возрасте более 50 лет. В США это заболевание является третьим по распространенности среди кожных болезней (Liao Y.-H. et al., 2005). Точный механизм действия НПВС на данный вид карциномы не известен, однако предполагают, что это связано со снижением синтеза PGE₂. Тем не менее, авторами (Brown M. B. et al., 1995; Brown M. B. et al., 2002; Brown M. B. et al., 2001) *in vitro* было установлено, что ГЛК достоверно усиливает распределение диклофенака в кожу человека и способствует его накоплению в эпидермисе. Наблюдаемый эффект был подтвержден другими исследованиями, где также было отмечено депонирование диклофенака в эпидермисе (McEwan L. E. et al., 1997; Wolf J. E. et al., 2001). Аналогичный эффект ГК оказывает и на другие ЛС – ибупрофен, клиндамицин фосфат, циклоспорин (Brown M. B. et al., 2001; Amr S. K. et al., 2000; Brown M. B. et al., 1996; Nazir T. et al. 2001).

Местное применение ЛС на поверхности глаза является еще одной областью успешного использования ГЛК в качестве мукоадгезивного вязко-

эластичного носителя. Во многих исследования показано, что ГЛК способно пролонгировать прекорниальную экспозицию и/или увеличить биодоступность пилокарпина (Gurny R. et al., 1987; Bucolo C. et al., 1999; Saettone M. F. et al., 1994), тропикамид (Herrero-Vanrell R. et al., 2000; Saettone M. F. et al., 1989), тимолол (Bucolo C. et al., 1998), гентамицин (Moreira C. A. et al., 1991a; Moreira C. A. et al., 1991б), тобрамицин (Gandolfi S. A. et al., 1992).

Использование мукоадгезивных свойств ГЛК позитивно влияет на биодоступность ЛС применяемых интраназально. В качестве примера можно привести ксилометазалин, вазопрессин (увеличение в 2 раза) и 1-деамино-8-D-аргинин вазопрессин (увеличение в 1,6 раза). Наблюдаемый эффект зависит от молекулярной массы ГЛК, так увеличение биодоступности проявляется при массе более 300 кДа, а при более низких значениях (55 кДа) отсутствует (Liao Y.-H. et al., 2005). Кроме этого, добавление ГЛК в структуру микросфер приводит к усилению их мукоадгезивных свойств. Вследствие этого, происходит увеличение биодоступности молекул ЛС, заключенных в таких микросферах (Lim S. T. et al., 2002). Авторами (Lim S. T. et al., 2002) было показано увеличение биодоступности гентамицина на 23,3% при его интраназальном введении в микросферах на основе ГЛК.

Авторами (Morimoto K. et al., 2001; Surendrakumar K. et al., 2003) ГЛК была использована для улучшения абсорбции инсулина при его ингаляционном введении. Было показано, что применение этого полисахарида приводит к лучшему всасыванию гормона и более выраженному снижению уровню глюкозы у собак.

Кроме этого, ГЛК широко применяют для модификации липосом, совместно с другим полисахаридом хитозаном, а также для доставки молекул ДНК (Liao Y.-H. et al., 2005).

1.5. Декстрыны.

Декстрыны (ДК) это полимеры глюкозы, которые в медицине применяются уже более 50 лет в качестве заменителя плазмы и антитромболитического средства (Thoren L. et al., 1981). ДК могут быть получены микробиологическим синтезом из глюкозы или синтетически. Структурно декстрыны состоят преимущественно из единиц D-глюкозы соединенной по α -(1→6) положению. Соотношение связей и разветвленность сильно зависит от источника ДК и может варьировать от 0,5 до 60% (Suflet D. M. et al., 2010; Mehvar R. et al., 2000). Также источник декстрана определяет и его молекулярную массу, что наряду со степенью разветвленности оказывает значительное влияние на физико-химические свойства полимера (Walker G. J. et al., 1978). При этом, декстрыны с разветвленностью более 43% (связь 1,3- α) не растворимы в воде, поэтому все коммерчески доступные ДК имеют очень низкую степень разветвления (0,5%) и хорошо растворяются в воде (Mehvar R. et al., 2000).

Другим важным свойством, от которого зависит поведение ДК *in vivo*, является степень полидисперсности полимера. Природные декстрыны обладают высокой степенью полидисперсности, поэтому для получения полимеров с относительно узким молекулярно-массовым распределением, нативные соединения подвергаются частичной деполимеризации или фракционированию (Mehvar R. et al., 2000).

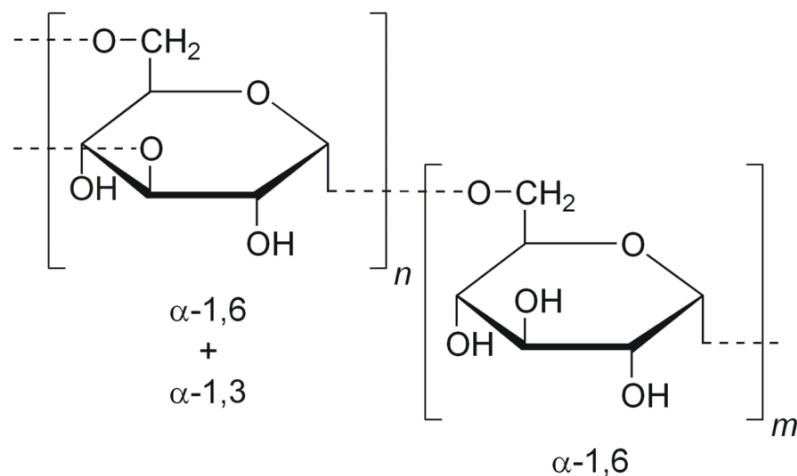


Рисунок 8 – Химическая структура декстрана. (Varshosaz J. 2012)

Благодаря наличию большого количества гидроксильных групп, полимеры ДК являются хорошими объектами для конъюгирования. В слабокислых или слабощелочных средах полимеры ДК остаются стабильными.

Биодоступность декстранов после перорального введения ничтожно мала. Авторами (Mehvar R. et al., 1992) было установлено, что для ДК с молекулярной массой 4, 20, 40 кДа она составляет менее 0,004. Однако, это не случайно, поскольку размер декстранов превышает максимальный размер пор в ЖКТ практически в два раза. Тем не менее, декстраны могут попасть в системный кровоток путем рецептор-опосредованной абсорбции, однако, в этом случае при прохождении через клетки эпителия происходит деградация полимера на частицы с меньшими молекулярными массами (Kouama Y. et al., 1996).

Метаболизируются декстраны в нижних отделах пищеварительного тракта различными α -1-гликозидазами (декстраназы), при этом такие ферменты также присутствуют в печени, селезенке и почках (Mehvar R. et al., 2000).

В литературе описано большое количество конъюгатов декстранов с различными ЛС, преимущественно это противоопухолевые препараты (дауномицин, доксорубицин, метотрексат, митомицин, цисплатин). Во всех случаях отмечается увеличение периода полувыведения и биодоступности ЛС конъюгированных с ДК (Mehvar R. et al., 2000; Varshosaz J. et al., 2009).

Ввиду особенности локализации метаболизма, а именно в толстой кишке, конъюгаты с декстраном используют для таргетной доставки ЛС в этот отдел ЖКТ. Так, конъюгат с будесонидом проявил выраженное местное действие при язвенном колите и способствовал появлению улучшений как макроскопически, так и микроскопически. Будесонид, введенный в виде обычной суспензии, не проявил столь выраженного эффекта (Varshosaz J. et al., 2009; Varshosaz J. et al., 2010). Кроме этого, в литературе описаны конъюгаты ДК с 5-аминосалициловой кислотой, кетопрофеном, селекоксибом (Varshosaz J. 2012).

При помощи конъюгирования с ДК удалось снизить ульцерогенный побочный эффект некоторых НПВС. Авторами (Vyas S. et al., 2007; Shrivastava S. K. et al., 2003) были получены конъюгаты с кетаролаком и флюорбипрофеном и

установлено, что при сохранении анальгетической и противовоспалительной активностей, происходит заметное снижение ульцерогенного действия, присущего свободным ЛС. Другими авторами (Feeney M. et al., 2007) были получены гидрогели на основе декстрана с ибуuproфеном и О-ацетилсалициловой кислотой, было показано, что основное место высвобождения этих НПВС является толстая кишка, при этом в кислой среде желудка высвобождения ЛС не наблюдалось. Благодаря этому снижается вероятность местного ульцерогенного действия указанных ЛС в желудке и ДПК.

1.6. Пектин

По химической структуре пектин является линейным полисахаридом, состоящим преимущественно из единиц D-галактуроновой кислоты соединенной в цепочки посредством α -(1→4) гликозидных связей. Кроме галактуронановых сегментов в структуре пектина могут встречаться и нейтральные сахара, как например рамноза, арабиноза, галактоза или ксилоза (Sriamornsak P. et al., 2011). Источником пектина являются высшие растения, в клеточных стенках которых, его содержание может доходить более чем до 30% в пересчете на сухое вещество. Наибольшее количество пектина находится в срединной ламелле клеточной стенки (Endress H. U. Et al., 2009). Несмотря на то, что пектин содержится практически во всех тканях растений, число природных источников, пригодных для его промышленного получения, ограничены. Это связано с большой вариабельностью молекулярной массы и степени эстерификации, что отражается на способности пектина к гелеобразованию. В настоящее время коммерчески доступный пектин получают исключительно из яблочного жмыха или кожуры цитрусовых фруктов (апельсинов, лимонов, лайма), которые являются отходами производства соков. Содержание пектина в яблочном жмыхе составляет 10-15% от сухой массы, в то время как в кожуре цитрусовых до 20-30% (Rolin C. et al., 1998). В качестве альтернативных источников могут быть использованы отходы

от сахарной свеклы, манго, подсолнуха, бобовых, бананов, кабачков, моркови и помело (Sriamornsak P. et al., 2011).

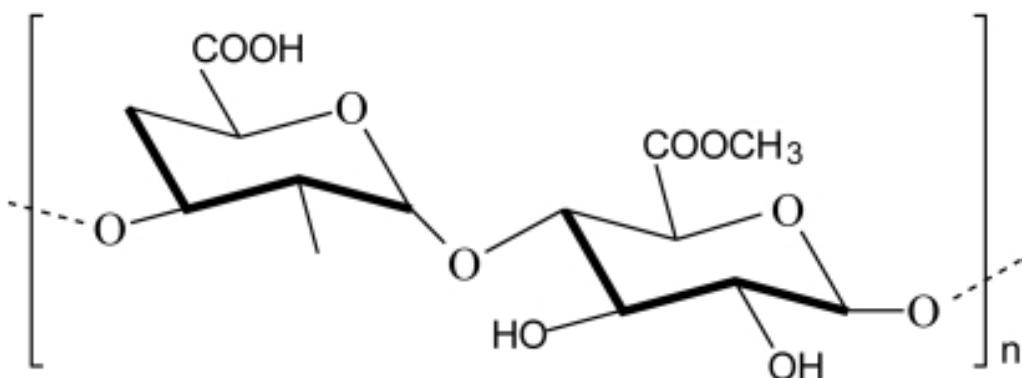


Рисунок 9 – Повторяющийся сегмент молекулы пектина.

Важной характеристикой пектина является степень эстерификации его карбоксильных групп метиловым спиртом. В природе этот показатель варьирует от 60 до 90%. В зависимости от этого изменяются желирующие свойства пектина. Пектин со степенью эстерификации более 50% обозначается как HM (high metoxy), а со степенью эстерификации менее 50% – LM (low metoxy) (Sriamornsak P. et al., 2003).

Основным свойством пектина, благодаря которому он широко применяется в пищевой и фармацевтической промышленности, является способность образовывать гели. В основе этого лежит образование водородных связей и гидрофобные взаимодействия между молекулами полимера (Oakenfull D .G. et al., 1991). HM-пектин образует гели с сахаром и кислотой, а LM-пектин для гелеобразования требует наличия ионов кальция или других мультивалентных катионов. Однако, не все катионы способствуют гелеобразованию LM-пектина. Показано, что для этого не подходящим является Mg^{2+} (Rinaudo M. et al., 2008). Механизм гелеобразования пектина с низкой степенью эстерификации протекает по принципу «яичной коробки» (Sriamornsak P. et al., 2011), характерной также для альгинатов.

Благодаря своим мукоадгезивным свойствам, биосовместимости, низкой стоимости и отсутствию токсичности пектин может быть использован для

контролируемой доставки ЛС. Он может быть использован для энтеральной, интраназальной и вагинальной доставки различных ЛС (Morris G. A. et al., 2010; Liu L. et al., 2007). При пероральном введении пектин выступает в качестве защиты от преждевременного метаболизма для веществ, находящихся в его матрице. Как правило в роли таких веществ выступают различные полипептиды, высвобождение которых начинается только в толстой кишке, после того как матрица пектина начинает деградировать под воздействием кишечной микрофлоры. Ферментативное разложение пектина в толстой кишке усиливается при наличии ионов кальция и уменьшается при повышении степени эстерификации полимера (НМ-пектин). При этом пути введения у композиций, содержащих пектин, есть один недостаток, они могут набухать при физиологических условиях, что может привести к преждевременному высвобождению ЛС. Для минимизации этого нежелательного эффекта в такие композиции дополнительно добавляют другие полимеры: гидроксипропилметил целлюлозу, зеин или акриловые полимеры (Morris G. A. et al., 2010).

Интраназальный и вагинальный пути доставки ЛС с помощью пектина рассматриваются как альтернатива инъекционным способам, поскольку слизистая в обоих случаях имеет высокую степень васкуляризации, отсутствует эффект первого прохождения через печень, что в совокупности способствует быстрому проникновению молекул ЛС в системный кровоток (Lui L. et al., 2007; Baloglu E. et al., 2006).

Мукоадгезивные свойства пектина во многом зависят от его молекулярной массы, вязкости, местного рН и функциональных групп в структуре полимера (Lui L. et al., 2007; Thirawong N. 2008).

Кроме непосредственной доставки молекул ЛС, пектин способен усиливать их абсорбцию путем открытия плотных клеточных контактов в эпителии. Этим путем могут проникать в системный кровоток лекарства, для которых возможен парацеллюлярный транспорт, как правило, это гидрофильные молекулы (Gaucher G. et al., 2010). Авторами (Charlton S. T., 2007) было показано, что после

добавления к клеточной культуре MDCK (клетки почки собаки майдин-дэрби) 1% и 3% растворов пектина с низкой степенью эстерификации (5% и 35%, соответственно) происходит достоверное уменьшение трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) более чем на 80%. Кроме этого, происходит увеличение концентрации маннитола в базальном отделении (под мембраной с эпителиальными клетками) после добавления указанных растворов пектина. В контрольной группе, маннитол практически не проникает через клеточный монослой. Оба этих эффекта свидетельствуют об открытии плотных клеточных контактов.

Массовому распространению пектина в качестве носителя ЛС препятствует не стабильность его композиций при хранении. Так, вязкость растворов пектина может значительно снижаться через шесть месяцев хранения при температуре 25 °C и 40 °C. В свою очередь, это приводит к снижению прочности геля при добавлении ионов кальция. Такое изменение вязкости является результатом деполимеризации пектина с течением времени (Morris G. A. et al., 2010). С другой стороны, авторами (Chelladurai S. et al., 2008) показано, что такое снижение вязкости не влияет на высвобождение ЛС из пектинового геля *in vitro*. Чаще всего пектин используется как составная часть композиций, включающих в себя различные полимеры (Zhang W. et al., 2016; Xing P. et al., 2016; Saha N. R. et al., 2016).

1.7. Хитозан

Хитозан является природным линейным биополиаминосахаридом, который получают путем щелочного деацетилирования хитина, который, по распространённости в природе, является вторым полисахаридом после целлюлозы (Sinh V. R. et al., 2004). Хитин является основным компонентом защитной кутикулы ракообразных таких, как крабы, креветки, лобстера и клеточной стенкой некоторых грибов, таких как *aspergillus* и *mucor*. Хитин это прямолинейный гомополимер, состоящий из β -(1,4)-сочлененных *N*-ацетил-

глюкозаминовых единиц, тогда как хитозан содержит сополимеры глюкозамина и *N*-ацетил-глюкозамина (Kato Y. et al., 2003; Singla A. K. et al., 2001). Хитозан содержит одну основную аминогруппу и две свободные гидроксильные группы на каждый структурный блок C₆. Благодаря хорошей доступности аминогрупп в хитозане, он несет положительный заряд, что позволяет ему вступать в реакции с различными отрицательно заряженными поверхностями или полимерами, а также подвергаться хелированию с ионами металлов, такими как кобальт (Fukuda H. et al., 1980; Onsoyen E. et al., 1990). Это свойство хитозана используется для разделения металлов.

Хитозан является слабым основанием и не растворим в воде и органических растворителях. Однако, он растворим в разбавленных кислых водных растворах с pH < 6,5, которые могут перевести его глюкозаминовые единицы в растворимую форму R-NH₃⁺ (Chandy T. et al., 1990). Он выпадает в осадок в щелочных растворах или при взаимодействии с полианионами и образует гели при низких значениях pH. Его также используют в качестве флокулирующего агента для обработки сточных вод (Demarger-Andre S. et al., 1994).

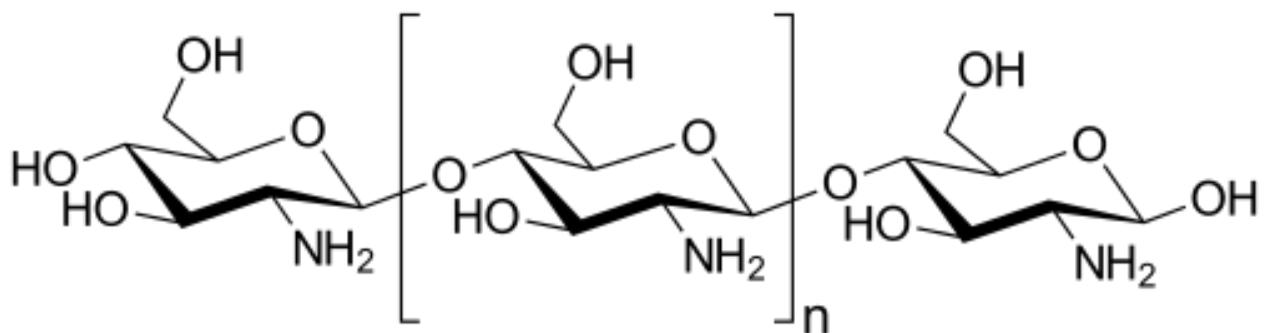


Рисунок 10 – Структура хитозана (Sinh V. R. et al., 2004).

Коммерчески доступный хитозан может быть в виде сухих хлопьев, раствора и мелкого порошка. Его молекулярный вес находится в диапазоне от 3800 Да до 2000 кДа и может быть деацетилирован от 66 до 95% (Kas H. S. et al., 1997). На фармацевтические свойства композиций, включающих хитозан, влияют

степень его деацетилирования, молекулярная масса, размер частиц, плотность, вязкость.

Хитозан обладает низкой токсичностью и биосовместимостью, биодеградируем. Кроме этого обладает следующими свойствами: гипобилирубинемическим, гипохолестеринемическим, антацидным, противоязвенным, ранозаживляющим, противоожоговым. Также он способен иммобилизировать ферменты и живые клетки (Sinh V. R. et al., 2004). Благодаря способности к образованию пленки, его было предложено использовать в качестве биополимера для мягких и твердых контактных линз, а также для создания линз защищающих глаза после перенесенной травмы (Markey M. L. et al., 1989). Мембранны из хитозана могут быть использованы в качестве искусственной почечной мембранны, в виду необходимой проницаемости и высокой растяжимости (Amiji M. M. 1995).

Хитозан обладает мукоадгезивным свойством, которое опосредовано молекулярными силами притяжения, формируемыми электростатическим взаимодействием между положительно заряженным хитозаном и негативно зараженной слизистой поверхностью. Этому способствуют: наличие групп, образующих прочные водородные связи (-OH, -COOH); заряд; большой молекулярный вес; достаточная гибкость цепей; свойства энергии поверхности, благоприятствующие распределению в слизь (Sinh V. R. et al., 2004). Кроме этого, хитозан способен открывать плотные клеточные контакты в эпителиальных тканях. В работе (Charlton S. T. et al., 2007) было показано, что добавление 0,5 % раствора хитозана к клеткам MDCK (клетки почки собаки майдин-дэрби) происходит значительное уменьшение трансэпителиального электрического сопротивления (TEER), практически до 0. Кроме этого, происходит значительное увеличение концентрации маннитола в базальном отделении (под мембраной с эпителиальными клетками) после добавления указанного раствора пектина. В контрольной группе, маннитол практически не проникает через клеточный монослой. Оба этих эффекта свидетельствуют об открытии плотных клеточных

контактов, достаточное не только для тока ионов, но и для проникновения молекул ЛС.

В фармацевтической промышленности хитозан нашел применение в качестве носителя при производстве таблеток методом прямого прессования, в качестве дезинтегрирующего агента, в качестве связующего и гранулирующего агента, в качестве носителя для ЛС длительного высвобождения, а также как дополнительный растворитель для увеличения растворимости и биодоступности не растворимых в воде ЛС (Charlton S. T. et al., 2007).

Самыми распространёнными системами доставки ЛС на основе хитозана являются микросфераы. Они применяются для контролируемого высвобождения антибиотиков, антигипертензивных агентов, противоопухолевых и противовоспалительный ЛС, белков, пептидных ЛС, вакцин и др. Такие микросфераы позволяют высвобождать молекулы ЛС в строголоженном месте и в необходимой концентрации, таким образом, осуществляется мишень-ориентированная терапия. Для «настройки» микросфер используют различные комбинации ЛС-полимер, также можно менять количество ЛС в микросфере и варьировать скорость высвобождения. Получают микросфераы хитозана путем перекрестного сшивания его молекул при добавлении строго определенных количеств мультивалентного аниона. Этот процесс может происходить в среде с любой кислотностью, от кислой до щелочной (Sinh V. R. et al., 2004). На эффективность захвата лекарственных молекул микросферами хитозана влияют множество факторов, как, например, природа ЛС, скорость перемешивания, соотношение ЛС:полимер, концентрация хитозана. При этом известно, что при малых концентрациях полимера происходит не достаточный захват молекул ЛС, а при высокой концентрации хитозан образует очень вязкие растворы, с которыми сложно работать. Высвобождение молекул ЛС из микросфер зависит также о многих факторов: количество ЛС, физическое состояние (молекулярные дисперсии, твердые растворы, кристаллы и др.), степень перекрестного сшивания (чем она больше, тем медленнее происходит высвобождение ЛС), наличие вспомогательных компонентов, pH среды и др. (Sinh V. R. et al., 2004).

1.8. Арабиногалактан

Арабиногалактаны – это класс полисахаридов, обнаруживаемый в большом количестве растений. В настоящее время эти природные метаболиты не применяются в фармацевтической промышленности как носители для плохо растворимых в воде ЛС. Такое их свойство впервые изучено в рамках настоящей диссертационной работы. Арабиногалактаны подразделяют на 2 типа: арабино-4-галактаны (тип I) и арабино-3,6-галактаны (тип II). Арабиногалактаны II типа наиболее распространены и имеют существенное практическое значение. Они составляют основу камедей покрытосеменных растений, например акции, а также голосеменных, особенно лиственницы (р. *Larix*) (Медведева Е. Н. и др., 2003; Odonmazig P. et al., 1994). Камедь акации и арабиногалактан лиственницы составляют значительную часть их биомассы. Так, ядровая древесина некоторых видов лиственницы содержит до 35% АГ, а одно дерево акации может ежегодно продуцировать более 2 кг камеди (Медведева Е. Н. и др., 2003). Для промышленного получения АГ в мире в основном используют древесину западной и даурской лиственницы (*Larix occidentalis* и *Larix dahurica*). Последняя в России больше известна под названием лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii*) и произрастает в основном на территории Восточной Сибири и Забайкалья. Также к промышленным видам лиственницы в Сибири относится сибирская лиственница – *Larix sibirica* (Медведева Е. Н. и др., 2003). Древесина этих двух видов лиственницы содержит 15% АГ (Антонова Г. Ф. и др., 1983).

Макромолекула арабиногалактана из древесины лиственницы имеет высоко разветвленное строение. Главная цепь ее состоит из звеньев галактозы, соединенных гликозидными связями β -(1→3), а боковые цепи со связями β -(1→6) – из звеньев галактозы и арабинозы, из единичных звеньев арабинозы, а также уроновых кислот, в основном глюкуроновой. Имеются сведения о том, что звенья арабинозы присутствуют также в основной цепи макромолекулы (Медведева Е. Н. и др., 2003). Соотношение звеньев галактозы и арабинозы примерно 6:1, при этом 1/3 звеньев арабинозы находится в пиранозной форме, а 2/3 – в фуранозной

(Медведева Е. Н. и др., 2003). Эти соотношения, а также молекулярная масса (м.м.) АГ могут варьироваться как в зависимости от вида лиственницы, так в пределах одного вида. Состав макромолекул АГ варьирует также в зависимости от условий его выделения из древесины и молекулярной массы (Медведева Е. Н. и др., 2003). Соотношение галактозных и арабинозных фрагментов во фракциях АГ из древесины западной лиственницы увеличивается от 2,33:1 до 6,99:1 с увеличением молекулярной массы от 3 до 79 кДа (Медведева Е. Н. и др., 2003).

Установлено, что в макромолекулах АГ из западной лиственницы звенья арабинозы расположены на концах боковых ответвлений, состоящих из трех или четырех моносахаридных остатков (Медведева Е. Н. и др., 2003).

Содержание звеньев глюкуроновой кислоты в АГ из различных видов лиственницы незначительно, а в очищенных образцах АГ из западной, европейской, горной и сибирской лиственниц кислотные фрагменты не обнаружены (Медведева Е. Н. и др., 2003).

Свойства АГ во многом определяются молекулярной массой его макромолекул. Имеющиеся в литературе данные о молекулярных массах АГ лиственницы весьма противоречивы. Определения молекулярной массы различными методами дают результаты, отличающиеся в 2 и более раз.

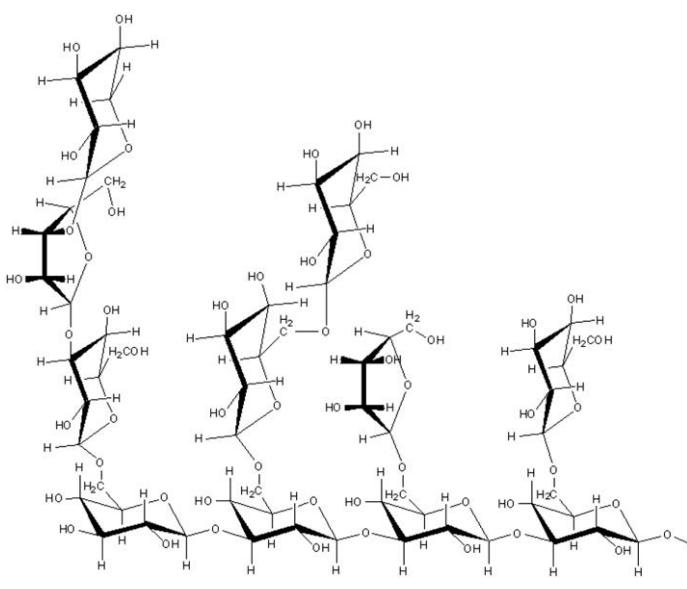


Рисунок 11 – Химическое строение АГ. Фотография *Larix sibirica*.

Вероятно, столь существенные различия обусловлены тем, что макромолекулы АГ существуют в очень компактной, возможно, сферической форме (Медведева Е. Н. и др., 2003).

В пользу этого свидетельствуют и аномально низкие значения вязкости водных растворов АГ (Медведева Е. Н. и др., 2003). Чистый АГ представляет собой сухой сыпучий порошок со слабым сосновым запахом и сладковатым вкусом, который 100% растворим в воде (Kelly G. S. et al., 1999).

Термическая и гидролитическая стабильность являются важными характеристиками АГ, во многом определяющими возможность его использования. Авторами (Терпукова А. Ф. и др., 1978) показано, что свойства АГ из древесины и натечной камеди лиственницы не изменяются при длительном нагревании при 105° С и мало изменяются при 130° С. Повышение температуры до 150° С приводит к увеличению потери массы. Кроме того, увеличивается средняя степень полимеризации АГ и возрастает количество высокомолекулярных фракций, что свидетельствует о протекании конденсационных процессов, в частности, межмолекулярной дегидратации. Гидролитическая устойчивость арабиногалактана в водных растворах в значительной степени зависит от рН среды и температуры (Медведева Е. Н. и др., 2003). При рН 1,3 гидролиз протекает с заметной скоростью уже при 75° С, при 100° С гидролиз практически заканчивается через 4 ч. В менее кислой среде (рН 3,8 и 4,5) начало гидролиза отмечается при 150° С, при 180° С АГ полностью гидролизуется в течение 1,5–2 ч. Совокупность высокой растворимости в воде, уникально низкой вязкости растворов, узкого молекулярно-массового распределения, биоразлагаемости и не токсичности ($ЛД_{50} > 5$ г/кг, отсутствие хронической токсичности в дозе 500 мг/кг/сутки) делают этот природный полисахарид крайне интересным для использования в медицине (Groman E. V. et al., 1994; Медведева Е. Н. и др., 2003).

Фармакокинетика АГ после перорального приема человеком до конца не изучена. Также не известна абсолютная концентрация АГ в плазме крови после абсорбции из ЖКТ. Однако, известно, что АГ подвергается ферментации

кишечной микрофлорой до низкомолекулярных продуктов и стимулирует рост полезных анаэробных бактерий: бифидобактерий и лактобактерий (Vince A. J. et al., 1990; Kaneo Y. et al., 2000).

В экспериментах на животных было установлено, что период полувыведения АГ после внутривенного введения составляет по разным данным от 3,8 до 5,46 минуты. Через 60-90 минут после в/в введения наибольшая концентрация АГ определяется в печени и почках. Печеночный клиренс происходит с периодом полувыведения 3,42 дня. Среднее время удерживания (MRT) в печени и почках 5,67 и 4,74 дня, соответственно. Однако, до 3,3% от введенной дозы АГ определяется в печени спустя 14 дней, при этом АГ сохраняется в неизменном виде (Groman E. V. et al., 1994; Kaneo Y. et al., 2000).

Известно, что очищенные АГ из западной лиственницы способны связываться *in vitro* с печеночными асиалогликопротеиновыми рецепторами. Это свойство также наглядно было продемонстрировано и в экспериментах *in vivo*. АГ, достигает печени по портальной вене и затем быстро и специфично захватывается гепатоцитами путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Причина взаимодействия арабиногалактана с этими рецепторами может заключаться в высокой разветвленности структуры макромолекул АГ и в наличии в них многочисленных концевых галактозных и арабинозных групп (Groman E. V. et al., 1994). Ввиду того, что АГ накапливается в печени и активно усваивается гепатоцитами, он может быть использован в качестве адресной доставки ЛС в печень (Groman E. V. et al., 1994).

АГ является прекрасным источником клетчатки, на основе АГ из западной лиственницы разработана пребиотическая пищевая добавка для поддержания роста полезных бифидобактерий и лактобацилл в желудочно-кишечном тракте человека – «ClearTracTM AG». Кроме того, этот препарат способствует образованию короткоцепочечных жирных кислот, чрезвычайно важных для нормальной работы организма (Медведева Е. Н. и др., 2003). Являясь источником растворимых диетических волокон, АГ улучшает питание, всасывание и сохранение в здоровом состоянии желудочно-кишечного тракта и может

рекомендоваться как нутрицевтик или функциональная добавка к пище в ежедневной диете. С клинической точки зрения это очень привлекательный продукт; регулярный прием его может поддерживать нормальный иммунитет не только через прямое воздействие, но и через эффекты на бактерии кишечника, которые, в свою очередь, помогают сложной иммунной системе человека функционировать более надежно. Применение этой биологически активной добавки к пище официально одобрено FDA США (Robinson R. R. et al., 2001). Арабиногалактан хорошо смешивается со всеми видами пищи и напитками, не влияя на вкусовые качества продуктов (Медведева Е. Н. и др., 2003). Запатентована композиция АГ с молочным или соевым белком, а также их смесью (Mehansho H. et al., 2002). Благодаря хорошей диспергирующей способности АГ (Duso T. et al., 2000) он может использоваться для приготовления пищевых продуктов (йогурт, соки, напитки, сухое молоко, кондитерские изделия), обогащенных минеральными добавками (йодид калия, фосфат или карбонат кальция, соединения железа, цинка, селена) (Медведева Е. Н. и др., 2003) и витаминами (A, C, D, E, комплекс витаминов B) (Медведева Е. Н. и др., 2003). Эти продукты являются источником растворимых пищевых волокон, а также биодоступных витаминов и микроэлементов, с сохранением вкусовых качеств. Компанией «Вимм-Билль Данн» совместно с Институтом питания РАМН разработана серия продуктов, содержащих фиброгам, которые выпускаются под маркой «Био-Макс» (Медведева Е. Н. и др., 2003). В нашей стране первым пробиотическим продуктом стало молоко «Био-Макс», обогащенное биоактивными волокнами. При использовании муки высшего сорта в рационе питания возникает дефицит пищевых волокон, необходимых организму человека. Источником таких волокон может быть арабиногалактан (Медведева Е. Н. и др., 2003). При добавлении АГ к муке он существенно влияет на качество клейковины при незначительном снижении ее количества, способствует поднятию выпечки, и, соответственно, может использоваться в хлебопечении. Для этой области применения очень ценными свойствами АГ являются растворимость в холодной воде и низкая вязкость его концентрированных растворов. Способность АГ

связывать жир и удерживать влагу наряду с другими полезными свойствами расширяет перспективу использования его в диетическом питании (Медведева Е. Н. и др., 2003). В опытах на лабораторных животных было установлено, что ржано-пшеничный хлеб и овсяные пряники, содержащие АГ, способствуют ограничению прироста массы животных, снижают уровень холестерина и липопротеидов низкой плотности в крови. Хлеб, содержащий 2% АГ, способствует уменьшению содержания сахара в крови интактных животных. На модели сахарного диабета установлено снижение содержание глюкозы в крови у животных, получавших пряники с 5% АГ и хлеб с 2% АГ. Кроме этого, эти продукты проявили значительную иммуномодулирующую активность на фоне иммунодепрессии, вызванной азатиоприном (Бабкин В. А. и др., 2012).

Арабиногалактан способен образовывать достаточно прочные связи с муцином, что было продемонстрировано в эксперименте *in vitro* с использованием муцина из желудка свиньи. При сравнении индекса адгезии с муцином нескольких полисахаридов – гиалуроновой кислоты, полисахарида из семян тамаринда и АГ, было показано, что АГ обладает наибольшим мукоадгезивным свойством. За счет этого АГ значительно медленней смывается с поверхности глаза, что наряду с низкой вязкостью растворов может успешно использовано для лечения синдрома сухого глаза, для заживления повреждений роговицы (Burgalassi S. et al., 2007), а также для трансорбитальной доставки лекарственных средств.

1.9. Глицирризиновая кислота

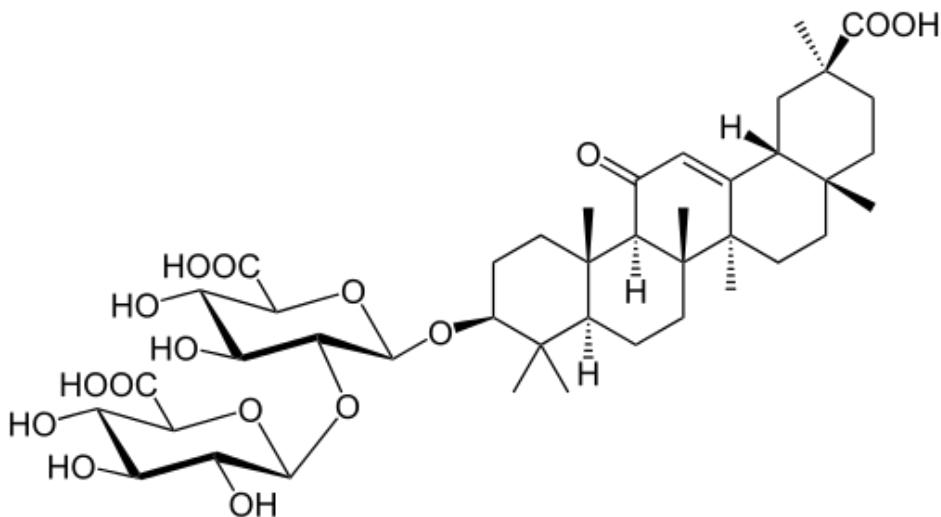


Рисунок 12 – Структура глицирризиновой кислоты.

Глицирризиновая кислота (ГК), хотя и не является полисахаридом, обладает всеми необходимыми свойствами для использования в качестве молекулы «хозяина» в системе доставки по типу «гость-хозяин». Данное соединение является природным сапонином, выделяемым из корня солодки *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. При ферментативном гидролизе в кишечнике ГК переходит в глицирретовую кислоту, которая подвергается абсорбции и обладает рядом фармакологических свойств: противовирусным, противоопухолевым, гепатопротекторным, противопаразитарным, антибактериальным, противовоспалительным и др. ГК применяется в кондитерских изделиях, в качестве компонентов травяных чаев, вкусовых добавок (Толстиков Г. А. и др., 2007; Graebin C. S. et al., 2016). Благодаря своей амфифильной структуре ГК способна формировать самоассоциаты - мицеллы в водном растворе (Dushkin A. V. et al., 2012).

Важной особенностью растворов ГК является возможность включения липофильных малорастворимых молекул в структуру мицелл или других самоассоциатов, тем самым значительно повышая общую концентрацию их молекул в свободном и связанном виде в водных растворах. Строение

самоассоциатов ГК в растворе зависит от ее концентрации и рН раствора. При низких концентрациях (10^{-5} - 10^{-3} М) и в щелочных рН ГК преимущественно образует димер, тогда как при концентрациях выше 10^{-3} М в слабокислых растворах она предположительно образует большие мицеллоподобные агрегаты.

Показано, что ГК способна увеличивать проницаемость и снижать модуль упругости клеточных мембран (Selyutina O. Y. et al., 2016). Возможным объяснением этого является способность ГК образовывать комплексы с холестерином и извлекать его из клеточной мембраны. Кроме того, гидрофобные фрагменты ГК могут встраиваться в гидрофобный внутренний слой мембраны и изменять ее свойства.

Однако использование чистой ГК в качестве «носителя» лекарственных молекул имеет недостаток в явлении «желирования» ее концентрированных растворов. Использование ее двузамещенных солей щелочных металлов позволяет устранить это явление. Эти соли обладают высокой растворимостью и их растворы не склонны к желированию. При этом в водных растворах, за счет процессов гидролиза, происходит высвобождение ГК, причем ее молекулы также образуют самоассоциаты – мицеллы и комплексы, по своим характеристикам практически не отличающиеся от таковых, характерных для чистой ГК. В случае трехзамещенных солей ГК, затрудняется образование мицелл – основных «носителей» лекарственных молекул из-за «подщелачивания» их растворов (Meteleva E. S. et al., 2018).

Несмотря на достигнутые результаты, имеющиеся современные методы повышения растворимости и абсорбции/биодоступности лекарственных веществ не лишены недостатков. При получении комплексов с циклодекстринами и др. или твердых дисперсий с различными носителями, как правило, используются процессы с участием жидких фаз – растворение или плавление – которые сложны в технологическом исполнении, трудно масштабируемы и не всегда обеспечивают химическую стабильность используемых веществ. Кроме того, остаточные количества растворителя негативно отражаются на стабильности твердых

продуктов, а применение расплавов зачастую невозможно, так как многие лекарственные вещества термически нестабильны. Также при комплексообразовании с ЦД всегда необходимо учитывать размер молекулы «гостя», поскольку внутренняя полость ЦД ограничена жесткостью его химической структуры, а прочность комплексов зависит от геометрического соответствия полости и молекулы ЛС.

Перспективным способом повышения растворимости и фармакологической активности лекарственных веществ является твердофазное механохимическое получение их композиций/твёрдых дисперсий, которые в водных растворах образуют супрамолекулярные комплексы-включения. Такой способ имеет следующие преимущества:

- отсутствие жидких фаз – расплавов, растворов;
- уменьшение возможных не желательных химических процессах, связанных с термическим разложением или взаимодействии с растворителями;
- синтез происходит в одну стадию;
- возможность получать дисперсии с нерастворимыми в воде или термически не стабильными веществами.

Все исследуемые в настоящей работе комплексы-включения получены именно описанным выше методом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

В экспериментах использовали 2480 аутбредных мышей CD-1 обоих полов весом 25-35 г., 270 крыс сток Wistar обоих полов весом 180-220г, 20 крыс самцов линии НИСАГ весом 280-350г, 100 золотистых хомячков *M. auratus* массой 100-130 г. Животные были получены из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН, где их содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и стандартному гранулированному корму. После карантина животные были рандомизированы по весу и разделены на группы по 10 мышей одного пола, 5 крыс, 3-11 хомячков в каждой. Работы с животными проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, Приказу МЗ РФ № 708 Н от 28 августа 2010 г., ГОСТ 33044 – 2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

2.2. Исследуемые соединения

В работе использовали следующие вещества: Ацетилсалициловая кислота (CAS 50-78-2), Sigma-Aldrich, Напроксен (CAS 22204-53-1), Alfa Aesar, Ибuproфен (CAS 15687-27-1), Sigma-Aldrich, Аторвастатин (CAS 344423-98-9) Sigma-Aldrich, Симвастатин (CAS 79902-63-9) Sigma-Aldrich, Нифедипин (CAS 21829-25-4) Sigma-Aldrich, Варфарин (CAS 81-81-2) Fluka, Альбендазол (CAS 54965-21-8) Sigma-Aldrich, Празиквантел (CAS 55268-74-1) Sigma-Aldrich, Арабиногалактан, выделенный из древесины лиственниц *Larix sibirica* и *Larix Gmelinii* ОАО «Аметис» (содержание основного вещества > 97%), Динатриевая соль глицерризиновой кислоты Shaanxi Sciphar Biotechnology, Пуромицин

гидрохлорид (CAS 58-58-2) Acros Organics. Комплексы
Ибупрофен:Арабиногалактан (ИБ:АГ), Ацетилсалициловая
кислота:Арабиногалактан (АСК:АГ), Напроксен:Арабиногалактан (НАП:АГ),
Аторвастатин:Арабиногалактан (АТ:АГ), Симвастатин:Арабиногалактан
(СИМ:АГ), Нифедипин:Арабиногалактан (НФ:АГ), Варфарин:Арабиногалактан
(ВФ:АГ), Альбендазол:Арабиногалактан (АБЗ:АГ),
Празиквантел:Арабиногалактан (ПЗК:АГ) с соотношением 1:10 по массе,
Аторвастатин:Динатриевая соль глицерризиновой кислоты (АТ:Na₂ГК),
Варфарин:Динатриевая соль глицерризиновой кислоты (ВФ:Na₂ГК),
Празиквантел:Динатриевая соль глицерризиновой кислоты (ПЗК:Na₂ГК) с
соотношением 1:10 по массе, а также Симвастатин:Динатриевая соль
глицерризиновой кислоты (СИМ:Na₂ГК) с соотношением 1:4 по массе получены
из ИХТТМ СО РАН (Группа механохимии органических соединений, рук. д.х.н
проф. Душкин А.В.).

Комплексы получали по следующей процедуре: смеси субстанций с
АГ/Na₂ГК, взятые в весовых соотношениях 1:4, 1:10 были подвергнуты обработке
ударно-истирающими воздействиями в шаровой ротационной/валковой мельнице
ВМ-1, в течение 2-24 часов (механическая активация). Затем были определены
водорастворимость субстанций (таблица 3) и измерены времена спин-спиновой
релаксации их протонов (¹H ЯМР спектры на спектрометре ЯМР AVHD-500X
(Bruker BioSpin AG), выполнено д.х.н. Поляковым Н.Э. ИХКГ СО РАН) в водных
растворах исходной субстанции и полученных комплексов. Для исследования
водорастворимости, 0,6 г навески исследуемого материала суспендировали в 10
мл дистиллированной воды при +25°C на орбитальном шейкере (170 об/мин) в
течение 4 часов. Концентрация субстанций в растворе определялась
хроматографированием на хроматографе Agilent 1200 (колонка Zorbax Eclipse
XDB-C18, 4.6×50 мм; температура колонки 30 °C, элюент – система
ацетонитрил/вода 1/1, скорость потока 1 мл/мин., объем пробы 5мкл,
детектирование на длинах волн 230,8 и 290,8 нм) относительно приготовленных
калибровочных образцов спиртовых растворов. Дополнительно

комплексообразование контролировалось методами дифференциальной сканирующей колориметрии (ДСК) (рисунок 13-21) и рентгенофазовым анализом (рисунок 22-29) (Dushkin A. V. et al., 2010; Dushkin A. V. et al., 2010; Meteleva E. S. et al., 2018; Kong R. et al., 2018). Наблюдаемый процесс аморфизации и изменение температур плавления указывают на образование комплексов между ЛС и носителем.

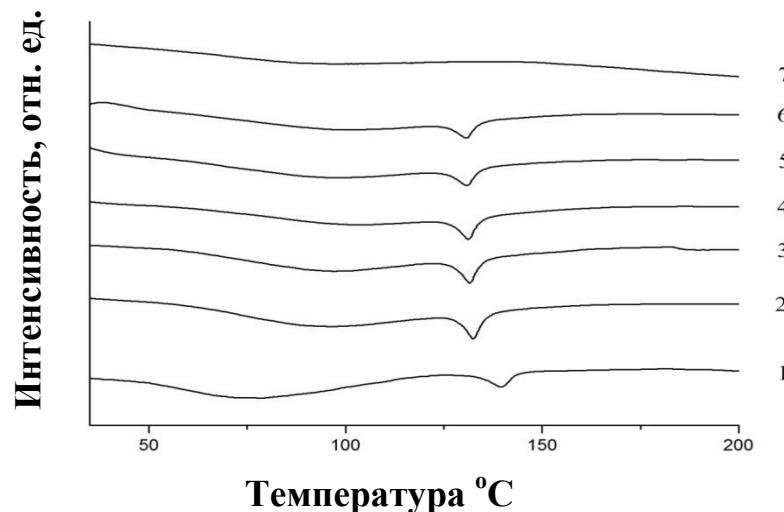


Рисунок 13 – Термограммы ДСК: 1- ACK:АГ 1:10 физическая смесь, 2 – ACK:АГ 1:10 ВМ 2ч., 3 – ACK:АГ 1:10 ВМ 4ч. , 4 – ACK:АГ 1:10 ВМ 8ч., 5 – ACK:АГ 1:10 ВМ 16 ч., 6 – ACK:АГ 1:10 ВМ 24 ч. 7 - Арабиногалактан.

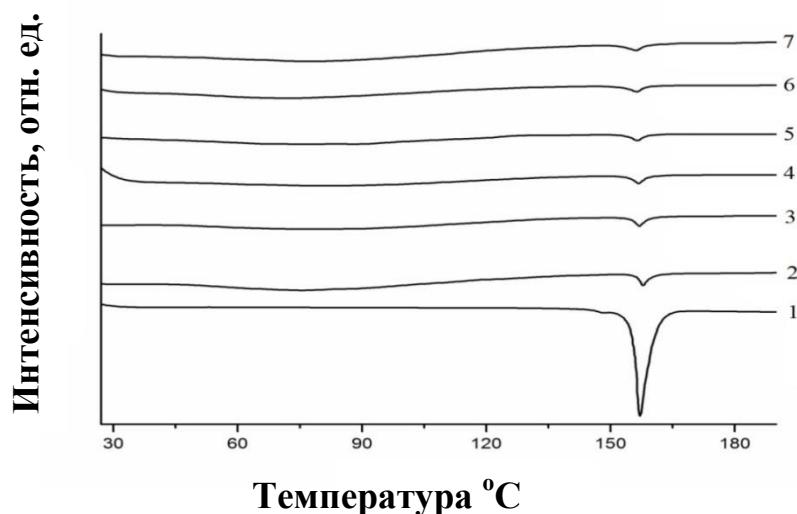


Рисунок 14 – Термограммы ДСК: 1 – НАП, 2 – НАП:АГ 1:10 физическая смесь, 3 – НАП:АГ 1:10 ВМ 2ч, 4 – НАП:АГ 1:10 ВМ 4ч, 5 – НАП:АГ 1:10 ВМ 8ч, 6 – НАП:АГ 1:10 ВМ 16ч, 7 – НАП:АГ 1:10 ВМ 24ч.

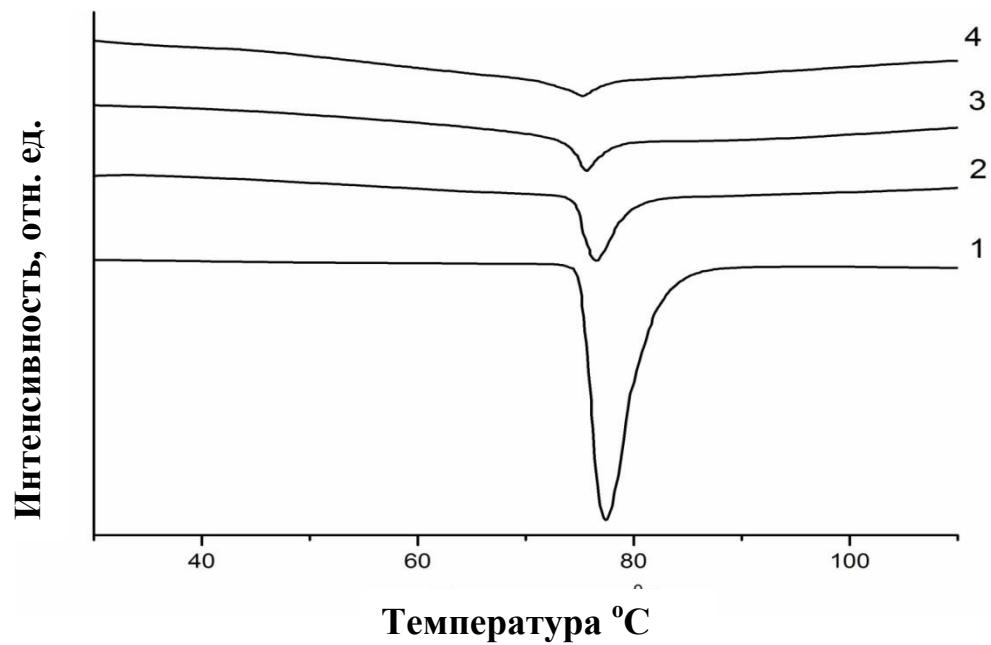


Рисунок 15 – Термограммы ДСК: 1 – ИБ, 2 – ИБ:АГ 1:10 физическая смесь, 3 – ИБ:АГ 1:10 ВМ 8ч, 4 – ИБ:АГ 1:10 ВМ 24ч.

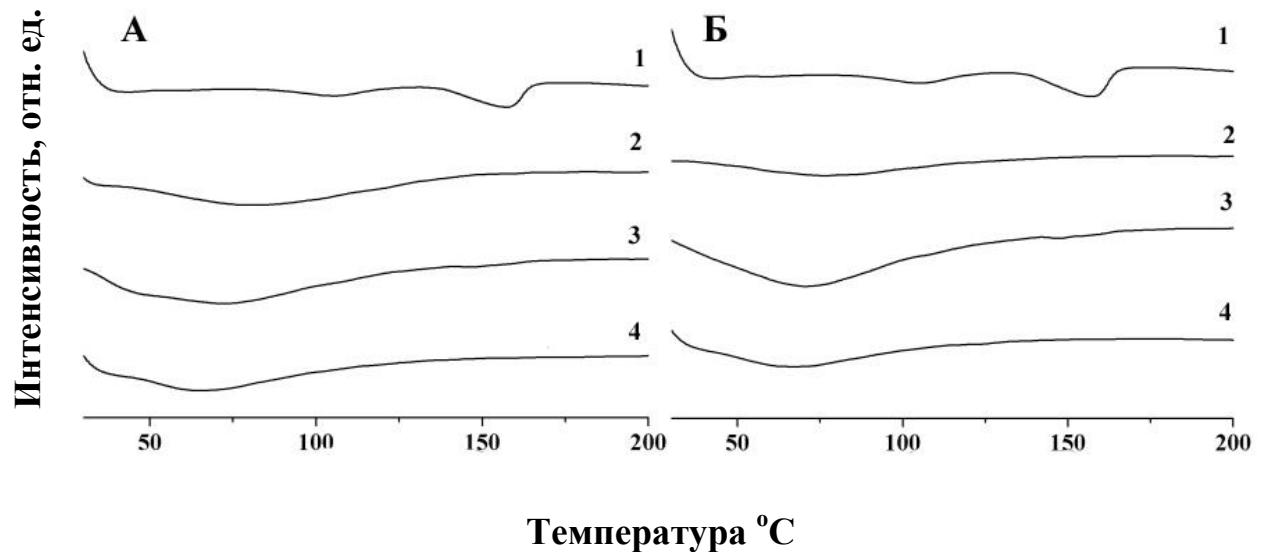


Рисунок 16 – Термограммы ДСК. А: 1 – АТ, 2 – АГ, 3 – АТ:АГ 1:10 ФС, 4 - АТ:АГ 1:10 24ч; Б: 1 – АТ, 2 – $\text{Na}_2\text{ГК}$, 3 – АТ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10 ФС, 4 - АТ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10 24ч.

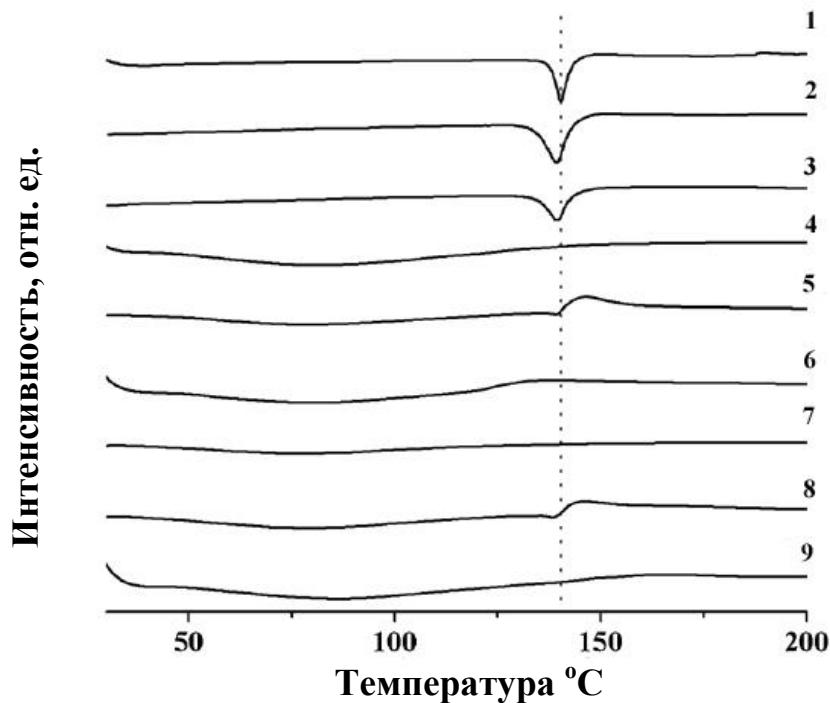


Рисунок 17 – Термограммы ДСК. 1- СИМ, 2- СИМ мельница 5 мин., 3 - СИМ мельница 10 мин., 4 – АГ, 5 – СИМ:АГ 1:10 ФС, 6 – СИМ:АГ 1:10 2 ч, 7 – $\text{Na}_2\text{ГК}$, 8 – СИМ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:4 ФС, 9 - СИМ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:4 24 ч.

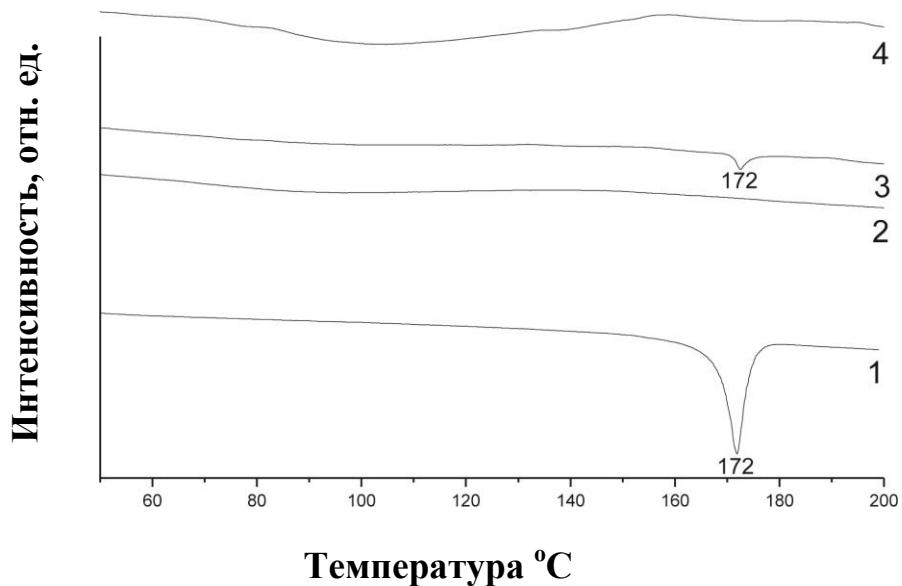


Рисунок 18 – Термограммы ДСК. 1- НФ, 2- АГ, 3 - НФ:АГ 1:10 ФС, 4 – НФ:АГ 1:10 2 ч.

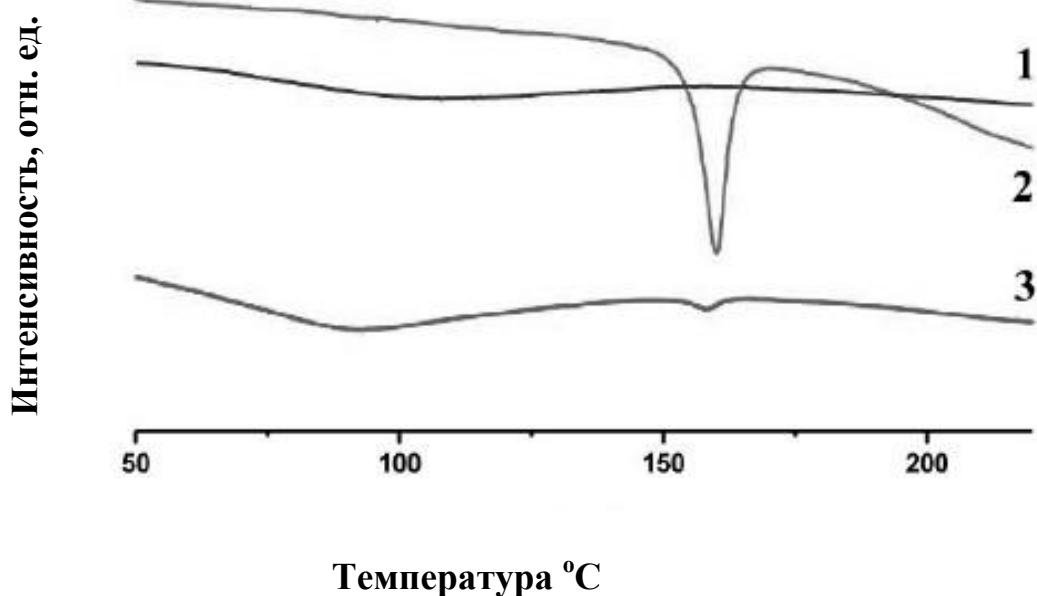


Рисунок 19 – Термограммы ДСК. 1 – АГ, 2 – ВФ, 3 – ВФ:АГ 1:10

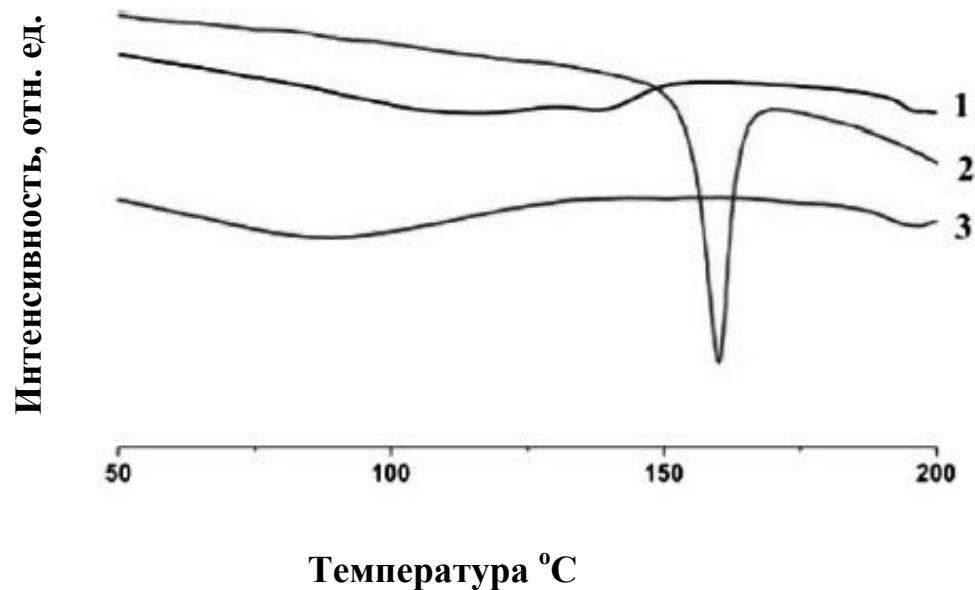


Рисунок 20 – Термограммы ДСК. 1 – ГК, 2 – ВФ, 3 – ВФ:ГК 1:10.

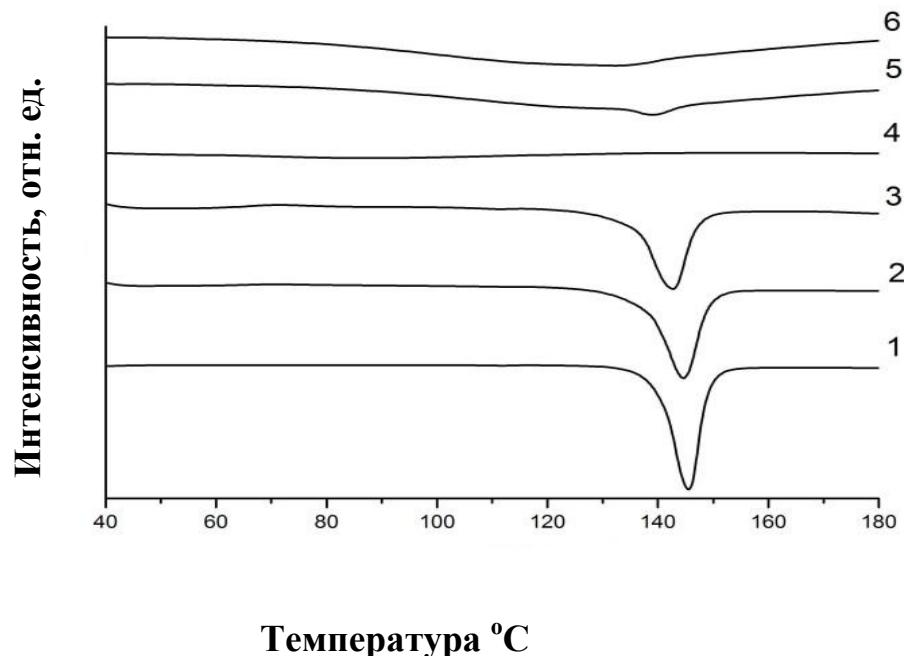


Рисунок 21 – Термограммы ДСК. 1 – исходный ПЗК, 2 – ПЗК, обработанный в АГО-2 (20g, 5мин.), 3 – ПЗК, обработанный в АГО-2 (40g, 5мин.), 4 – $\text{Na}_2\text{ГК}$, 5 – физическая смесь ПЗК/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1/10, 6 - смесь ПЗК/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1/10 обработанная в мельнице ВМ в течение 4ч.

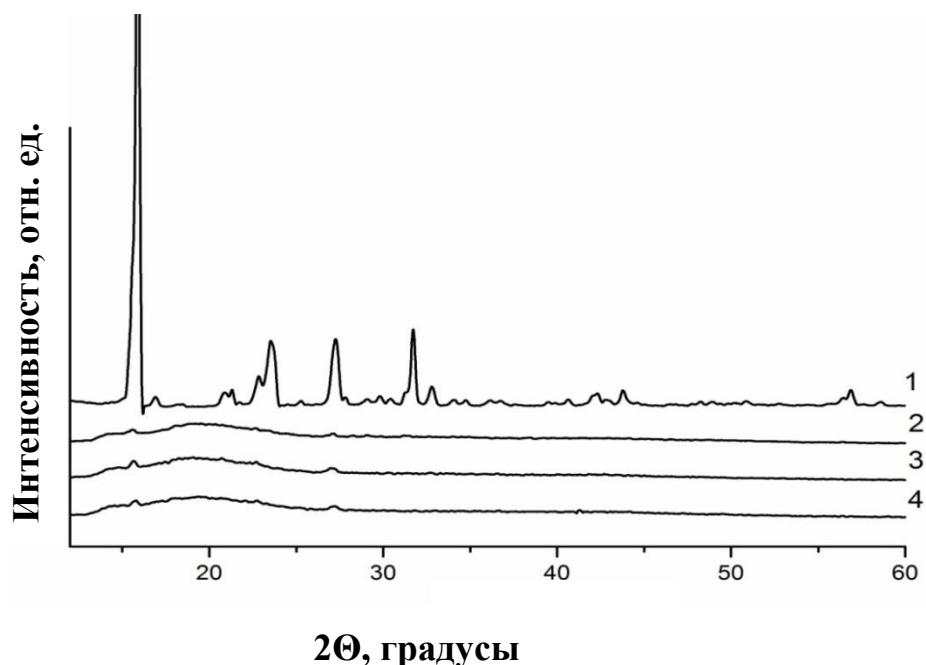


Рисунок 22 – Рентгенограммы: 1 – ACK, 2 – ACK:АГ 1:10 физическая смесь, 3 – ACK:АГ 1:10 ВМ 8ч, 4 – ACK:АГ 1:10 ВМ 24ч.

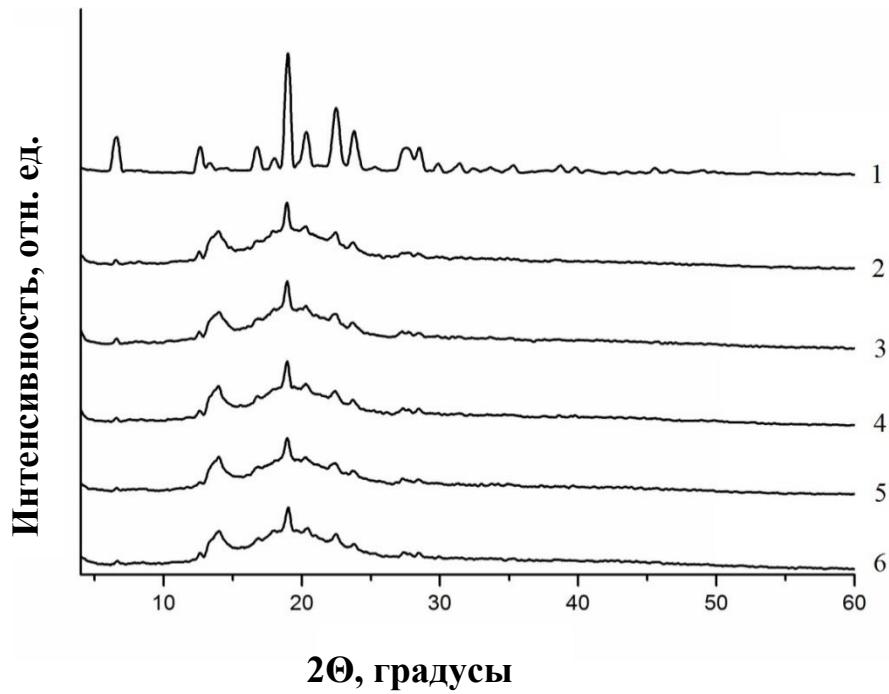


Рисунок 23 – Рентгенограммы: 1 – НАП, 2 – НАП:АГ 1:10 ВМ 2ч, 3 – НАП:АГ 1:10 ВМ 4ч, 4 – НАП:АГ 1:10 ВМ 8ч, 5 – НАП:АГ 1:10 ВМ 16ч, 6 – НАП:АГ 1:10 ВМ 24ч.

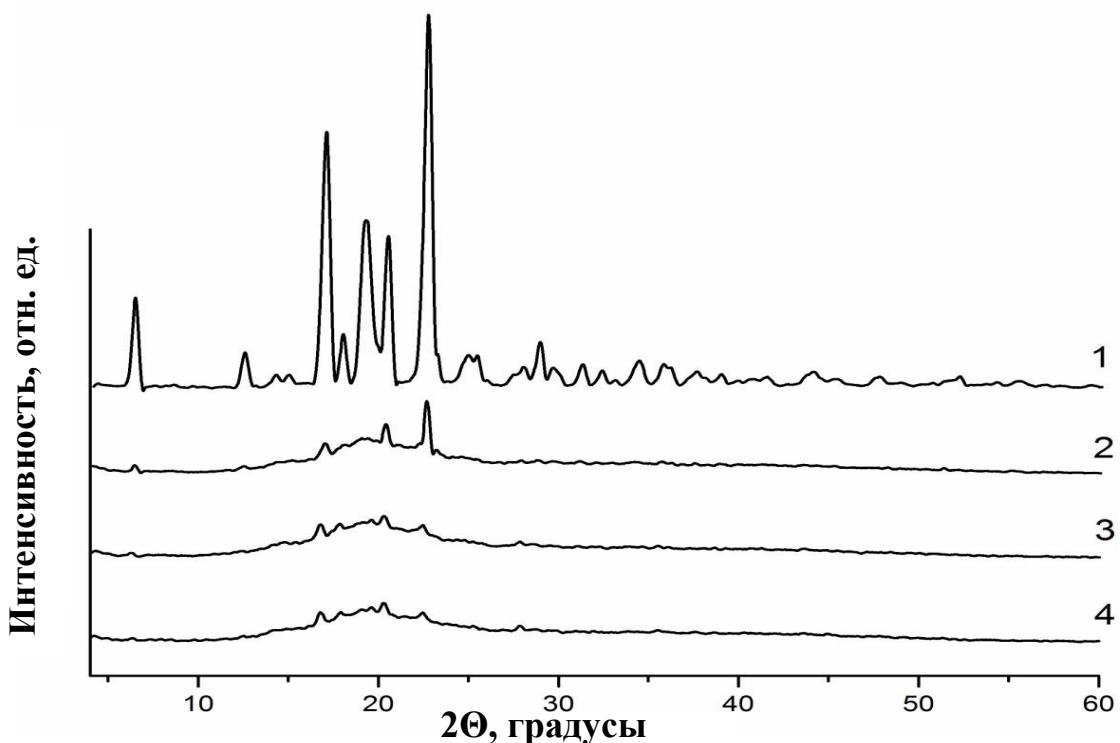


Рисунок 24 – Рентгенограммы: 1 – ИБ, 2 – ИБ:АГ 1:10 физическая смесь, 3 – ИБ:АГ 1:10 ВМ 8ч, 4 – ИБ:АГ 1:10 ВМ 24ч.

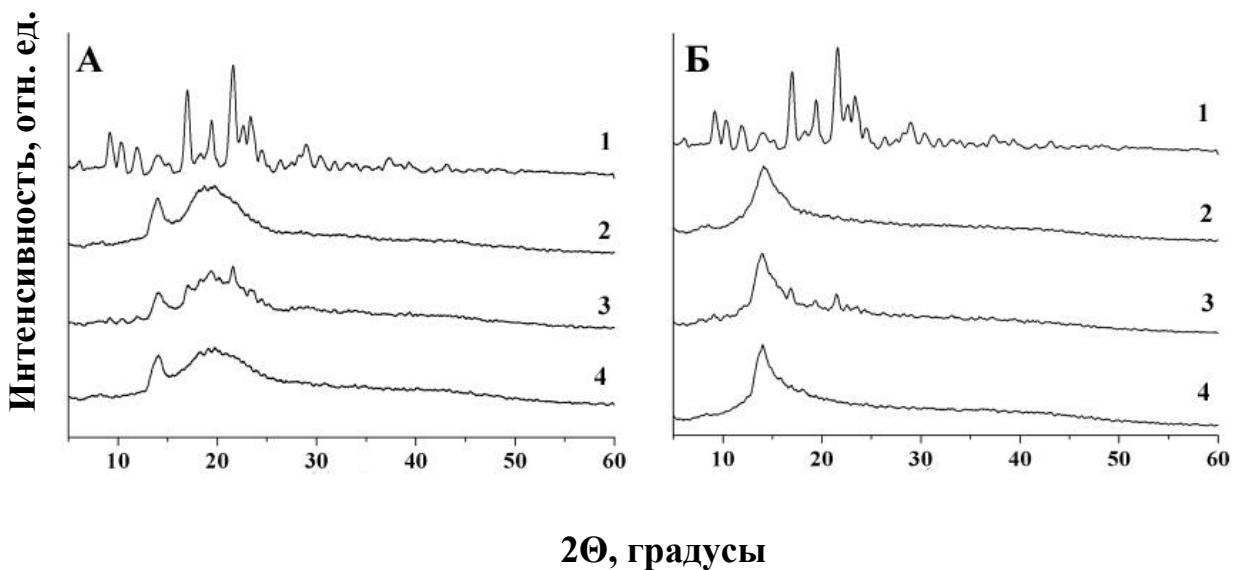


Рисунок 25 – Рентгенограммы. А: 1 – АТ, 2 – АГ, 3 – АТ:АГ 1:10 ФС, 4 - АТ:АГ 1:10 24ч; Б: 1 – АТ, 2 – $\text{Na}_2\text{ГК}$, 3 – АТ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10 ФС, 4 - АТ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10 24 ч.

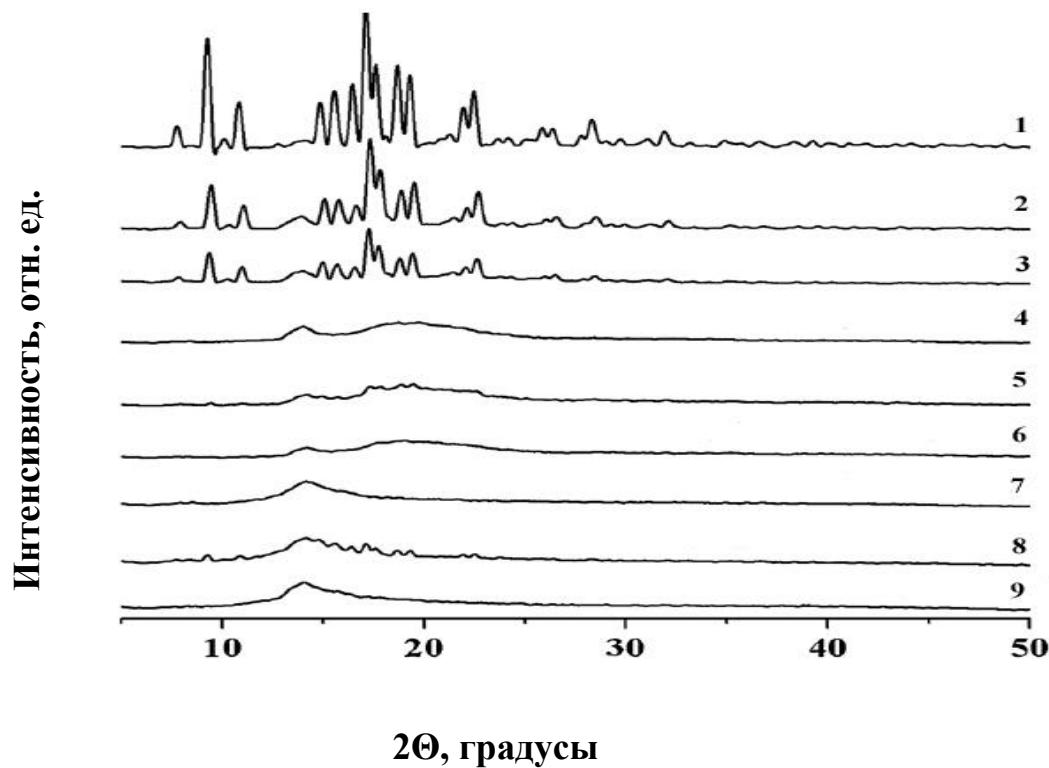
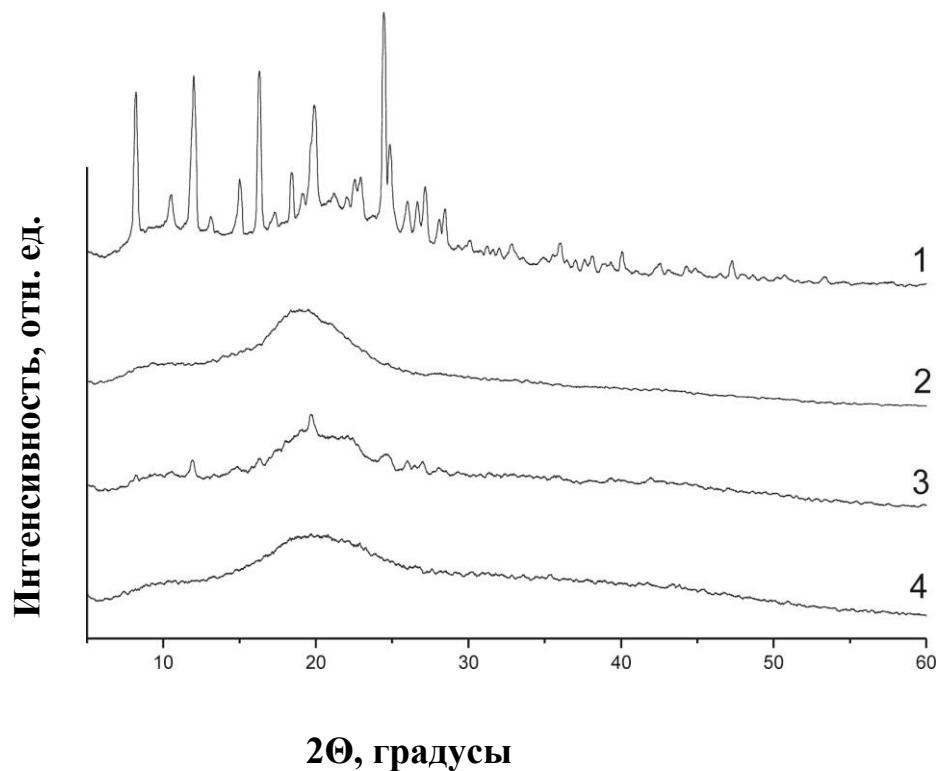
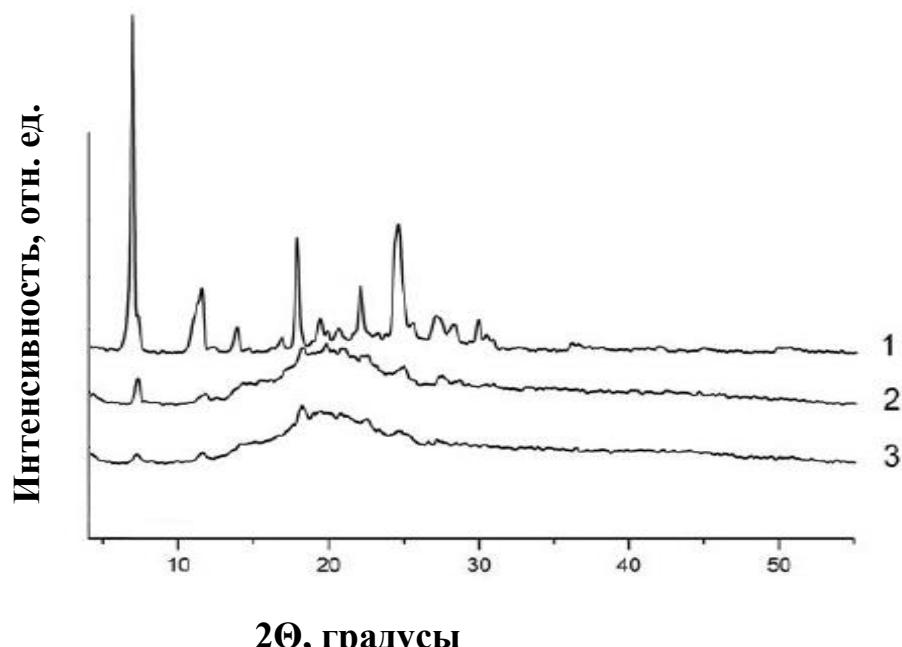


Рисунок 26 – Рентгенограммы. 1- СИМ, 2- СИМ мельница 5 мин., 3 - СИМ мельница 10 мин., 4 – АГ, 5 – СИМ:АГ 1:10 ФС, 6 – СИМ:АГ 1:10 2 ч, 7 – $\text{Na}_2\text{ГК}$, 8 – СИМ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:4 ФС, 9 - СИМ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:4 24 ч.



2Θ , градусы

Рисунок 27 – Рентгенограммы. 1- НФ, 2- АГ, 3 - НФ:АГ 1:10 ФС, 4 – НФ:АГ 1:10 2 ч.



2Θ , градусы

Рисунок 28 – Рентгенограммы. 1 – АБЗ, 2 – АБЗ:АГ 1:10 ФС, 3 – АБЗ:АГ 1:10 2ч.

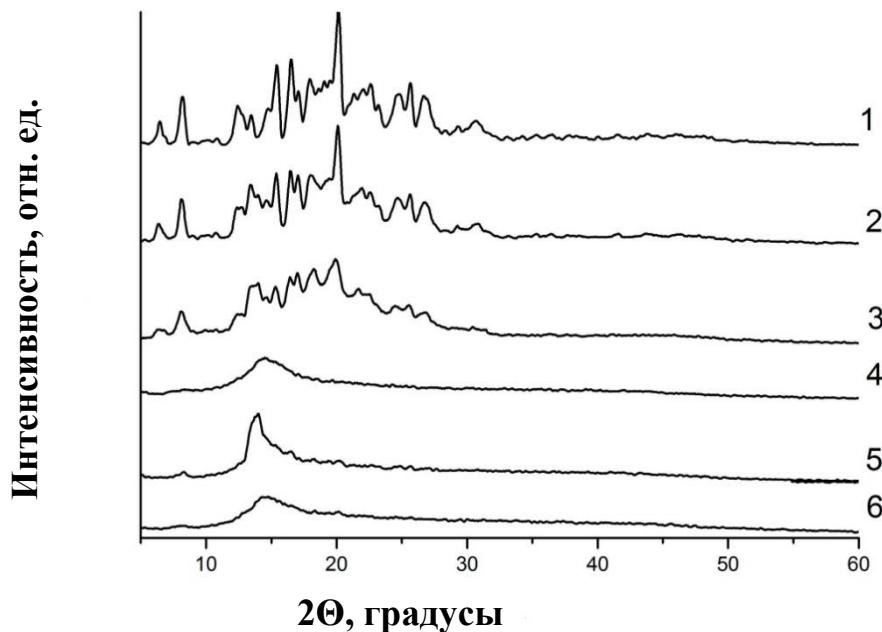


Рисунок 29 – Рентгенограммы. 1 – исходный ПЗК, 2 – ПЗК, обработанный в АГО-2 (20г, 5мин.), 3 – ПЗК, обработанный в АГО-2 (40г, 5мин.), 4 – $\text{Na}_2\text{ГК}$, 5 – физическая смесь ПЗК/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1/10, 6 - смесь ПЗК/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1/10 обработанная в мельнице ВМ в течение 4ч.

Таблица 3 – Растворимость исследуемых веществ в воде.

Образец	Концентрация ЛС, г/л
АСК	2,55
АСК:АГ 1:10 физическая смесь	2,55
АСК:АГ 1:10 ВМ	2,77
ИБ	0,07
ИБ:АГ 1:10 физическая смесь	0,07
ИБ:АГ 1:10 ВМ	0,13
НАП	0,07
НАП:АГ 1:10 физическая смесь	0,084
НАП:АГ 1:10 ВМ	0,09
АТ	0,131
АТ:АГ 1:10 физическая смесь	0,144
АТ:АГ 1:10	0,417

АТ:Na ₂ ГК 1:10 физическая смесь	0,666
АТ:Na ₂ ГК 1:10	2,02
СИМ	0,0028
СИМ:АГ 1:10 физическая смесь	0,0058
СИМ:АГ 1:10	0,021
СИМ:Na ₂ ГК 1:4	0,13
НФ	0,0136
НФ:АГ 1:10 10	0,083
ВФ	0,021
ВФ:АГ 1:10	0,111
ВФ:ГК 1:10	0,295
АБЗ	0,004
АБЗ:АГ 1:10 физическая смесь	0,045
АБЗ:АГ 1:10	0,14
ПЗК	0,234
ПЗК:АГ 1:10	0,89
ПЗК:Na ₂ ГК 1:10 физическая смесь	0,566
ПЗК:Na ₂ ГК 1:10	0,687

Все вещества растворяли в дистиллированной воде (чистые вещества предварительно перемешивали с 1-2 каплей твина 80) и вводили животным внутрижелудочно натощак.

2.3. Фармакологические модели и тесты

2.3.1. Модели экспериментальной боли

«Горячая пластина» (Миронов А.Н. и др., 2012). Горячая пластина является моделью термического болевого раздражения. Через час после введения агентов животное помещали на нагретую до 54°С металлическую пластину и

фиксирували латентное время болевой реакции до первого облизывания мышью задней лапы, либо до прыжка. Аналгетическую активность представляли в виде среднего значения времени до болевой реакции по группе.

«Уксусные корчи» (Morozova E.A. et al, 2008). Уксусные корчи представляют собой модель химической висцеральной боли. Через час после введения агентов мышам вводили внутрибрюшинно 0,75% уксусную кислоту из расчета 0,1мл/10г веса. Через 5 минут после введения уксусной кислоты в течение трех минут измеряли количество корчей. Корчи являются специфическими болевыми реакциями, выражаяющимися в вытягивании животным задних лап и прогибом спины. Аналгетическая активность была представлена в виде среднего количества корчей для каждой группы.

2.3.2. Модель воспаления

«Гистаминовый отек» (Тринус Ф.Н. и др., 1974). Через час после введения исследуемых веществ мышам под апоневроз левой задней лапы вводили 0,05 мл 1% раствора гистамина. По прошествии 5 часов после введения флогогена, животных умерщвляли, отрезали их задние лапы по линии запястного сустава и измеряли их массу. Противовоспалительную активность представляли в виде среднего для каждой группы значения процента воспаления. Процент воспаления рассчитывали для каждой мыши по следующей формуле:

$$ПВ = \frac{m_{вл} - m_{кл}}{m_{кл}} * 100\%$$

где ПВ - процент воспаления, $m_{кл}$ - масса контрольной лапы, $m_{вл}$ – масса воспаленной лапы.

Дозы комплексов АСК, ИБ, НАП с АГ использованные в экспериментах представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Дозы АСК, ИБ, НАП в комплексе с АГ.

	«Горячая пластина»	«Уксусные корчи»	«Гистаминовый отек»
Ибупрофен	20 и 40 мг/кг	20 и 40 мг/кг	20 и 40 мг/кг
ИБ:АГ 1:10	200 и 400 мг/кг	200 и 400 мг/кг	200 и 400 мг/кг
АСК	25 и 50 мг/кг	25 и 50 мг/кг	50 и 100 мг/кг
АСК:АГ 1:10	250 и 500 мг/кг	250 и 500 мг/кг	500 и 1000 мг/кг
Напроксен	10 и 20 мг/кг	10 и 20 мг/кг	10 и 20 мг/кг
НАП:АГ 1:10	100 и 200 мг/кг	100 и 200 мг/кг	100 и 200 мг/кг

2.3.3. Модель острой экспериментальной гиперлипидемии у крыс, индуцированной детергентом WR 1339

Для оценки гиполипидемического действия комплексов АТ:АГ/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10 и СИМ:АГ/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10/4 была использована модель гиперлипидемии, воспроизводимая у экспериментальных животных (мыши) при внутрибрюшинном введении 7% раствора тритона WR 1339 (Tyloxapol, CAS 25301-02-4, Sigma), являющегося неионным детергентом. После введения этого детергента, развитие гиперлипидемии происходит в последующие 18-24 часа за счет блокирования периферических липопротеинлипаз (Patel A. R. et al., 2007).

Исследуемые вещества вводили внутрижелудочно натощак один раз в сутки в течение 4х дней. Через 1 час после последнего введения всем животным опытных и контрольной групп вводили в/б раствор тритона WR 1339 из расчета 0,1 мл/10 г массы тела. Комплексы АТ:АГ/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:10 вводили в дозах 550 и 1100 мг/кг, АТ вводили в эквивалентных дозах 50 и 100 мг/кг. Комплекс СИМ:АГ 1:10 вводили в дозах 440 и 880 мг/кг, комплекс СИМ / $\text{Na}_2\text{ГК}$ 1:4 вводили в дозах 200 и 400 мг/кг. СВ вводили в дозах 40 и 80 мг/кг. Через сутки после введения тритона WR 1339 животных забивали путем декапитации, кровь собирали и центрифугировали 15 мин. при 3000 об./мин. для получения сыворотки. Определяли количество общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) с

использованием стандартных наборов (Ольвекс диагностикум, Россия) на спектрофотометре StatFax 3300 (США).

2.3.4. Определение гипотензивного действия

Исследование гипотензивного действия проводили путем наложения хвостовой манжеты бодрствующим животным (крысы Wistar и НИСАГ) (LE 5007 Automatic blood pressure computer (Letica, Испания). Перед измерением артериального давления всех животных нагревали путем помещения в специализированную камеру с подачей теплого воздуха (38°C). Данная процедура являлась необходимой для равномерного расширения сосудов и улучшения определения пульсовой волны пульсометром на хвосте животного. Использовали следующие временные интервалы после введения исследуемых веществ: 30, 60 и 90 минут. В каждой точке проводили не менее трех измерений с интервалом 20 секунд и затем усредняли полученные значения. Предварительно введению исследуемых веществ, у всех животных измеряли исходное АД и, согласно полученным данным, проводили рандомизацию по группам.

Комплекс НФ:АГ вводили перорально натощак (> 12ч) в дозах 17,5 и 35 мг/кг, НФ вводили в эквивалентных дозах 1,75 и 3,5 мг/кг.

2.3.5. Определение протромбинового времени

Определение протромбинового времени (ПВ) проводили через 24 ч, 48 ч после однократного введения комплекса ВФ:АГ 1:10 в дозе 20 мг/кг; через 24 ч, 30 ч, 54 ч после однократного введения комплекса ВФ: Na₂ГК 1:10 в дозе 20 мг/кг. ВФ во всех экспериментах вводили в дозе 2 мг/кг. Кровь забирали в вакуумные пробирки с 3,8% цитратом натрия (Vacuette, Австрия) у наркотизированных (тиопентал натрия в/б, 30 мг/кг) животных (крысы) путем трансторакальной пункции сердца. Плазму крови получали путем центрифугирования в течение 15 мин. при 3000 об./мин. Определение ПВ осуществляли с использованием

стандартного набора «Техпластин-тест» (Технология-Стандарт, Россия) на коагулометре 1А (Hospitex Diagnostics S. A., Италия).

2.3.6. Исследование противоописторхозной активности

Выполнено в Лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ИЦИГ СО РАН (зав. лаб., д.б.н. Мордвинов В. А.).

Для воспроизведения модели описторхоза хомяков *M. auratus* за 2 месяца до проведения эксперимента заражали 100 метацеркариями *O. felineus*. После этого животным вводили исследуемые вещества однократно, либо несколько дней подряд один раз в сутки в зависимости от выбранной схемы введения. Комплекс АБЗ:АГ 1:10 вводили перорально в дозах 100, 50 и 25 мг/кг, АБЗ вводили перорально в дозах 500, 100, 50 и 25 мг/кг. Через 3 недели от начала эксперимента животных умерщвляли и определяли количество червей в желчных протоках печени.

2.3.7. Оценка влияния агентов на слизистую желудка

Комплексы ИБ:АГ, АСК:АГ, НАП:АГ в дозах 200 и 400, 250 и 500, 100 и 200 мг/кг, соответственно, и ИБ, АСК, НАП в дозах 20 и 40, 25 и 50, 10 и 20 мг/кг, соответственно, вводили животным внутрижелудочно ежедневно натощак (голод > 12 часов) в течение 30 дней. После этого животных умерщвляли и извлекали желудки. После промывки проточной водой регистрировали наличие/отсутствие гиперемии, эрозий и язв. Далее проводили гистоморфологическую оценку данных желудков.

Гистологическое исследование

Полученный для морфологического исследования материал подвергали гистологической обработке на комплексе MICROM («Карл Цейс» Германия) по стандартной методике:

фиксация в 10% растворе формалина в течение 5 суток;

промывка образцов в проточной воде не менее 4 - 5 часов;

автоматическая проводка на аппарате НМР 110 по схеме (Р. Лилли, 1969):

этанол 60° – 30 мин,

этанол 70° – 1 час,

этанол 80° – 1 час,

этанол 96° – 1 час 10 мин,

бутанол – 1 час,

этанол – ксиол – 30 мин,

ксиол I – 40 мин,

ксиол II – 40 мин,

гистопласт I – 3 часа при t^o – 60°C (температура плавления гистопласта – 58°C),

гистопласт II – 5 часов при t^o – 60°C;

заливка в парафиновые блоки на станции АР 280 (для заливки в блоки используется гистопласт с t^o плавления 58°C);

изготовление на ротационном микротоме НМ 335Е срезов толщиной 3–5 мкм, использование в работе одноразовых сменных лезвий;

обзорная окраска гематоксилином Лилли – Майера и 10 % эозином (Р. Лилли, 1969) в автомате HMS 70 - время окраски 1 час 15 мин. В автомате одновременно окрашивается 70 препаратов;

– заключение в бальзам Shandonmount.

Окрашенные препараты исследовали методом световой микроскопии в проходящем свете на микроскопе Axioskop 40. Микрофотографии сделаны при помощи фотокамеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss).

2.4. Фармакокинетические исследования

Ибупрофен в дозах 20, 40 мг/кг и комплекс ИБ:АГ в дозах 200, 400 мг/кг вводили мышам перорально натощак (12 часов голодания).

Кровь у животных забирали сразу после декапитации через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минут после введения веществ. Для получения сыворотки крови пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Образцы замораживали до проведения анализа. Содержание исследуемых веществ в сыворотке крови определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (проведено в ИХКГ СО РАН, Лаборатория наночастиц, зав. д.х.н. А.А. Онишук). Использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 (производства ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», Новосибирск, 2011) с УФ-детектором, оснащенный колонкой Ø2x75 мм с обращенно-фазовым сорбентом ProntoSil 100-5 C18.

Нифедипин в дозах 1,75, 3,5 мг/кг и НФ:АГ 1:10 в дозах 17,5, 35 мг/кг вводили крысам Wistar и НИСАГ натощак однократно *per os*. Через 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 и 5 часов отбирали образцы крови из хвоста (200 мкл) в пробирки с 3,8% цитратом натрия (соотношение 9:1). Образцы замораживали до проведения анализа.

Варфарин в дозе 0,5 мг/кг и ВФ:АГ 1:10 в дозе 5 мг/кг вводили крысам перорально натощак однократно в сутки в течение трех дней. Через 1, 4, 6, 12, 24, 25, 28, 30, 36, 48, 49, 52, 54, 60, 72, 78, и 96 ч после введения из хвоста отбирали кровь по 200 мкл в пробирки с 3,8% цитратом натрия (соотношение 9:1). Для получения плазмы крови пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Образцы замораживали до проведения анализа. Содержание ВФ и НФ в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии на Agilent 6410 QQQ (выполнено в Центре масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН, зав. к.х.н. Черноносов А.А.).

Аторвастатин в дозе 50 мг/кг и комплекс АТ:АГ/Na₂ГК 1:10 в дозе 550 мг/кг вводили мышам натощак однократно *per os*. Кровь собирали после декапитации

через 15, 30, 60, 90, 120, 240 и 360 мин. Для получения сыворотки крови пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Образцы замораживали до проведения анализа.

Симвастатин в дозе 40 мг/кг, СИМ:АГ 1:10 в дозе 440 мг/кг, СИМ:Na₂ГК 1:4 в дозе 200 мг/кг вводили мышам однократно перорально натощак. Кровь собирали после декапитации через 15, 30, 45, 60, 90, 120 и 240 мин. Для получения сыворотки крови пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Образцы замораживали до проведения анализа.

ПЗК в дозе 400 мг/кг и ПЗК:АГ/Na₂ГК 1:10 в дозе 4400 мг/кг вводили мышам однократно перорально натощак, также для сравнения вводили ПЗК в дозе 40 мг/кг в/в однократно. После перорального введения кровь забирали путем декапитации через 5, 15, 30, 60, 90 минут; после в/в кровь забирали аналогичным способом через 0, 1, 5, 15, 30, 60, 90 мин. Для получения сыворотки, кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Кроме этого, через 5 и 30 мин после введения ПЗК:АГ/Na₂ГК, через 5 мин после введения ПЗК *per os*, и 1, 5 мин после введения ПЗК в/в у животных извлекали печень с последующей ее гомогенизацией. Образцы замораживали до проведения анализа.

Содержание АТ, СИМ и ПЗК в сыворотке крови и гомогенате печени определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на Agilent 1200 HPLC (выполнено в Группе механохимии органических соединений ИХТМ СО РАН, зав., д.х.н. Душкин А.В.) с УФ-детектором. Хроматографический анализ был проведен на обращенно-фазовой колонке (5 μm, 4.6×50 mm, Zorbax Eclipse SB-C18).

Во всех экспериментах с мышами каждой временной точке соответствовали минимум пять проб от разных животных. В экспериментах с крысами в каждой группе было по 5 животных.

Стандартные фармакокинетические параметры для ибuproфена, нифедипина, варфарина, аторвастатина, симвастатина, празиквантела, введенных в виде чистого вещества или в комплексе с АГ/Na₂ГК (C_{max}, T_{max}, T_{1/2}, AUC_{0-inf}),

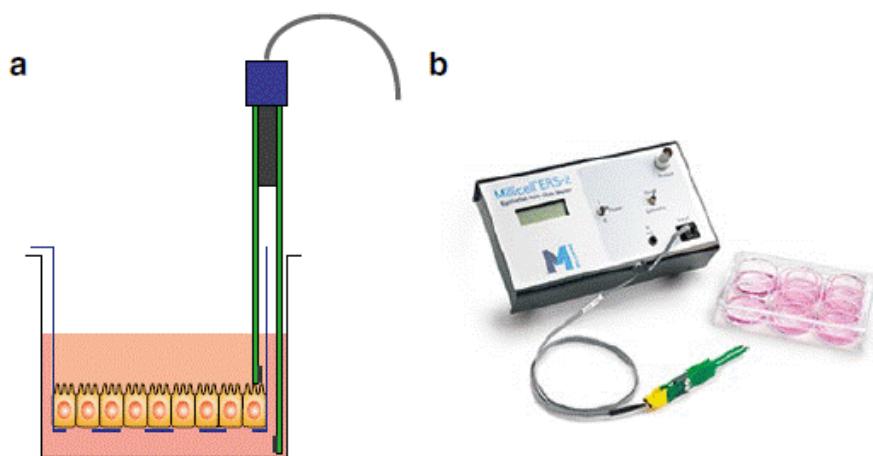
были рассчитаны в программе PKSolver (доступной бесплатно в качестве расширения для программы Microsoft Excel (Zhang Y. et al., 2010)).

2.5. Исследование проницаемости ЛС на монослое клеток Caco-2

Клеточная культура Caco-2 (клетки колоректальной аденокарциномы человека) была получена из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали стандартным способом в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM, Lonza, Швейцария) с добавлением 10% термически инактивированной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, США). Исследование проницаемости через монослой клеток Caco-2 проводили согласно стандартным процедурам (Hubatsch I. et al., 2007). Были использованы 12-луночные планшеты Transwell с 0,4 мкм мембраной из полиэстера (Corning, США, REF 3460), клетки сеяли с плотностью 1×10^5 клеток на лунку. Перед проведением эксперимента клетки выращивали в среде IMDM с добавлением 10% FBS. Среду меняли каждые двое суток.

Целостность клеточного монослоя оценивали по трансэпителиальному электрическому сопротивлению (TEER) с использованием Millicell ERS-2 (Millipore, США) в начале и в конце эксперимента. $\text{TEER} \geq 600 \Omega \text{ cm}^{-2}$ считали достаточным показателем конфлюентности. Исследуемые вещества (ПЗК, АТ) растворяли в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS, Lonza, Швейцария) в концентрациях 100 μM . АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ готовили в виде 0,5 и 2,5% растворов в HBSS. Исследуемые растворы добавляли в верхнюю часть лунки, нижнюю часть лунки заполняли чистым HBSS. После этого планшеты инкубировали при 37°C и перемешивании (80 об./мин.) на орбитальном шейкере OS-20 (Biosan, Латвия). Пробы по 150 мкл отбирали из нижней части лунки через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин. После отбора пробы, необходимый объем сразу возмещали свежим раствором HBSS.

Рисунок 30. Определение TEER. А. Измерение TEER при помощи зонда. Б. Millicell ERS-2 вольтметр.



Концентрацию веществ определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на Agilent 1200 HPLC (выполнено в Группе механохимии органических соединений ИХТМ СО РАН, зав., д.х.н. Душкин А.В.) с УФ-детектором. Хроматографический анализ был проведен на обращенно-фазовой колонке (5 μ m, 4.6×50 mm, Zorbax Eclipse SB-C18). Коэффициент проницаемости рассчитывали согласно формуле, опубликованной в литературе (Breemen R. B. et al., 2005) – $P_{app} = V_r * (dC)/(dt) * 1/AC_0$, где V_r – это объем верхней части лунки, dC/dt – это градиент общей концентрации вещества в нижней части лунки в течение времени, A – это площадь мембраны, C_0 – это начальная концентрация вещества в верхней части лунки.

2.6. Оценка проницаемости пуромицина в клетки линии STO-TG-puro с использованием МТТ-теста

Клетки STO-TG-puro были получены из ИЦИГ СО РАН. Клетки культивировали в растворе DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂ и 90% влажности.

MTT-тест проводили согласно стандартной процедуре (Mosmann T., 1983). Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 5×10^3 клеток в лунке. Через 24 часа клетки обрабатывали растворами исследуемых веществ и инкубировали 48 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Не обработанные клетки служили негативным контролем, клетки, обработанные пуромицином в концентрации 5 и 10 мкг/мл, служили положительным контролем. АГ и Na₂ГК добавляли в виде 0,5 и 2,5% раствора вместе с пуромицином в концентрации 5 и 10 мкг/мл. После инкубации клеток добавляли 10 мкл раствора MTT и снова инкубировали в течение 3 ч в аналогичных условиях. После этого, среду, содержащую MTT, удаляли и растворяли кристаллы формазана в 100 мкл изопропанола. Поглощение измеряли на длине волн 630 и 492 нм с использованием микро-планшетного считывателя (ThermoScientific, США). Процент выживаемости клеток рассчитывали по формуле: Выживаемость (%) = ОП (обработанные клетки)/ОП (не обработанные клетки) * 100, где ОП – оптическая плотность раствора.

2.7. Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0 с применением t-критерия Стьюдента и u-критерия Манна-Уитни для оценки достоверности различий. Данные представлены в формате: среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM).

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ С АГ И НА₂ГК *IN VIVO*

Для изучения АГ и НА₂ГК в качестве природных соединений улучшающих биодоступность и безопасность ЛС, были выбраны средства, относящиеся к различным фармакологическим классам, но имеющие общие свойства – плохую растворимость в воде и хорошую проницаемость через клеточные мембранны. Такие ЛС обычно относят ко второму классу БФК, которые составляют вторую по величине группу применяемых в медицине ЛС, но являются лидерами среди вновь синтезируемых молекул в медицинской химии (Bent L. Z., 2013). В работе были использованы представители нестериоидных противовоспалительных средств (НПВС), препараты, влияющие на сердечно-сосудистую систему (статины, гипотензивное средство, не прямой антикоагулянт) и противопаразитарные ЛС.

НПВС, благодаря своим противовоспалительным, анальгетическим, жаропонижающим и, отчасти, антиагрегантным свойствам являются одними из самых популярных ЛС во всем мире (McGettigan P. et al., 2013). Несмотря на это, данному классу препаратов присущи некоторые нежелательные побочные действия: ульцерогенный эффект, кардиотоксичность и нефротоксичность (Buttgereit F. et al., 2017). Снижению риска возникновения таких эффектов может способствовать повышение их биодоступности и снижение эффективных терапевтических доз.

Широкое применение статинов обусловлено их высокой эффективностью в снижении уровня липидов и, особенно, холестерина крови, приводящее к уменьшению риска развития осложнений атеросклеротических заболеваний, к регрессии атеросклеротических очагов артерий, к купированию в них воспалительного процесса и, в конечном счете – к снижению сердечно-сосудистой смертности. В России патология сердечно-сосудистой системы является одной из ведущих причин смертности населения уже на протяжении

многих лет (Оганов Р. Г. и др., 2007; Здравоохранение в России, 2017). Несмотря на большое разнообразие статинов на современном фармацевтическом рынке, все они не лишены недостатков. К их общей проблеме можно отнести плохую биодоступность при пероральном приеме (от 5 до 24%) за счет интенсивного пре-системного метаболизма, что требует значительного увеличения дозы ЛС. Кроме этого, для них характерна гепатотоксичность и развитие миопатий (McKenne J. M., 2003). Важными средствами в структуре терапии сердечно-сосудистых патологий являются препараты для купирования артериальной гипертензии. В частности, антагонисты ионов кальция, среди которых актуальным остается и ЛС первого поколения – нифедипин. Доказана его высокая эффективность в снижении сердечно-сосудистых осложнений, а также инсульта (Garganeev A. A., 2011). При этом, нифедипин обладает не высокой биодоступностью, обусловленной плохой растворимостью в воде и пре-системным метаболизмом (Emara L. H. et al., 2002). Использование непрямых антикоагулянтов и, в особенности, варфарина, являются краеугольным камнем современной противотромботической терапии. Они показали высокую эффективность для предупреждения и лечения венозного тромбоэмболизма, профилактики системных эмболий, ассоциированных с фибрилляцией предсердий или искусственными клапанами сердца, предотвращения инсульта и повторного инфаркта миокарда (Задионченко В.С. и др., 2011). ВФ не растворим в воде, но обладает 100% биодоступностью при пероральном использовании (Van Aken H. et al., 2001), что отличает его от всех ЛС, использованных в данной работе. Основными проблемами при терапии ВФ являются кровотечения различной степени тяжести, связанные с генетическими факторами, диетой, лекарственным взаимодействием (Eikelboom J. et al., 2016).

Противопаразитарные средства, особенно в свете лечения описторхоза (*O. felineus*), получили широкое применение в областях с сильным заражением речной рыбы метацеркариями этих гельминтов. Самым крупным очагом *O. felineus*-индуцированного описторхоза в России является Обь-Иртышский бассейн, где зараженность населения в Тюменской и Томской областях достигает 40–95 %. У человека описторхоз провоцирует развитие тяжелых осложнений

(гнойный холангит, холецистит, хронический гепатит, стриктуры желчевыводящих путей, абсцессы печени, обтурационную желтуху, панкреатит) и может способствовать возникновению холангiocарциномы (Августинович Д. Ф. и др., 2016). Основные средства для борьбы с этим гельминтозом обладают плохой растворимостью в воде и низкой биодоступностью. Это требует больших дозировок для достижения терапевтического эффекта и, в свою очередь, ведет к увеличению риска нежелательных побочных эффектов.

3.1. Комплексы с арабиногалактаном

3.1.1. Исследование фармакологических свойств комплекса АСК:АГ 1:10

Ацетилсалициловая кислота – нестероидное противовоспалительное средство, неселективный ингибитор циклооксигеназы 1 и 2. Обладает противовоспалительным, жаропонижающим, анальгетическим и антиагрегантным свойствами. В настоящее время в медицинской практике, в основном, применяется в качестве антиагреганта (www.rls.ru). При пероральном приеме подвергается выраженному пре-системному метаболизму, лишь 25% от введенной дозы в неизменном виде поступает в кровоток (Wientjes M. G. et al., 1988). Основным побочным эффектом является повреждение слизистой оболочки ЖКТ, приводящее к появлению эрозий, пептических язв и кровотечений из них (Yeomans, N. D., 2011; Hawthrone A. B. et al., 1991).

Были изучены противовоспалительное, анальгетическое действие комплекса АСК:АГ 1:10. Также было изучено влияние комплекса на слизистую оболочку желудка крыс при 30-ти дневном введении.

Изучение противовоспалительного действия комплекса АСК:АГ

Исследование противовоспалительной активности комплекса АСК:АГ в дозах 250 и 500 мг/кг и АСК в эквивалентных дозах 25 и 50 мг/кг проводили на

модели гистаминового отека. Агенты вводили перорально за час до субплантарного введения флогогена мышам. Через 5 часов после введения гистамина оценивали процент воспаления по весу лап использованных мышей. Полученные в данном эксперименте результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты изучения противовоспалительного действия АСК и комплекса АСК:АГ на модели гистаминового отека (мыши-самки CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Процент воспаления, %
Контроль	-	27,1 ± 2,36
Арабиногалактан	1000	25,6 ± 2,21
АСК	50	21,6 ± 1,81
	100	14,1 ± 1,73*
АСК:АГ 1:10	500 (50)	14,5 ± 1,52* [#]
	1000 (100)	16,2 ± 1,69*

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы АСК, 50 мг/кг

Результаты теста на противовоспалительную активность свидетельствуют о том, что, АСК проявила дозозависимый эффект, при этом достоверное снижение отека было достигнуто лишь в дозе 100 мг/кг. В то же время, комплекс АСК с АГ достоверно снизил процент воспаления во всех используемых дозах (500 и 1000 мг/кг).

Изучение анальгетического действия комплекса АСК:АГ

Для изучения анальгетического действия комплекса АСК:АГ мы использовали 2 теста: модель термической боли «горячая пластина» и модель химической боли «уксусные корчи».

«Горячая пластина». Мышам за час до эксперимента вводили комплекс АСК:АГ в дозах 250 и 500 мг/кг и АСК в дозах 25 и 50 мг/кг. Затем животных помещали на нагретую до 54°С пластину и оценивали латентное время их болевой реакции. Результаты эксперимента приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты изучения анальгетического действия АСК и комплекса АСК:АГ в teste «горячая пластина» (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Латентное время болевой реакции, с.
Контроль	-	11,2 ± 1,47
Арабиногалактан	500	11,8 ± 1,41
АСК	25	11,3 ± 1,86
	50	19,9 ± 1,77*
АСК:АГ 1:10	250 (25)	19,1 ± 2,84* [#]
	500 (50)	21,8 ± 2,78*

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы АСК, 25 мг/кг

Проведенный тест на термическую болевую чувствительность показал, что достоверный анальгетический эффект, то есть увеличение латентного времени болевой реакции, присутствовал у комплекса с АСК:АГ во всех использованных дозах (250 и 500, мг/кг). Чистая АСК в эквивалентных дозах показала дозозависимый эффект, при этом в наиболее низкой из них (25 мг/кг) достоверной анальгетической активности зафиксировано не было.

«Уксусные корчи». За час до внутрибрюшинного введения уксусной кислоты мышам перорально вводили комплекс АСК:АГ в дозах 250 и 500 мг/кг, а также АСК в дозах 25 и 50 мг/кг. После введения уксусной кислоты считали количество корчей в течение 3-х минут. Полученные в данном teste данные приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты изучения анальгетического действия АСК и комплекса АСК:АГ в тесте «уксусные корчи» (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Количество корчей
Контроль	-	7,0 ± 0,63
Арабиногалактан	500	7,3 ± 0,65
АСК	25	8,0 ± 1,86
	50	2,0 ± 0,65*
АСК:АГ 1:10	250 (25)	3,8 ± 0,83* [#]
	500 (50)	3,6 ± 0,80*

Примечание: *p≤0,05 относительно контроля; #p≤0,05 относительно группы АСК, 25 мг/кг

Тест на химическую висцеральную болевую чувствительность выявил похожие результаты с тестом «горячая пластина». Достоверное уменьшение количества корчей наблюдали после внутрижелудочного введения комплекса АСК:АГ в исследуемых дозах и чистого АСК в большей из эквивалентных доз. При этом, в меньшей дозе (25 мг/кг для АСК) анальгетическая активность чистой АСК достоверно от контроля не отличалась.

Исследование влияния комплекса АСК:АГ на слизистую желудка

При визуальной оценке слизистой желудка крыс после 30-дневного введения агентов в указанных дозах, мелкие эрозии (от 1 до 4) и язвы (до 2) были найдены у животных, которым вводили 50 мг/кг АСК. У крыс остальных групп наблюдалась только слабо выраженная гиперемия слизистой, что характерно для действия аспирина.

В ходе исследования световой микроскопии гистологических срезов желудка были получены следующие результаты. У животных контроля стенки

желудка имели типичное строение без каких-либо заметных отклонений (рисунок 31).

У крыс, получавших АСК в дозе 25 мг/кг, слизистая оболочка и подслизистая основа фундального отдела желудка были умеренно инфильтрированы лейкоцитами. Капилляры и сосуды полнокровны, в подслизистом и мышечном слое присутствовали выраженные диапедезные кровоизлияния (рисунок 32). Железистый эпителий отечный со следами слабо выраженной десквамации (Рисунок 33). По сравнению с контролем, количество париетальных клеток было несколько увеличено.

У животных, получавших АСК в дозе 50 мг/кг, лейкоцитарная инфильтрация слизистого и подслизистого слоя и полнокровие сосудов были существенно более выраженным по сравнению с группой АСК 25 мг/кг. Железистый эпителий имел следы значительного отека. Кроме этого, присутствовали признаки дефекта слизистой оболочки: местами очаговая десквамация достигала половины ее толщины. Количество париетальных клеток было заметно увеличено по сравнению с таковым у крыс группы АСК 25 мг/кг (рисунок 34).

У животных, получавших комплекс АСК:АГ 1:10 в дозах 250 и 500 мг/кг, наблюдалось слабо выраженное полнокровие сосудов, а также незначительная десквамация клеток железистого эпителия. Визуально количество париетальных клеток слизистой по сравнению с контролем увеличено не было (рисунок 35, 36).

Из полученных результатов можно заключить, что наименее выраженные патологические изменения по сравнению с контролем наблюдались у животных с комплексом в дозах 250 и 500 мг/кг. Таким образом, по результатам визуальной и гистоморфологической оценки, можно утверждать, что образование комплекса АСК с АГ значительно сокращает ее раздражающее влияние на слизистую желудка, тем самым, увеличивая ее безопасность.

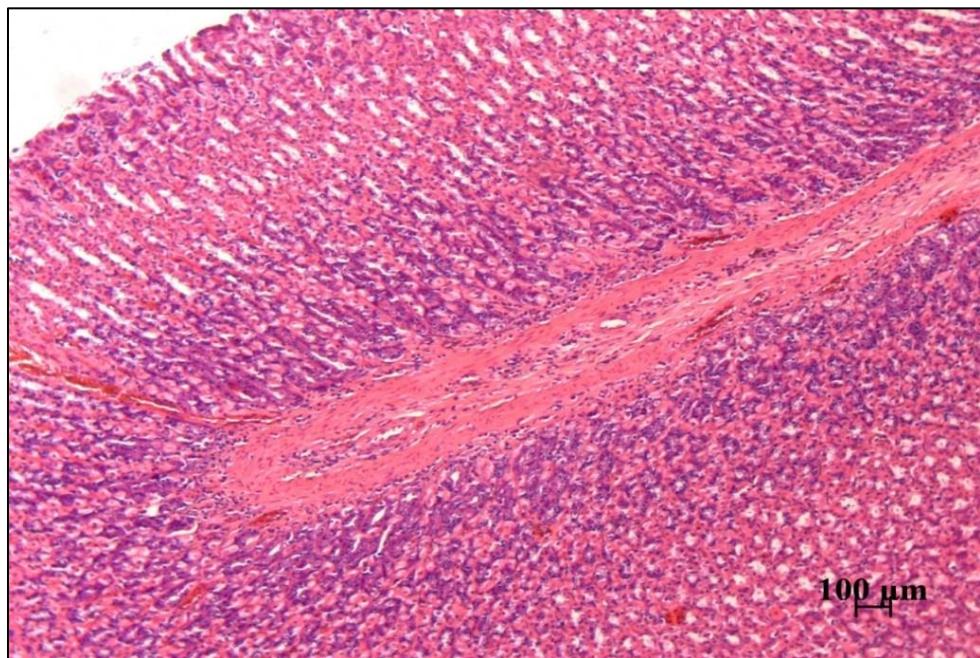


Рисунок 31 – Желудок интактного животного. Гематоксилин – эозин, ув.
x100.

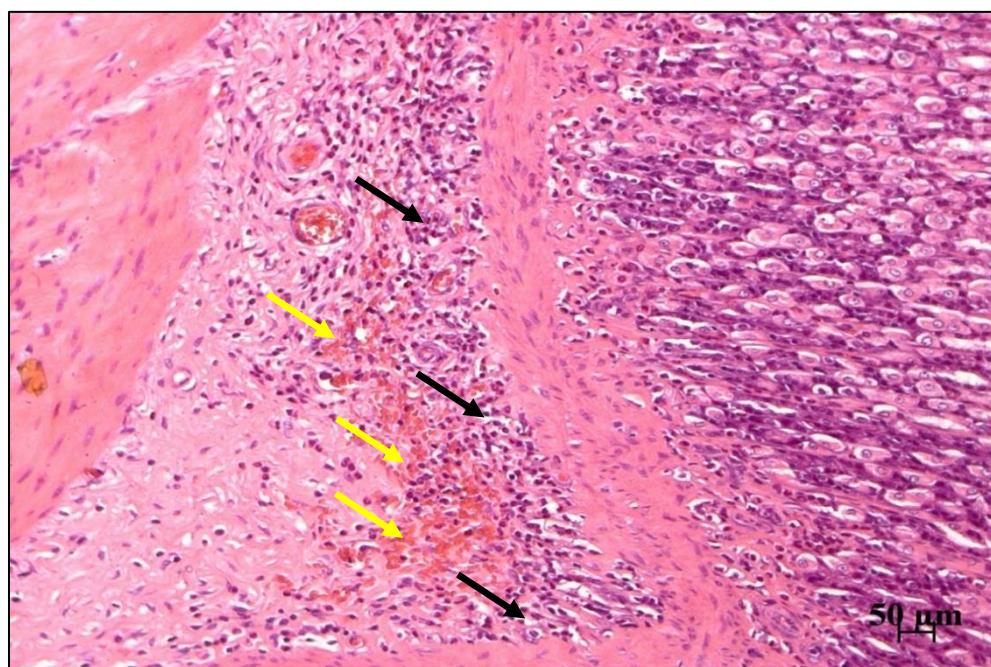


Рисунок 32 – Желудок животного после 30-дневного введения АСК в дозе
25 мг/кг. Диапедезные кровоизлияния (желтые стрелки) и лейкоцитарная
инфилтратация (черные стрелки) в подслизистой основе. Гематоксилин- эозин, ув.
x200.

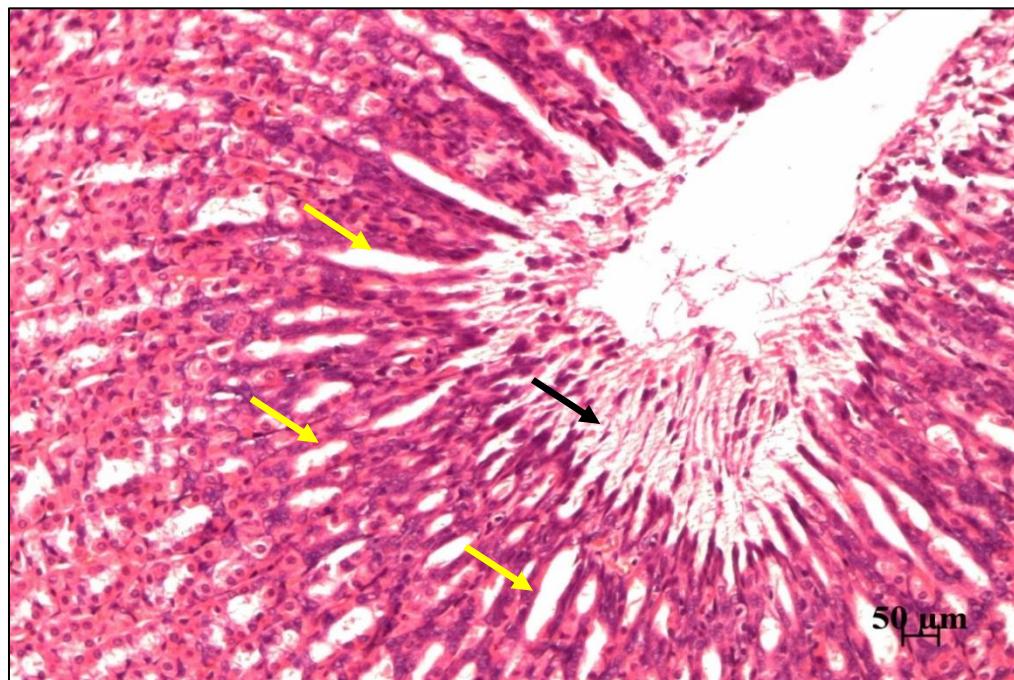


Рисунок 33 – Желудок животного после 30-дневного введения АСК в дозе 25 мг/кг. Отек слизистой оболочки (желтые стрелки) и десквамация железистого эпителия (черная стрелка). Гематоксилин – эозин, ув. x200.

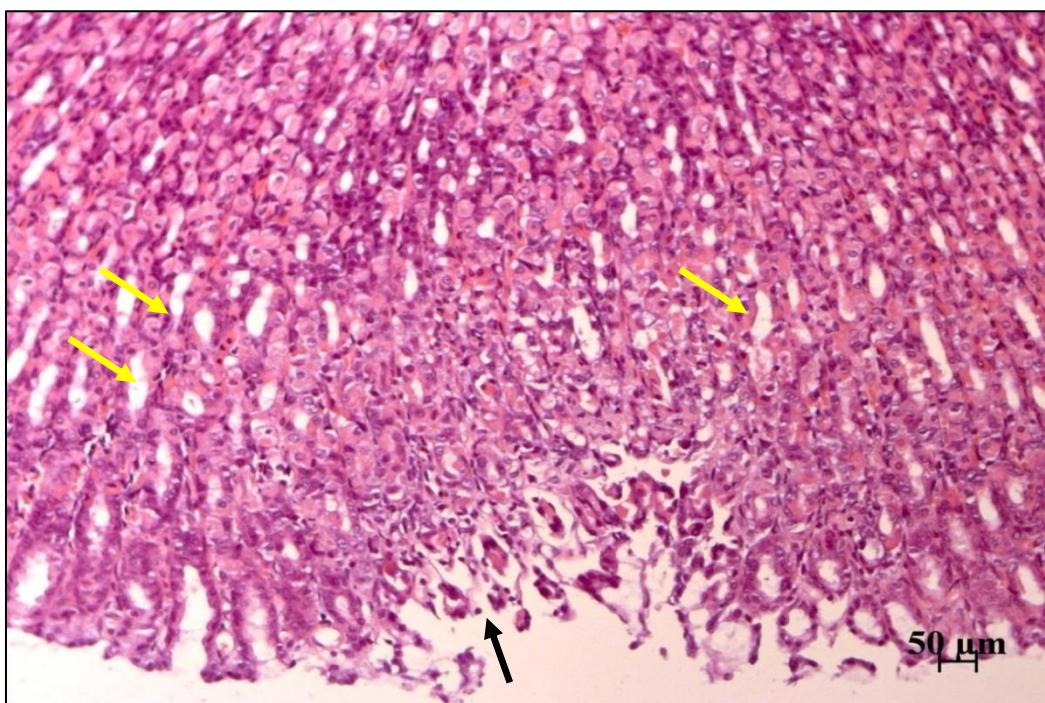


Рисунок 34 – Желудок животного после 30-дневного введения АСК в дозе 50 мг/кг. Отек (желтые стрелки) и эрозия (черная стрелка) слизистой оболочки. Гематоксилин – эозин, ув. x200.

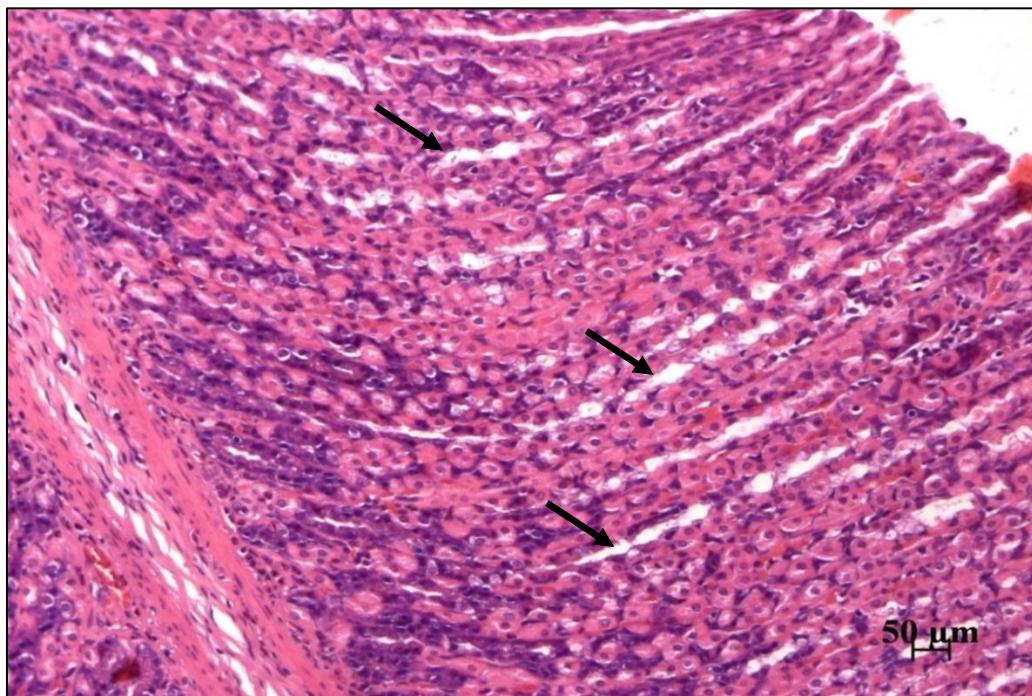


Рисунок 35 – Желудок животного после 30-дневного введения АСК:АГ в дозе 250 мг/кг. Незначительный отек слизистой оболочки (черные стрелки). Гематоксилин – эозин, ув. х200.

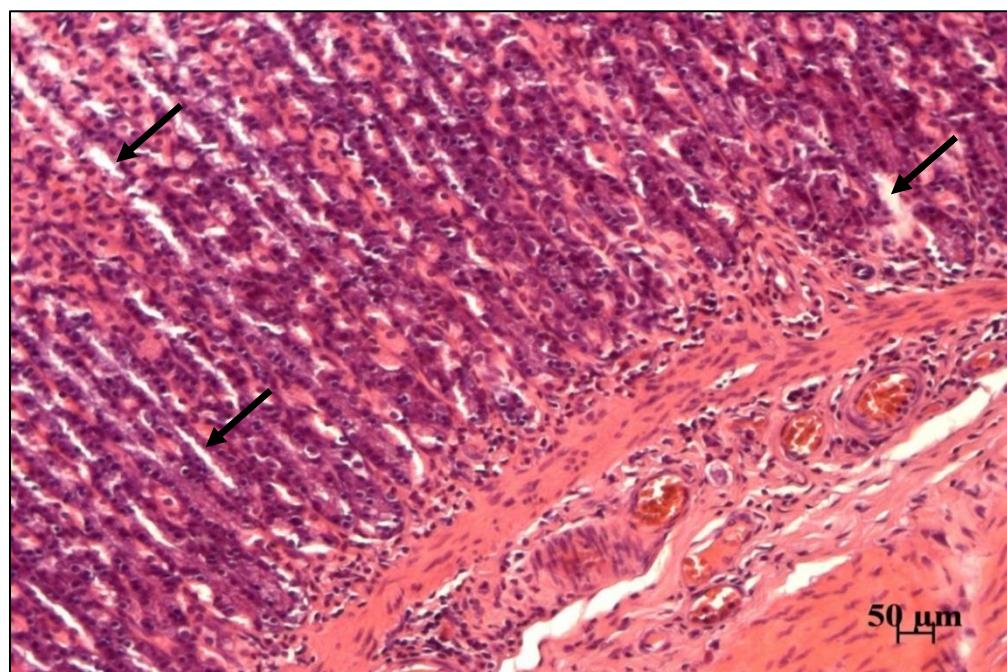


Рисунок 36 – Желудок животного после 30-дневного введения АСК:АГ в дозе 500 мг/кг. Незначительный отек слизистой оболочки (черные стрелки). Гематоксилин – эозин, ув. х200.

Таким образом, комплексообразование АСК с АГ приводит к повышению фармакологической эффективности АСК и повышению его безопасности для слизистой ЖКТ.

3.1.2 Исследование фармакологических свойств комплекса НАП:АГ 1:10

Напроксен (НАП) – нестероидное противовоспалительное средство, практически не растворим в воде (Vélaz I. et al., 1998). Было изучено противовоспалительное и анальгетическое действие комплекса НАП:АГ 1:10. Также было изучено влияние комплекса на слизистую оболочку желудка крыс при 30-ти дневном введении.

Изучение противовоспалительного действия комплекса НАП:АГ 1:10

Эксперимент по изучению противовоспалительной активности проводили по аналогии с исследованием комплекса АСК:АГ. Комплекс НАП:АГ 1:10 в дозах 100 и 200 мг/кг и НАП в дозах 10 и 20 мг/кг вводили внутрижелудочно. Результаты проведенного теста указаны в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты изучения противовоспалительного действия НАП и комплекса НАП:АГ на модели гистаминового отека (мыши-самки CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Процент воспаления, %
Контроль	-	$23,0 \pm 3,81$
НАП	10	$16,8 \pm 3,42$
	20	$9,3 \pm 2,57^*$
НАП:АГ 1:10	100 (10)	$9,2 \pm 0,99^{*\#}$
	200 (20)	$9,3 \pm 1,69^*$

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы НАП, 10 мг/кг

Результаты теста на противовоспалительную активность аналогичны данным, полученным в экспериментах по изучению противовоспалительного действия комплекса АСК:АГ. Комплекс НАП:АГ проявил статистически значимый противовоспалительный эффект в обеих используемых дозах (100 и 200 мг/кг). С другой стороны, чистый НАП имел сходное действие лишь в большей из двух эквивалентных доз (20 мг/кг).

Изучение анальгетического действия комплекса НАП:АГ 1:10.

Анальгетическую активность комплекса НАП:АГ оценивали в двух тестах: «горячая пластина» и «уксусные корчи».

«Горячая пластина». Комплекс НАП:АГ в дозах 100 и 200 мг/кг и НАП в дозах 10 и 20 мг/кг вводили внутрь за час до эксперимента. Результаты измерения латентного времени болевой реакции представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты изучения анальгетического действия НАП и комплекса НАП:АГ в teste «горячая пластина» (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Латентное время болевой реакции, с.
Контроль	-	$8,3 \pm 0,56$
НАП	10	$7,8 \pm 0,56$
	20	$13,0 \pm 0,59^*$
НАП:АГ 1:10	100 (10)	$12,1 \pm 0,85^{*\#}$
	200 (20)	$13,6 \pm 0,73^*$

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы НАП, 10 мг/кг.

Эффект чистого НАП имел дозозависимый характер, при этом достоверно отличалась от контроля только группа НАП 20 мг/кг. В то же время, комплекс

НАП:АГ достоверно увеличил латентное время болевой реакции в обеих используемых дозах (100 и 200 мг/кг).

«Уксусные корчи» За час до эксперимента вводили комплекс НАП:АГ в дозах 100 и 200 мг/кг и НАП в дозах 10 и 20 мг/кг. Данные по подсчету количества корчей в течение 3 минут после внутрибрюшинного введения уксусной кислоты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты изучения анальгетического действия НАП и комплекса НАП:АГ в teste «уксусные корчи» (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Количество корчей
Контроль	-	8,9 ± 1,18
НАП	10	7,4 ± 0,51
	20	1,6 ± 0,53*
НАП:АГ 1:10	100 (10)	1,9 ± 0,55*#
	200 (20)	1,0 ± 0,42*

Примечание: *p≤0,05 относительно контроля; #p≤0,05 относительно группы НАП, 10 мг/кг.

В teste на висцеральную химическую ноцицепцию было обнаружено, что достоверное снижение количества корчей наблюдается в группах комплекса НАП:АГ в дозах 100 и 200 мг/кг и чистого НАП в дозе 20 мг/кг. В дозе 10 мг/кг НАП значимого анальгетического действия не проявлял.

Таким образом, комплексообразование с АГ приводит к повышению биодоступности НАП, что позволяет уменьшить его дозу для достижения фармакологического эффекта, сравнимого с чистым НАП. К увеличению биодоступности, вероятнее всего, приводит увеличение растворимости НАП, поскольку ранее было показано, что использование натриевой соли или твердых липидных дисперсий также приводит к повышению растворимости в воде и биодоступности НАП (Sevelius H. et al., 1980; Nagabandi V. et al., 2014).

Исследование влияния комплекса НАП:АГ 1:10 на слизистую желудка

После ежедневного однократного перорального введения комплекса НАП:АГ в дозах 100 и 200 мг/кг и чистого НАП в дозах 10 и 20 мг/кг в течение 30 дней были получены следующие результаты.

По результатам визуальной оценки у всех животных экспериментальных групп, кроме интактного контроля, слизистая желудка была умеренно гиперемирована. При этом, дефектов в виде эрозий или язв обнаружено не было.

Светомикроскопические исследования показали, что у контрольных животных для гистологического анализа представлен фундальный отдел желудка, имеющий характерное строение, а именно – наличие четырех оболочек: слизистой, подслизистой основы, мышечной и серозной оболочки. Хорошо сформированы складки слизистой оболочки, железистые поля (рисунок 37). Желудок выстлан однослойным призматическим железистым эпителием, под которым лежит собственная пластинка слизистой оболочки с многочисленными желудочными железами. Мышечная пластинка слизистой оболочки отделяет собственную пластинку от подслизистой основы, выполненной соединительной тканью с большим количеством кровеносных сосудов. Патологические изменения во всех слоях желудка отсутствуют.

После введения напроксена в дозе 10 мг/кг, в фундальном отделе желудка незначительно увеличилась инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами собственной пластинки слизистой и подслизистой основы, а также кровенаполнение сосудов (наблюдались мелкие диапедезные кровоизлияния в слизистой оболочке) (Рисунки 38, 39). Поверхностный эпителий отечный, местами десквамация его была более выражена, чем в интактном контроле (рисунок 40).

У животных, получавших напроксен в дозе 20 мг/кг структура стенки желудка сохранена. Полнокровие и воспалительная лейкоцитарная инфильтрация слизистого и подслизистого слоя более выражены, чем в группе животных,

получавших напроксен в дозе 10 мг. Железистый эпителий с признаками выраженного отека, наблюдаются мелкие очаговые дефекты поверхностного эпителия слизистой оболочки, а в толще слизистой оболочки - мелкоочаговые некрозы эпителия (рисунок 41). Во всех отделах желудка отмечаются более выраженные гемодинамические нарушения по сравнению с животными, получавшими данный препарат в дозе 10 мг/кг.

На фоне введения животным комплекса НАП:АГ в дозах 100 и 200 мг/кг в желудке наблюдаются такие же изменения, как и у животных, получавших напроксен в дозе 20 мг/кг. В слизистом и подслизистом слое сохраняется венозное полнокровие, десквамация поверхностного эпителия и очаговые некрозы эпителиоцитов в железах (рисунок 42). Однако следует отметить, что наблюдалось уменьшение лейкоцитарной инфильтрации у животных обеих групп. Патологических изменений другого типа не обнаружено.

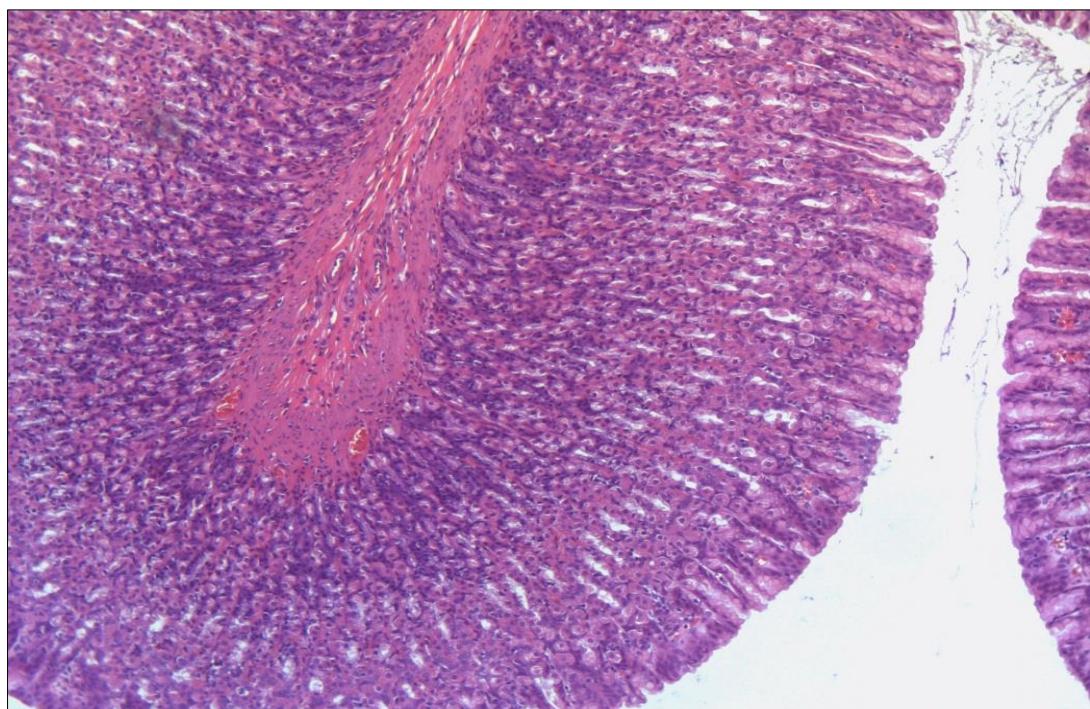


Рисунок 37 – Желудок интактного животного. Гематоксилин – эозин. Ув. – x100.

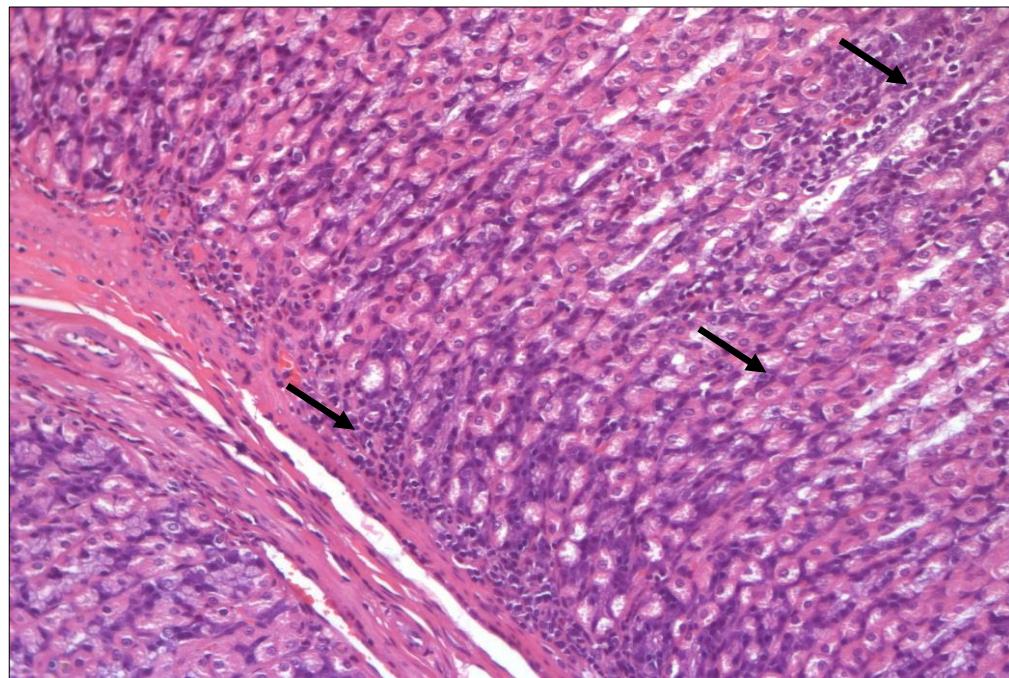


Рисунок 38 – Желудок крысы после 30-дневного введения напроксена в дозе 10мг/кг. Лейкоцитарная инфильтрация слизистой (черные стрелки). Гематоксилин – эозин. Ув. – x200.

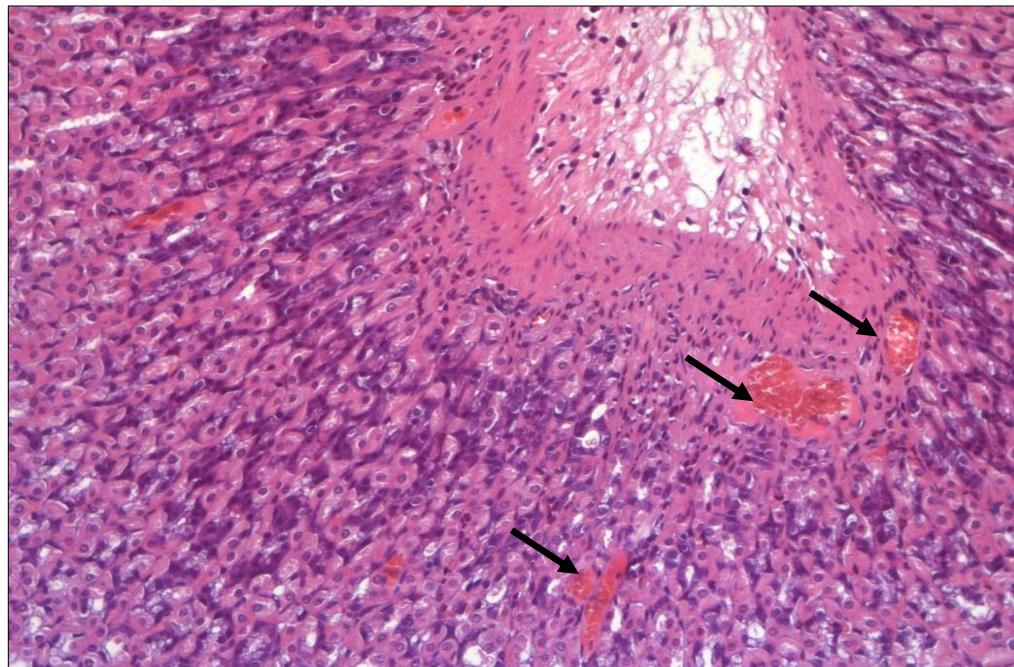


Рисунок 39 – Желудок крысы после 30-дневного введения напроксена в дозе 10мг/кг. Полнокровие сосудов слизистой (черные стрелки). Гематоксилин – эозин. Ув. – x200.

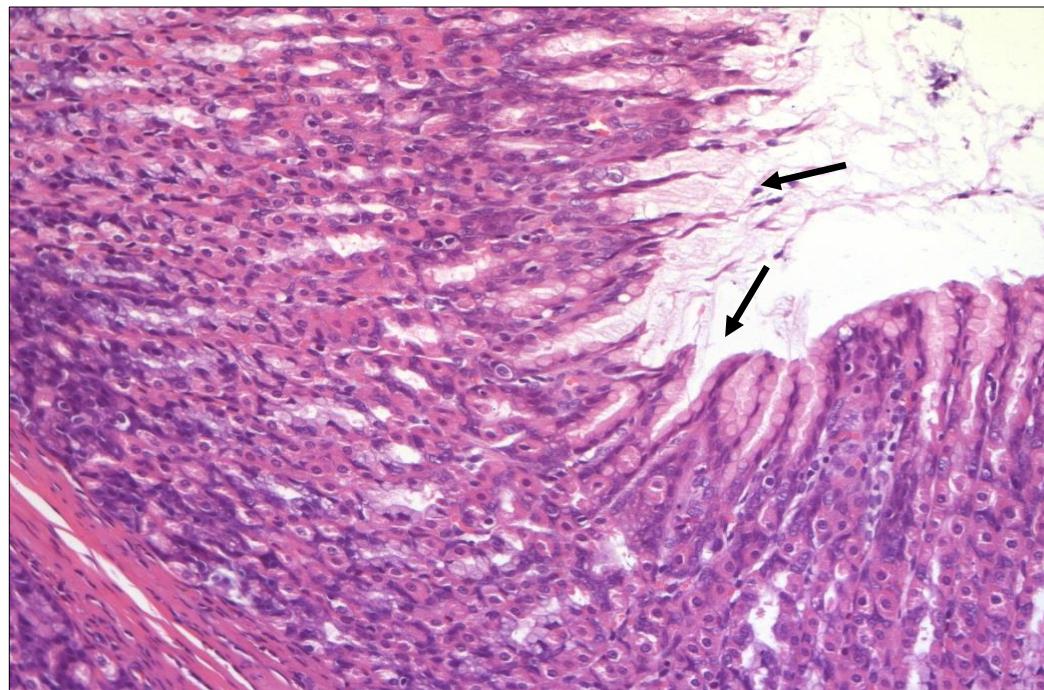


Рисунок 40 – Желудок крысы после 30-дневного введения напроксена в дозе 10мг/кг. Очаговая десквамация поверхностного эпителия слизистой (черные стрелки). Гематоксилин – эозин. Ув. – x200.

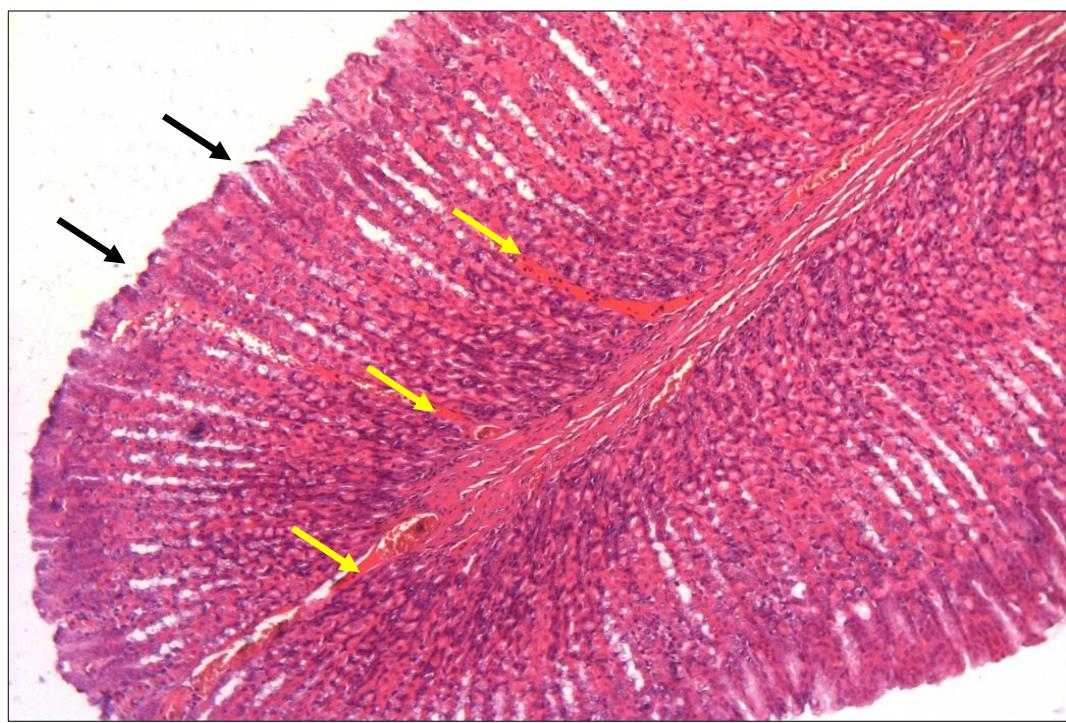


Рисунок 41 – Желудок крысы после 30-дневного введения напроксена в дозе 20мг/кг. Выраженное полнокровие (желтые стрелки), десквамация эпителия слизистой (черные стрелки). Гематоксилин – эозин. Ув. – x100.

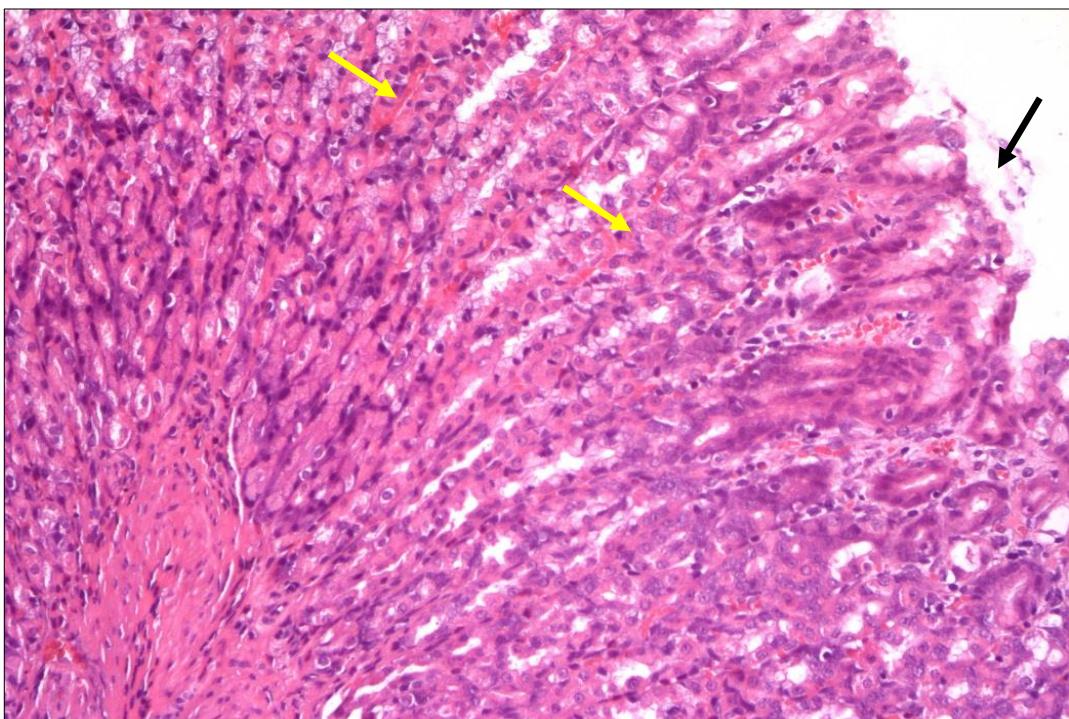


Рисунок 42 – Желудок крысы после 30-дневного введения комплекса НАП:АГ в дозе 200мг/кг. Диапедезные кровоизлияния (желтые стрелки), очаговая десквамация эпителия слизистой (черная стрелка). Гематоксилин – эозин. Ув. – x200.

Таким образом, было установлено, что НАП:АГ 1:10 и НАП, в изученных дозах, являются безопасными для слизистой желудка.

3.1.3. Исследование фармакологических свойств комплекса ИБ:АГ 1:10

Ибупрофен – НПВС, плохо растворим в воде. Биодоступность составляет примерно 80% (www.drugbank.ca). Было изучено противовоспалительное и анальгетическое действие комплекса ИБ:АГ 1:10. Проведено изучение фармакокинетики комплекса после перорального введения. Также было изучено влияние комплекса на слизистую оболочку желудка крыс при 30-ти дневном введении.

Изучение противовоспалительного действия комплекса ИБ:АГ

По аналогии с исследованиями комплексов АСК:АГ и ИБ:АГ, противовоспалительную активность комплекса ИБ:АГ 1:10 оценивали с помощью модели гистаминового отека. Комплекс ИБ:АГ вводили внутрижелудочно в дозах 200 и 400 мг/кг, а ИБ в эквивалентных дозах 20 и 40 мг/кг. Результаты расчета процента воспаления приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты изучения противовоспалительного действия ИБ и комплекса ИБ:АГ на модели гистаминового отека (мыши-самки CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Процент воспаления, %
Контроль	-	26,1 ± 3,17
ИБ	20	20,1 ± 1,93
	40	15,1 ± 1,69*
ИБ:АГ 1:10	200 (20)	14,2 ± 1,32*#
	400 (40)	14,3 ± 2,26*

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы ИБ, 20 мг/кг.

По полученным результатам видно, что комплекс ИБ:АГ в обеих использованных дозах (200 и 400 мг/кг) достоверно снизил процент воспаления по отношению к контролю. Чистый ИБ проявил аналогичный эффект только в дозе 40 мг/кг, а при использовании дозы 20 мг/кг достоверных отличий от контроля зафиксировано не было.

Изучение анальгетического действия комплекса ИБ:АГ

Для оценки анальгетической активности комплекса ИБ:АГ также были использованы два стандартных фармакологических теста: «горячая пластина» и «уксусные корчи».

«Горячая пластина». За час до измерения латентного времени болевой реакции мышам вводили комплекс ИБ:АГ в дозах 200 и 400 мг/кг и ИБ в эквивалентных дозах 20 и 40 мг/кг. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты изучения анальгетического действия ИБ и комплекса ИБ:АГ в teste «горячая пластина» (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Латентное время болевой реакции, с
Контроль	-	8,63 ± 0,778
ИБ	20	9,88 ± 0,766
	40	17,50 ± 1,195*
ИБ:АГ 1:10	200 (20)	17,75 ± 1,161* [#]
	400 (40)	20,13 ± 1,201*

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы ИБ, 20 мг/кг

По полученным данным установлено, что в teste «горячая пластина» ИБ проявил дозозависимый эффект. Однако достоверное увеличение латентного времени болевой реакции наблюдали только в дозе 40 мг/кг, тогда как между действием ИБ в дозе 20 мг/кг и контролем различий не наблюдалось. В то же время, комплекс ИБ:АГ был достоверно активен в обеих дозах (200 и 400 мг/кг).

«Уксусные корчи». Животным за час до эксперимента вводили ИБ в дозах 20 и 40 мг/кг и комплекс ИБ:АГ в дозах 200 и 400 мг/кг. Результаты эксперимента представлены на таблице 13.

Комплекс ИБ:АГ в дозах 200 и 400 мг/кг достоверно снизил количество корчей в течение 3х минут. Аналогичный анальгетический эффект наблюдался у чистого ИБ только в большей из используемых доз (40 мг/кг). В дозе 20 мг/кг достоверных отличий с контролем не было зафиксировано.

Таблица 13 – Результаты изучения анальгетического действия ИБ и комплекса ИБ:АГ в teste «уксусные корчи» (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа, количество животных, n	Доза, мг/кг (доза ЛС)	Количество корчей
Контроль	-	6,4 ± 0,57
ИБ	20	5,6 ± 0,65
	40	3,0 ± 0,59*
ИБ:АГ 1:10	200 (20)	2,3 ± 0,64*#
	400 (40)	2,3 ± 0,98*

Примечание: * $p \leq 0,05$ относительно контроля; # $p \leq 0,05$ относительно группы АСК, 50 мг/кг

Определение фармакокинетических параметров комплекса ИБ:АГ

В результате проведенных фармакокинетических исследований комплекса ИБ:АГ и чистого ИБ, были построены кинетические кривые (в координатах время-концентрация) и определены основные фармакокинетические параметры данных веществ (рисунок 43, таблица 14).

Из полученных данных видно, что ИБ в комплексе с АГ превосходит практически по всем параметрам чистый ИБ, если сравнивать попарно эквивалентные дозы (200 мг/кг ИБ:АГ с 20 мг/кг ИБ и 400 мг/кг ИБ:АГ с 40 мг/кг ИБ) (таблица 14). Отдельно стоит отметить значительно увеличенную площадь под кривыми (AUC) комплекса ИБ:АГ по сравнению с кривыми чистого ИБ, что напрямую свидетельствует об увеличении биодоступности при пероральном введении (рисунок 43).

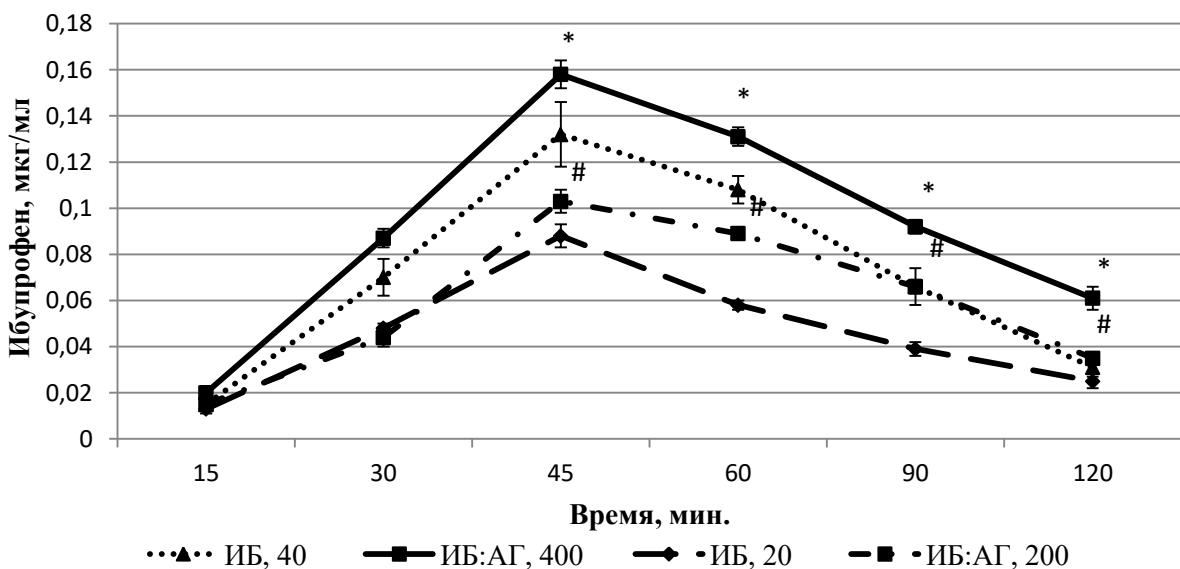


Рисунок 43 – Фармакокинетические кривые, полученные в результате исследований ИБ и ИБ:АГ в плазме крыс (крысы-самцы сток Wistar, n=5). *p≤0,05 достоверно относительно группы ИБ, 40 мг/кг; #p≤0,05 достоверно относительно группы ИБ, 20 мг/кг.

Таблица 14 – Фармакокинетические параметры ИБ и ИБ:АГ при пероральном введении

Группа, количество животных (n)	ИБ, 40 мг/кг	ИБ:АГ, 400 мг/кг (40 мг/кг ИБ)	ИБ, 20 мг/кг	ИБ:АГ, 200 мг/кг (20 мг/кг ИБ)
T _{max} , мин	45,00 ± 0,00	45,00 ± 0,00	45,00 ± 0,00	45,00 ± 0,00
C _{max} , мкг/мл	0,132 ± 0,01	0,158 ± 0,01*	0,086 ± 0,01	0,103 ± 0,01#
AUC _{0-inf} , кг/мл*мин	9,63 ± 0,59	15,50 ± 1,02*	6,92 ± 0,46	9,20 ± 0,44#

Примечание: *p≤0,05 достоверно относительно группы ИБ, 40 мг/кг; #p≤0,05 достоверно относительно группы ИБ, 20 мг/кг.

Исследование влияния комплекса ИБ:АГ 1:10 на слизистую желудка

Визуальная оценка слизистой желудков крыс после 30-дневного введения агентов показала, что у животных, которым вводили чистый ИБ в дозах 20 и 40

мг/кг, присутствовали дефекты слизистой в виде эрозий. В слизистой наблюдается выраженная гиперемия. У крыс получавших комплексы гиперемия слизистой практически отсутствует и количество дефектов значительно снижено.

В ходе светомикроскопического исследования желудков были получены следующие результаты. У контрольных животных стенка желудка представлена фундальным отделом. Слизистая оболочка незначительно инфильтрирована лейкоцитами, несколько отечна. У отдельных особей в подслизистой наблюдалась лимфоидные фолликулы (рисунок 44).

У животных, получавших ибупрофен в дозе 20 мг/кг, в фундальном отделе желудка отмечается умеренно выраженная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами собственной пластинки слизистой и подслизистой основы (рисунок 45). Капилляры и сосуды полнокровны (рисунок 46), выражены диапедезные кровоизлияния в подслизистом и мышечном слое. Железистый эпителий отечный, местами с признаками незначительной десквамации.

У животных, получавших ИБ в дозе 40 мг/кг, структура стенки желудка сохранена. Полнокровие и воспалительная лейкоцитарная инфильтрация слизистого и подслизистого слоя более выражены, чем в группе животных, получавших его в дозе 20 мг/кг. Железистый эпителий с признаками выраженного отека (рисунок 47). Отмечаются дефекты в слизистой оболочке: очаговая десквамация эпителия достигает половины толщины слизистой оболочки.

У животных, получавших комплекс ИБ:АГ в дозах 200 и 400 мг/кг, отмечаются умеренно выраженные гемодинамические нарушения в виде полнокровия капилляров и сосудов, наблюдается незначительный отек и десквамация железистого эпителия (рисунки 48, 49). У животных, получавших комплекс в дозе 200 мг/кг, описанные изменения менее выражены и соответствуют таковым у крыс с ибупрофеном в дозе 20 мг/кг.

Таким образом, наиболее выраженные отклонения от интактного состояния слизистой оболочки желудка наблюдались у животных, которым в течение 30 дней вводили ИБ в дозах 20 и 40 мг/кг. У крыс в группе комплекса ИБ:АГ в

эквивалентных дозах (200 и 400 мг/кг) какие-либо дефекты практически отсутствовали, а состояние слизистой не отличалось от интактного контроля.



Рисунок 44 – Желудок интактного животного. Гематоксилин – эозин, ув. x100.

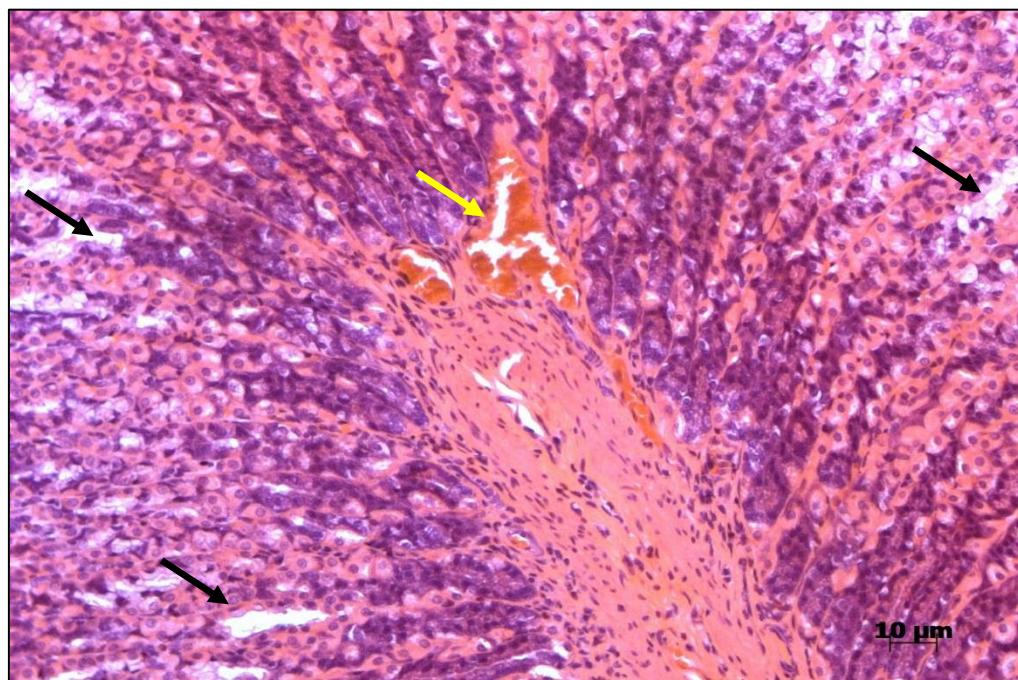


Рисунок 45 – Желудок животного после 30-дневного введения ИБ в дозе 20 мг/кг. Отек слизистой оболочки (черные стрелки) и полнокровие сосудов (желтая стрелка). Гематоксилин – эозин, ув. x200.

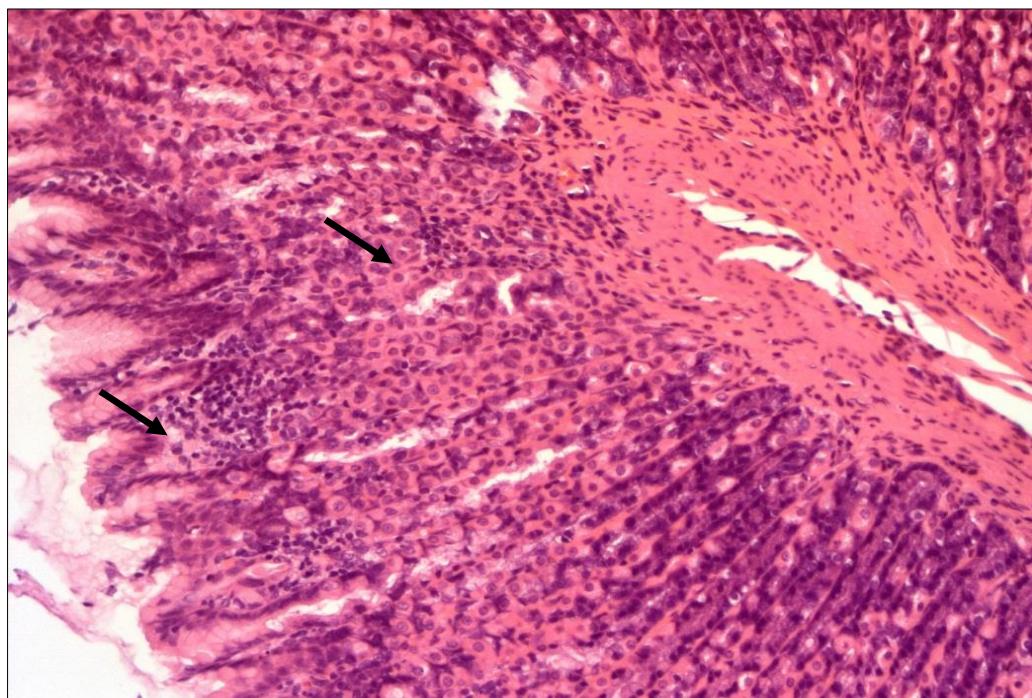


Рисунок 46 – Желудок крысы после 30-дневного введения ибупрофена в дозе 20мг/кг. Инфильтрация слизистой оболочки полиморфноядерными лейкоцитами. Гематоксилин – эозин. Ув. – x200.

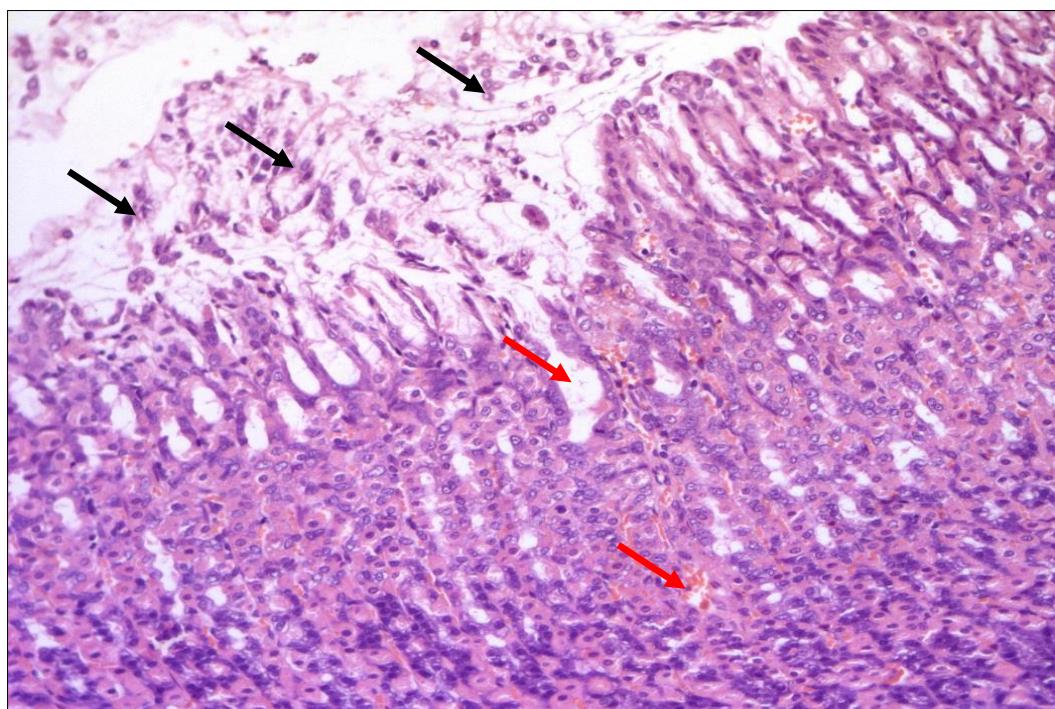


Рисунок 47 – Желудок крысы после 30-дневного введения ИБ в дозе 40мг/кг. Полнокровие капилляров (красные стрелки), десквамация эпителия (черные стрелки). Гематоксилин – эозин. Ув. – x200.

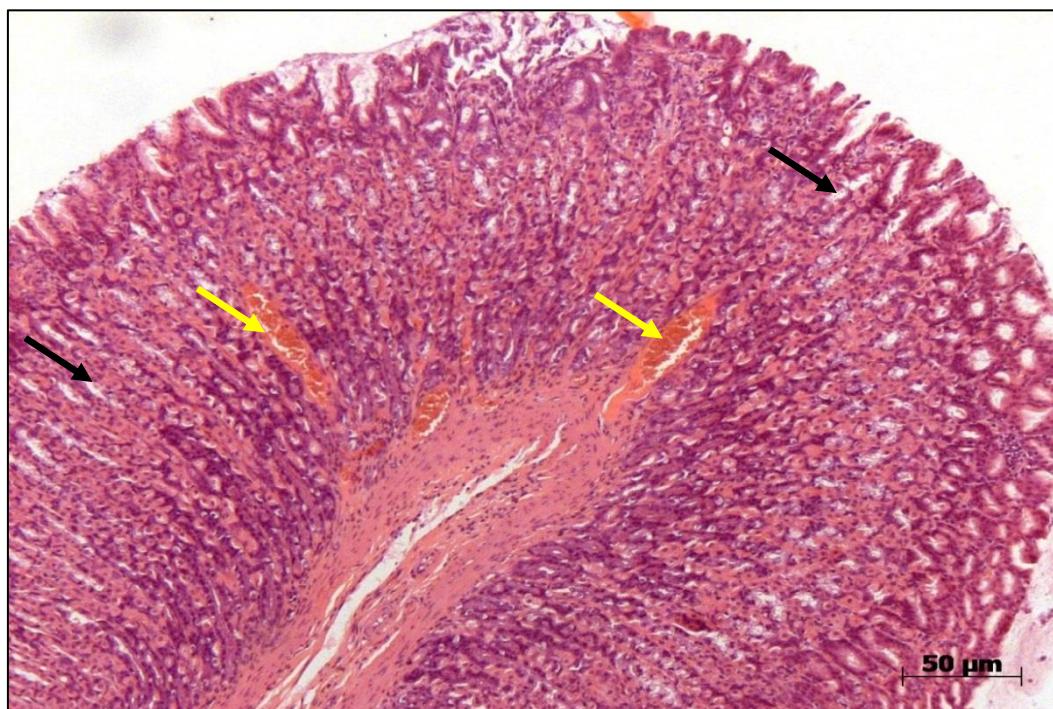


Рисунок 48 – Желудок животного после 30-дневного введения комплекса ИБ:АГ в дозе 200 мг/кг. Отек слизистой оболочки (черные стрелки) и полнокровие сосудов (желтые стрелки). Гематоксилин – эозин, ув. х100.

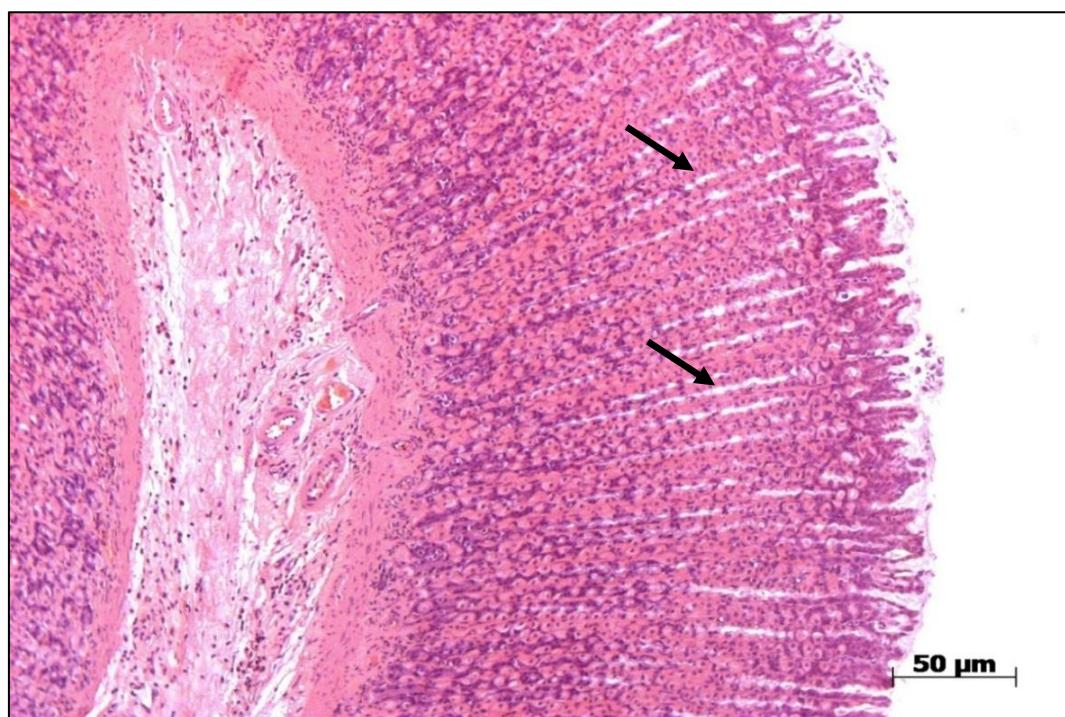


Рисунок 49 – Желудок животного после 30-дневного введения ИБ:АГ в дозе 400 мг/кг. Слабо выраженный отек слизистой оболочки (черные стрелки). Гематоксилин – эозин, ув. х100.

Полученные результаты свидетельствуют, что, как и в случае с АСК и НАП, комплексообразование ИБ с АГ приводит к улучшению его биодоступности. При этом не происходит сдвига T_{max} , как например, в описанном в литературе случае натриевой соли ИБ, где этот параметр уменьшился в 2,5 раза (Dewland P. M. et al., 2009). Снижение раздражающего воздействия АСК и ИБ на слизистую ЖКТ, вероятнее всего, связано с защитным действием АГ, одним из механизмов которого, как показано авторами (Шаманаев А. Ю. и др., 2014), может быть улучшение микроциркуляции в слизистой оболочке желудка.

3.1.4. Исследование фармакологических свойств комплекса АТ:АГ 1:10.

Аторвастатин (АТ) – гиполипидемическое лекарственное средство II поколения статинов. Конкурентный ингибитор микросомального фермента ГМГ-КоА-редуктазы – фермента, превращающего 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент А в мевалоновую кислоту, являющуюся предшественником стеролов, включая холестерин. В медицинской практике обычно используется в виде кальциевой соли (Lennernas H., 2003).

Биодоступность АТ при пероральном приеме низкая (~14%), что обусловлено низкой растворимостью в воде, интенсивным пре-системным метаболизмом микросомальными ферментами CYP3A4 в слизистой оболочке ЖКТ, элиминацией посредством Р-гликопroteинов и эффектом «первого прохождения» через печень (Date A. A. et al., 2007; Wu X. et al., 2000). Р-гликопroteины, известные также как белки множественной лекарственной устойчивости, впервые были открыты на опухолевых клетках, устойчивых к лекарственной терапии. Позднее они были обнаружены во многих нормальных тканях: эпителии кишечника, в клетках печени, в клетках проксимальных канальцев почек, в структуре тканевых барьера (плацентарный, ГЭБ). В кишечнике, эти белки переносчики, располагающиеся в клеточной мембране на апикальной поверхности клеток, наряду с CYP3A4 формируют дополнительный

барьер на пути проникновения ксенобиотиков, включая ЛС, в системный кровоток (Agueros M. et al., 2011; Kim R. B., 2002).

Гиполипидемическое действие комплекса АТ:АГ 1:10 изучали на модели Тритон WR1339-индуцированной гиперлипидемии у белых мышей. На этом же объекте провели изучение фармакокинетики комплекса в сравнении с АТ при пероральном введении.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что АТ и АТ:АГ при внутрижелудочном введении дозозависимо снижают уровень общего холестерина у животных с индуцированной гиперлипидемией. Результаты представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Результаты гиполипидемического действия комплекса АТ:АГ 1:10 (мыши-самцы CD-1, n=10).

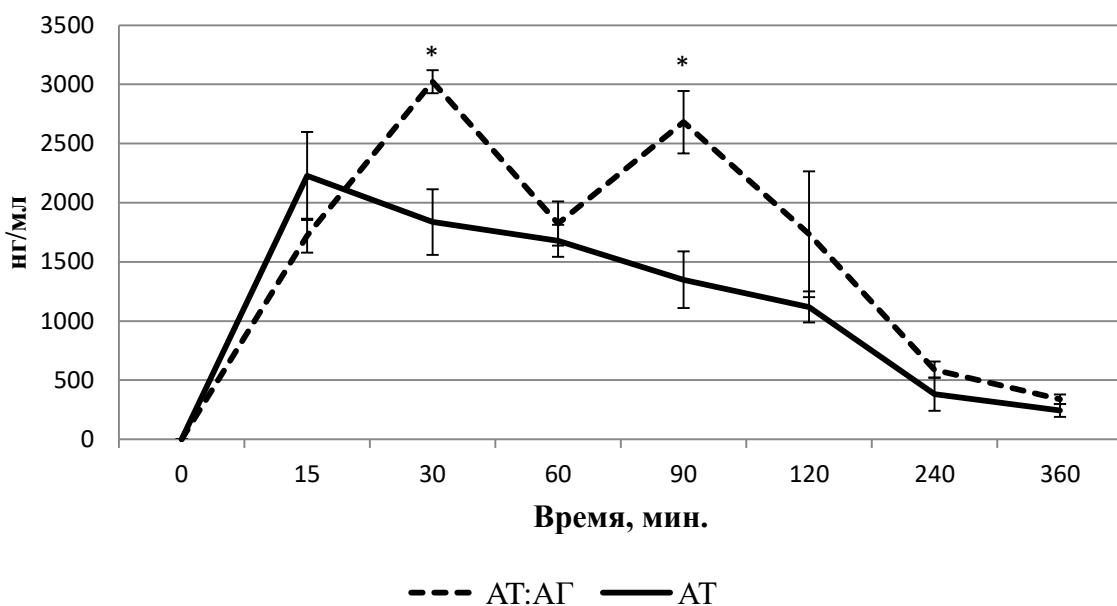
Группа	ОХ, ммоль/л	ТГ, ммоль/л
Контроль(Tyloxapol)	16,19±0,69	35,14±3,58
АТ, 50 мг/кг	13,63±0,75*	36,85±1,97
АТ, 100 мг/кг	12,16±0,75*	36,94±1,65
АТ:АГ 1:10, 550 (50) мг/кг	12,69±0,88*	35,02±3,34
АТ:АГ 1:10, 1100 (100) мг/кг	10,88±1,13*	34,83±3,39

Примечание: * p ≤ 0,05 по сравнению с контролем.

Из приведенных данных следует, что АТ:АГ более выражено проявляет свое фармакологическое действие (носит характер тенденции, поскольку статистически не достоверно) по сравнению с АТ в аналогичных дозах. Такой эффект может быть результатом улучшения биодоступности АТ и повышением его концентрации в крови животных. С целью доказательства этого предположения нами было проведено изучение фармакокинетики комплекса АТ:АГ в дозе 550 мг/кг и АТ в дозе 50 мг/кг после внутрижелудочного введения. В крови оценивали концентрацию АТ в обоих случаях. Результаты представлены на рисунке 50 и в таблице 16.

В целом из полученных данных следует, что биодоступность АТ из комплекса с АГ достоверно повышается, о чем свидетельствуют увеличенная C_{max} и AUC. Однако, после введения комплекса мы наблюдали фармакокинетическую кривую с двумя пиками концентрации АТ, такой формы кривой не было получено ни с одним из других изучаемых нами комплексов с ЛС. Можно предположить, что это является особенностью фармакокинетики АТ именно из комплекса с АГ.

Рисунок 50 – Фармакокинетическая кривая после однократного перорального введения комплекса АТ:АГ 1:10 в дозе 550 мг/кг и АТ в дозе 50 мг/кг (мыши-самцы CD-1, n=5 на каждую временную точку).



Примечание: * $p \leq 0,05$ по отношению с АТ в аналогичной точке.

В основе может лежать повторное комплексообразование с АГ при выделении с желчью в просвет кишечника и последующее повторное всасывание. Это может происходить при выделении части АТ в неизменном виде с желчью из-за высокой начальной концентрации и не полном его метаболизме в печени. Активное участие в элиминации АТ в неизменном виде из печени могут принимать, известные для статинов, транспортеры оттока (efflux transporters): белок, ассоциированный с полиглекарственной устойчивостью 2(Mrp2/Abcc2),

белок устойчивости рака молочной железы (Bscr/Abcg2) и насос выделения желчных кислот (Bsep/Abcb11) (Lennernas H., 2003; Fu Z. D. et al., 2014). Кроме этого, АГ является полисахаридом, а для этого типа веществ известна выраженная адгезия к слизистой оболочке ЖКТ (Luzardo, M. C. et al., 2000; Moschini R. et al., 2014), что может способствовать более длительному нахождению АГ в кишечнике и повторному захвату молекул АТ. В наших экспериментах *in vitro* на клетках линии Caco-2 также была показана адгезия АГ к эпителиальным клеткам кишечника.

Таблица 16 – Фармакокинетические параметры после однократного перорального введения комплекса АТ:АГ 1:10 в дозе 550 мг/кг (50 мг/кг АТ) и АТ в дозе 50 мг/кг.

	АТ:АГ 1:10	АТ
T_{1/2}, мин	93,00±9,99	88,50±8,27
T_{max}, мин	30,00±0,00*	18,80±3,75
C_{max}, нг/мл	2919,0±329,02	2590,00±267,84
AUC_{0-inf_obs}, нг/(мл×мин)	433561,00±24352,96*	336424,20±55251,22

Примечание: * $p \leq 0,05$ по отношению с АТ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об увеличении биодоступности АТ из комплекса с АГ.

3.1.5. Исследование фармакологических свойств комплекса СИМ:АГ 1:10

Симвастатин (СИМ) – гиполипидемическое средство из класса статинов, обладает плохой растворимостью в воде, низкой биодоступностью (менее 5%) и подвергается интенсивному пре-системному метаболизму микросомальными

ферментами P450 CYP3A в кишечнике и в печени (Zhang Z. et al., 2010; McKenne J. M., 2003).

Гиполипидемическое действие комплекса СИМ:АГ 1:10 изучали на модели Тритон WR1339 индуцированной гиперлипидемии у белых мышей. На этом же объекте провели изучение фармакокинетики комплекса в сравнении с СИМ при пероральном введении.

Было установлено, что СИМ снижает уровень общего холестерина дозозависимо, в дозе 40 мг/кг эффекта не проявляет, тогда как в дозе 80 мг/кг снижает уровень общего холестерина на 20,3%. СИМ:АГ в обеих дозах 440 и 880 мг/кг (что соответствует дозе СИМ 40 и 80 мг/кг) снижает ОХ в среднем на 15% (таблица 17).

Таблица 17 – Гипохолестеринемическое действие СИМ и СИМ:АГ 1:10 (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа	ОХ, ммоль/л	ТГ, ммоль/л
СИМ, 40 мг/кг	16,39±1,12	32,69±4,96
СИМ, 80 мг/кг	12,19±0,42*	33,33±3,09
СИМ /АГ 1/10, 440 (40) мг/кг	13,94±0,63*	36,95±2,23
СИМ /АГ 1/10, 880 (80) мг/кг	13,47±0,68*	35,96±2,10
Контроль (Тритон)	16,19±0,69	35,14±3,58

Примечание: * $p\leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Фармакокинетические исследования проводили в дозе СИМ и СИМ:АГ 40 мг/кг и 440 мг/кг, соответственно. Вещества вводили перорально, однократно. Как видно из рисунка 51 и таблицы 18 концентрация СИМ (C_{max}) в крови после введения комплекса выше на 136%, чем после введения чистого СИМ. Площадь под кривой (AUC) также выше в два раза в случае комплекса.

Рисунок 51 – Фармакокинетическая кривая после однократного перорального введения комплекса СИМ:АГ 1:10 в дозе 440 мг/кг и СИМ в дозе 40 мг/кг (мыши-самцы CD-1, n=5 на каждую временную точку). *p<0,005 в сравнении с СИМ в одинаковой временной точке.

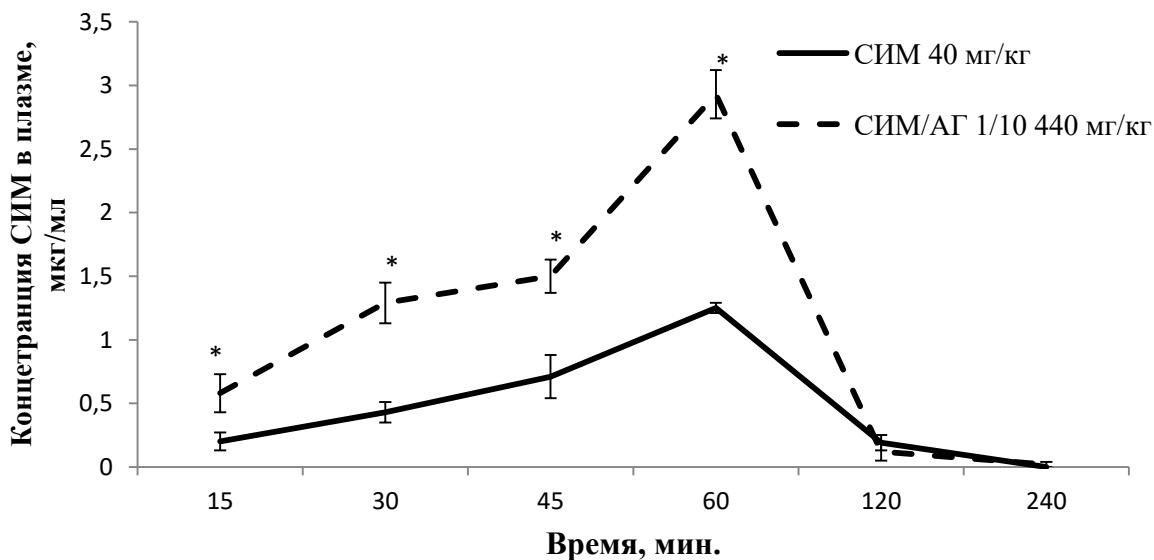


Таблица 18 – Фармакокинетические параметры после перорального введения СИМ в дозе 40 мг/кг и СИМ:АГ 1:10 в дозе 440 мг/кг (40 мг/кг СИМ) (среднее ± SE).

	СИМ:АГ 1:10	СИМ
$t_{1/2}$, мин	24,81±1,28*	31,16±1,40
T_{max} , мин	60±0,00	60±0,00
C_{max} , мкг/мл	2,93±0,09*	1,24±0,06
AUC_{0-inf} , (мкг × мин/мл)	165,41±6,53*	83,86±4,10

Примечание: *p<0,05 в сравнении с СИМ.

Таким образом, учитывая полученные данные можно констатировать значительное увеличение биодоступности СИМ из комплекса с АГ, что позволяет уменьшить эффективную дозу ЛС. Исходя из того, что СИМ, как АТ является статином, можно было бы ожидать также двухпиковую кривую концентрации в крови, однако такого эффекта отмечено не было. Вероятно, это связано с тем, что

СИМ быстрее и более полно метаболизируется в печени, чем АТ (Lennernas H., 2003) и поступает с желчью в ЖКТ в виде метаболитов (Mauro V. F., 1993), концентрацию которых мы не оценивали.

3.1.6. Исследование фармакологических свойств комплекса НФ:АГ 1:10

Нифедипин – блокатор кальциевых каналов, относится к группе производных дигидропиридина. Данное ЛС плохо растворимо в воде и обладает низкой биодоступностью при пероральном применении (56-77%) из-за пре-системного метаболизма. В медицинской практике широко применяется для снижения АД при артериальной гипертензии, включая гипертонический криз, профилактики приступов стенокардии и др. (Emara L. H. et al., 2002; Rashid T. J. et al., 1995; Kozjek F. et al., 1987).

Для изучения гипотензивного действия, супрамолекулярный комплекс НФ:АГ 1:10 вводили *per os* в двух дозах – 35 мг/кг и 17,5 мг/кг. Для сравнения использовали НФ в эквивалентных дозах – 3,5 мг/кг и 1,75 мг/кг при аналогичном введении. В эксперименте были использованы крысы двух разных линий: сток Wistar, с нормальным АД (110-120/70-80 мм.рт.ст) и НИСАГ, крысы с генетически детерминированным повышенным АД (170-180/130-140 мм.рт.ст).

Усредненные результаты для каждого вида животных представлены на рисунке 52 и 53 в виде % снижения систолического АД по сравнению с исходным САД.

Таким образом, при введении НФ в виде комплекса с АГ становится возможным использование меньших доз этого гипотензивного средства для достижения необходимого снижения АД.

Рисунок 52 – Снижение САД после перорального введения комплекса НФ:АГ и НФ крысам линии сток Wistar (n=5).

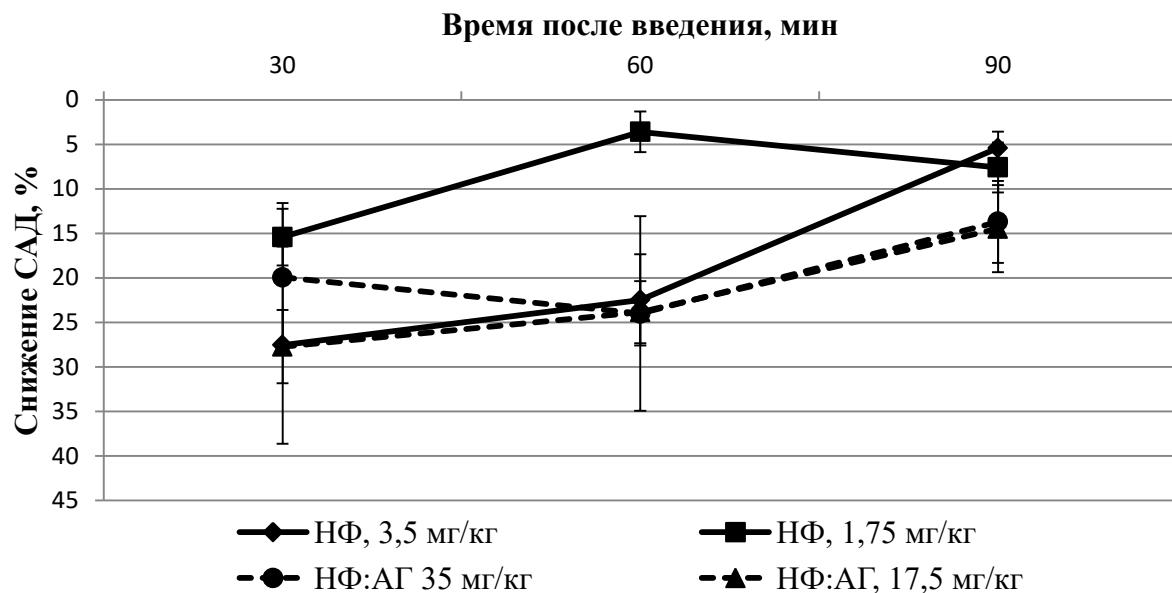
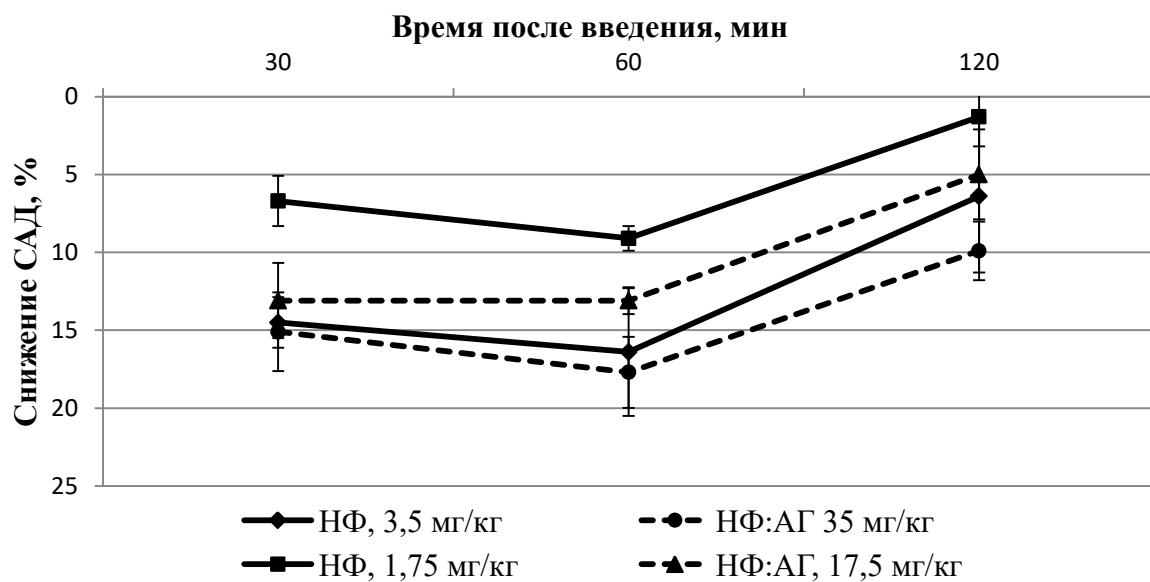


Рисунок 53 – Снижение САД после перорального введения комплекса НФ:АГ и НФ крысам линии НИСАГ (n=5).



Фармакокинетические исследования комплекса НФ:АГ в сравнении с НФ после перорального введения были также проведены на двух линиях крыс – сток Wistar и НИСАГ. Использованы дозы аналогичные таковым в эксперименте по определения гипотензивного эффекта. Результаты представлены на рисунках 54, 55 и в таблице 19, 20.

Рисунок 54 – Фармакокинетические кривые после перорального введения комплекса НФ:АГ в дозах 35 и 17,5 мг/кг и НФ в дозах 3,5 и 1,75 мг/кг. Крысы сток Wistar n=5.

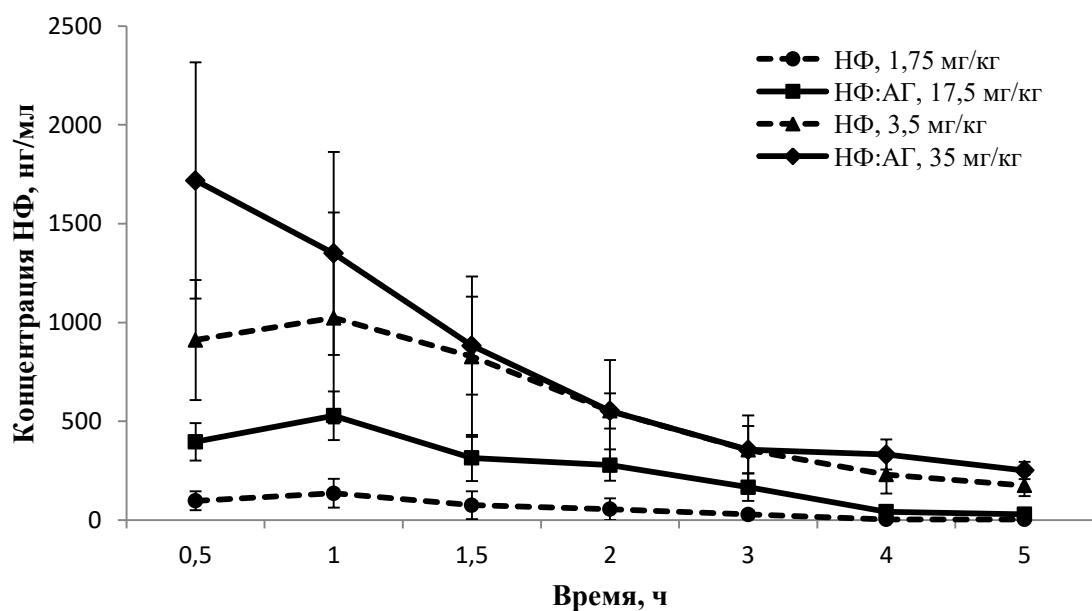


Таблица 19 – Фармакокинетические параметры НФ и НФ:АГ. Крысы сток Wistar. Дозы представлены в пересчете на НФ.

	1,75 мг/кг		3,5 мг/кг	
	НФ:АГ	НФ	НФ:АГ	НФ
T _{1/2} , ч	0,91±0,21	0,50±0,05	2,16±0,51	1,15±0,15
T _{max} , ч	0,9±0,30	0,8±0,30	0,5±0,20	1,0±0,30
C _{max} , нг/мл	540±112*	124±70	1748±686	1150±369
AUC _{0-inf_obs} , нг/(мл × ч)	1130±179*	216±160	3834±392*	1982±712

*p<0,05 в сравнении с НФ.

Рисунок 55 – Фармакокинетические кривые после перорального введения комплекса НФ:АГ в дозах 35 и 17,5 мг/кг и НФ в дозах 3,5 и 1,75 мг/кг. Крысы НИСАГ n=5.

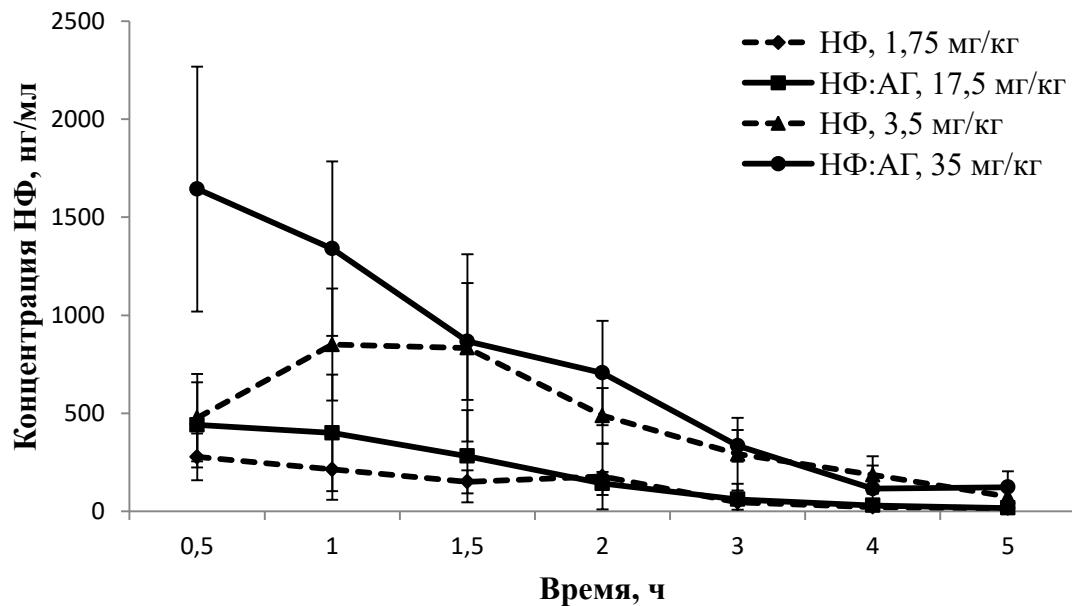


Таблица 20 – Фармакокинетические параметры НФ и НФ:АГ. Крысы НИСАГ. Дозы представлены в пересчете на НФ.

	1,75 мг/кг		3,5 мг/кг	
	НФ:АГ	НФ	НФ:АГ	НФ
T_{1/2}, ч	0,72±0,14	0,64±0,17	0,86±0,27	1,20±0,46
T_{max}, ч	0,9±0,50	1,3±0,50	0,7±0,30	1,3±0,60
C_{max}, нг/мл	516±239	400±186	1808±532	980±255
AUC_{0-inf_obs}, нг/(мл × ч)	661±233	525±214	3102±421	2150±705

Из полученных данных можно сделать вывод о повышении биодоступности НФ из его комплекса с АГ, что позволяет использовать меньшие дозы действующего вещества для достижения необходимого гипотензивного эффекта как у нормотензивных, так и у гипертензивных животных.

3.1.7. Исследование фармакологических свойств комплекса ВФ:АГ 1:10

Варфарин (ВФ) – наиболее распространенный непрямой антикоагулянт, являющийся производным кумарина. Блокирует в печени синтез витамин-К-зависимых факторов свертывания крови (II, VII, IX, X), снижает их концентрацию в плазме и замедляет процесс свертывания крови. Варфарин не растворим в воде. При пероральном введении обладает 100% биодоступностью (Van Aken H., 2001; Eason C. T. et al., 2001).

В качестве основного фармакодинамического параметра комплекса ВФ:АГ 1:10 и ВФ было изучено протромбиновое время после их однократного перорального введения крысам (через 24 и 48 часов). Комплекс вводили в дозе 20 мг/кг, что в пересчете на ВФ составляет 1,8 мг/кг, ВФ, использованного в качестве препарата сравнения, вводили в эквивалентной дозе 2 мг/кг. Результаты представлены на рисунке 56. Было обнаружено, что ПВ после введения комплекса увеличилось более, чем в два раза по сравнению с контролем (физ. раствор) и составило 30,03 сек., при этом у препарата сравнения ВФ протромбиновое время составило 42 сек. Однако такой результат можно считать достаточным для проявления требуемого эффекта по увеличению времени свертываемости крови.

Через 48 часов после однократного введения комплекса и ВФ было обнаружено, что ПВ в обеих группах стало одинаковым (рисунок 57).

Таким образом, фармакологический эффект комплекса ВФ:АГ развивается менее стремительно по сравнению с ВФ, однако при этом выраженность эффекта сохраняется на уровне чистого препарата.

Фармакокинетические исследования проводили на крысах при пероральном введении агентов ежедневно в течение трех дней. Для этого эксперимента была выбрана доза ВФ 0,5 мг/кг/день, поскольку известно, что, несмотря на способность животных переносить высокие однократные дозы ВФ, повторные введения ВФ в дозе более 1 мг/кг/день приводят к летальному исходу (Eason T. Ch. et al., 2001). Полученные результаты приведены на рисунке 58 и в таблице 21.

Рисунок 56 – Протромбиновое время через 24 часа после однократного перорального введения комплекса ВФ:АГ и ВФ (крысы сток Wistar, n=5).

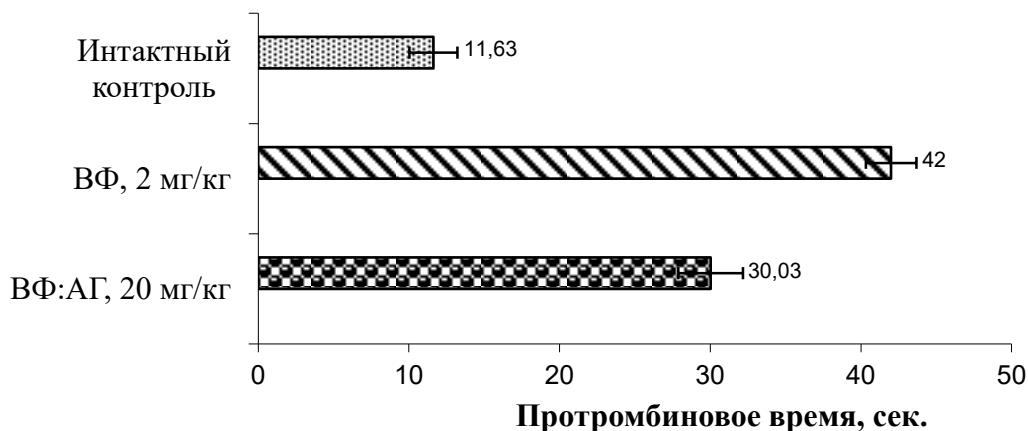
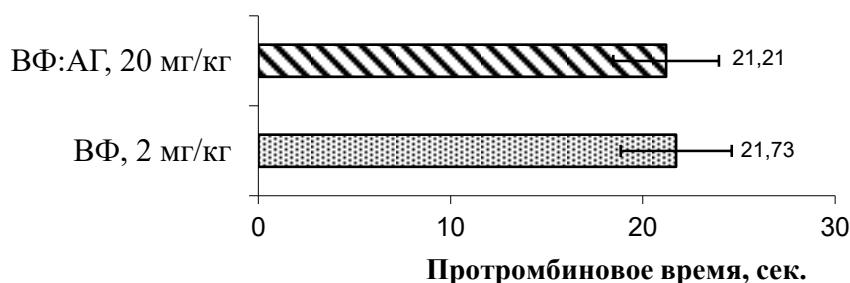


Рисунок 57 – Протромбиновое время через 48 часов после однократного перорального введения комплекса ВФ:АГ и ВФ (крысы сток Wistar, n=5).



Данные фармакокинетики коррелируют с результатами измерения ПВ у животных. Полученный фармакокинетический профиль ВФ и ВФ:АГ совпадает, однако комплексообразование с АГ снижает биодоступность ВФ. Это может быть связано с ухудшением абсорбции ВФ в ЖКТ за счет молекул АГ.

Рисунок 58 – Фармакокинетическая кривая после перорального введения ВФ:АГ и НФ ежедневно в течение трех дней в дозе 5 и 0,5 мг/кг, соответственно (самцы крыс сток Wistar n=5 в каждой временной точке). * $p\leq 0,05$ по сравнению с ВФ в аналогичной точке.

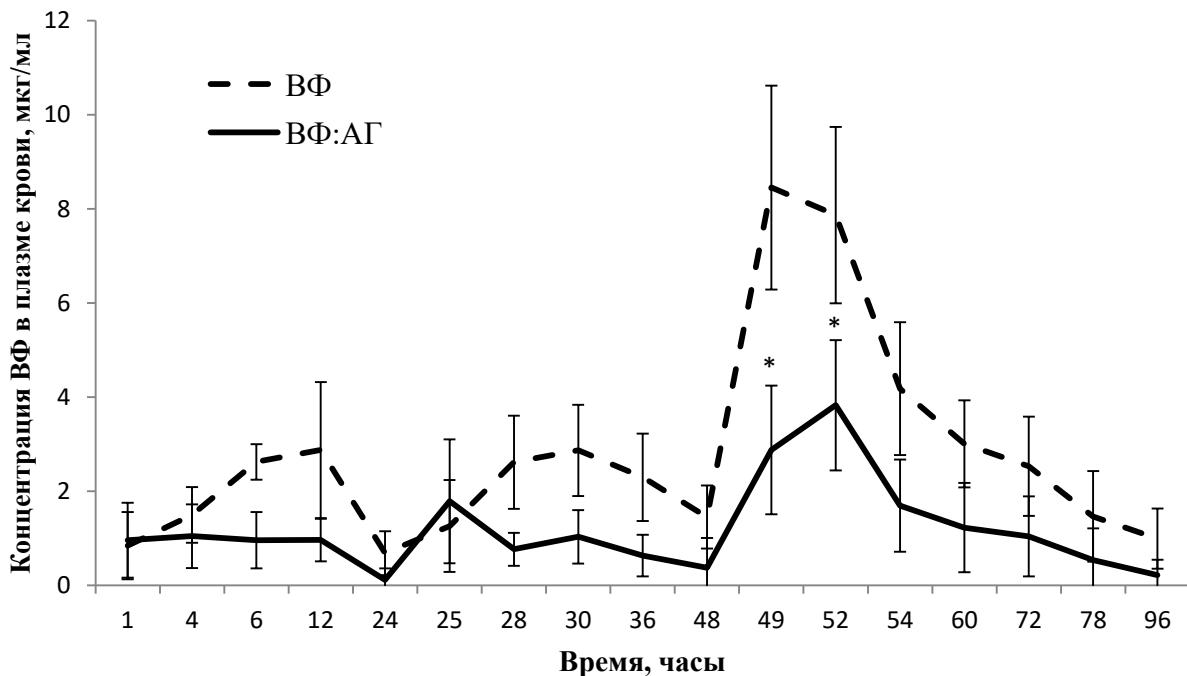


Таблица 21 – Фармакокинетические параметры после перорального введения ВФ:АГ и ВФ ежедневно в течение трех дней в дозе 5 и 0,5 мг/кг, соответственно. * $p\leq 0,05$ по сравнению с ВФ.

	ВФ:АГ 1:10	ВФ
$\lambda_z, 10^{-2} \text{ h}^{-1}$	$6,70 \pm 2,30$	$3,00 \pm 0,20$
$C_{max_ss}, \mu\text{g/ml}$	$3,85 \pm 1,40^*$	$9,12 \pm 1,40$
$C_{min_ss}, \mu\text{g/ml}$	$0,17 \pm 0,30^*$	$1,31 \pm 0,13$
T_{max_ss}, h	$51,40 \pm 1,30$	$50,50 \pm 1,70$
$C_{av}, \mu\text{g/ml}$	$1,29 \pm 0,38^*$	$5,42 \pm 1,89$
$T_{1/2}(z), \text{h}$	$11,64 \pm 4,85^*$	$23,41 \pm 1,40$
$AUC(\tau)ss, \mu\text{g h/ml}$	$30,95 \pm 9,19^*$	$130,25 \pm 45,25$

Аналогичное влияние на фармакокинетику ВФ оказывает другой полимер – колестирамин, являющийся сополимером стирола и дивинилбензола (Hirsh J. et al., 2001). Таким образом, использование комплексообразования с АГ повышает растворимость ВФ в воде, снижает его биодоступность, но сохраняет высокое антикоагулянтное действие. Такой эффект может быть использован для уменьшения интенсивности нарастания концентрации ВФ в плазме крови после перорального приема, что может снизить риск возникновения нежелательных кровотечений.

3.1.8. Исследование фармакологических свойств комплекса АБЗ:АГ 1:10

Альбендазол (АБЗ) применяется в качестве одного из основных лекарственных средств для терапии различных гельминтозов, в том числе и описторхоза, вызванного инфицированием *O. felineus*. Однако после терапии АБЗ у 68% пациентов сохраняется симптоматика заболевания, что требует повторной терапии (Armignacco O. et al., 2013). Одной из причин такой низкой эффективности лечения АБЗ является его плохая биодоступность (Rigter H. G. et al., 2004).

Комплекс АБЗ:АГ 1:10 был изучен на модели описторхоза у золотистых хомячков (*M. auratus*). Модель воспроизводилась путем инфицирования животных метацеркариями *O. felineus*. Для изучения противоописторхозного эффекта комплекс АБЗ:АГ и АБЗ вводили перорально однократно, 3 или 6 дней подряд один раз в сутки. Животных в группах было от 3 и до 11 особей. Через 3 недели от начала эксперимента определяли количество червей в желчных протоках печени животных (таблица 22).

В качестве положительного контроля использовали высокую трехкратную дозу альбендазола (500 мг/кг) для того, чтобы достигнуть максимальной эффективности действия этого препарата (суммарно 1500 мг/кг). Однако

оказалось, что этой дозы недостаточно для того, чтобы полностью излечить животных от описторхоза. Эффективность излечения в этом случае была 75%.

Выраженные различия между АБЗ и его комплексом АБЗ:АГ были получены при использовании суммарной дозы АБЗ 300 мг/кг, полученной в результате ежедневного (6 дней) введения АБЗ в дозе 50 мг/кг (таблица 22), а также суммарной дозы АБЗ 75 мг/кг, полученной в результате ежедневного (3 дня) введения АБЗ в дозе 25 мг/кг (таблица 22).

Таблица 22 – Исследование антигельминтного действия альбендазола и его композиции с арабиногалактаном (1:10) *in vivo* на модели экспериментального описторхоза золотистых хомяков *M. auratus* (n=3-11), вызванного заражением *O. felineus*.

Агенты	Кратность приема	Доза АБЗ на животное, мг/кг	Суммарная доза альбендазола, мг/кг	Кол-во червей после лечения	Выживаемость червей, %
Фруктоза	6	0	0	32±18	100
АГ	6	0	0	33±14	100
АБЗ	3	500	1500	8±4*	25
АБЗ	6	50	300	10±6	31
АБЗ:АГ	6	50	300	2±4*	6
АБЗ	6	25	150	15±9	46
АБЗ:АГ	6	25	150	12±4	37
АБЗ	3	25	75	35±11	100
АБЗ:АГ	3	25	75	17±8	53
АБЗ	1	100	100	28±10	87
АБЗ:АГ	1	100	100	30±18	93

Примечание: *р<0,05 по сравнению с фруктозой.

Эффективность комплекса АБЗ:АГ в дозе 6×50 мг/кг составила 94%, при этом многие животные оказались полностью излечены от описторхозной инвазии, тогда как использование АБЗ приводило к уничтожению только 69% паразитов. Эффективность АБЗ:АГ в дозе 3×25 мг/кг составила 47%, тогда как АБЗ в этой дозе был абсолютно неэффективен. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое увеличение антигельминтной активности является результатом повышения биодоступности АБЗ из его комплекса с АГ.

3.1.9. Исследование фармакологических свойств комплекса ПЗК:АГ 1:10

Празиквантел (ПЗК) является один из наиболее распространенных антигельминтных препаратов широкого спектра действия, включен в перечень жизненно важных ЛС по версии ВОЗ, является «препаратором выбора» для лечения трематодозов различной этиологии, в частности, описторхоза, клонорхоза, шистосомоза. Однако он очень плохо растворим в воде и поэтому имеет низкую биодоступность (Sneader W., 2005; Trevor A. J. et al., 2008; Pakharukova M. Y. et al., 2015; El-Lakkany N. et al., 2012).

Влияние комплексообразования с АГ на биодоступность ПЗК была оценена при сравнении фармакокинетики ПЗК в дозе 400 мг/кг и ПЗК:АГ 1:10 в дозе 4400 мг/кг (доза ПЗК 400 мг/кг), которые вводили однократно *per os* белым мышам. Также в качестве сравнения вводили ПЗК внутривенно в дозе 40 мг/кг. Было установлено, что комплексообразование в значительной мере повышает биодоступность ПЗК из комплекса с АГ при пероральном введении (рисунок 59). Фармакокинетические параметры приведены в таблице 23.

Поскольку печень является органом-мишенью для ПЗК при лечении описторхоза, была изучена его концентрация в этом органе мышей после однократного перорального введения ПЗК:АГ 1:10 в дозе 4400 мг/кг. ПЗК в дозе 400 мг/кг и внутривенного введения ПЗК в дозе 40 мг/кг. Временные точки для

перорального введения были 5 и 30 мин., а для внутривенного 1 и 5 минут (рисунок 60).

Установлено, что введение ПЗК в виде комплекса с АГ значительно повышает его концентрацию в печени через 5 минут, что соответствует T_{max} . При этом через 30 минут концентрация ПЗК в печени сохраняется на достаточно высоком уровне, тогда как в крови наблюдается выраженное снижение его концентрации. Чистый ПЗК через 30 мин после введения определяется в следовых количествах. Концентрация ПЗК в крови через 1 мин после внутривенного введения в дозе 40 мг/кг больше C_{max} ПЗК:АГ практически в два раза, однако его концентрация в печени сразу после введения (1 мин) на ~ 40% меньше. Можно предположить, что это связано с быстрой элиминацией с желчью большей части ПЗК в неизменном виде и абсорбцией гепатоцитами оставшегося меньшего количества ПЗК.

Рисунок 59 – Фармакокинетическая кривая после однократного перорального введения комплекса ПЗК:АГ 1:10 в дозе 4400 мг/кг, ПЗК в дозе 400 мг/кг и ПЗК при в/в в дозе 40 мг/кг (мыши-самцы CD-1, n=5 на каждую временную точку). * $p\leq 0,05$ по сравнению с ПЗК в аналогичной точке.

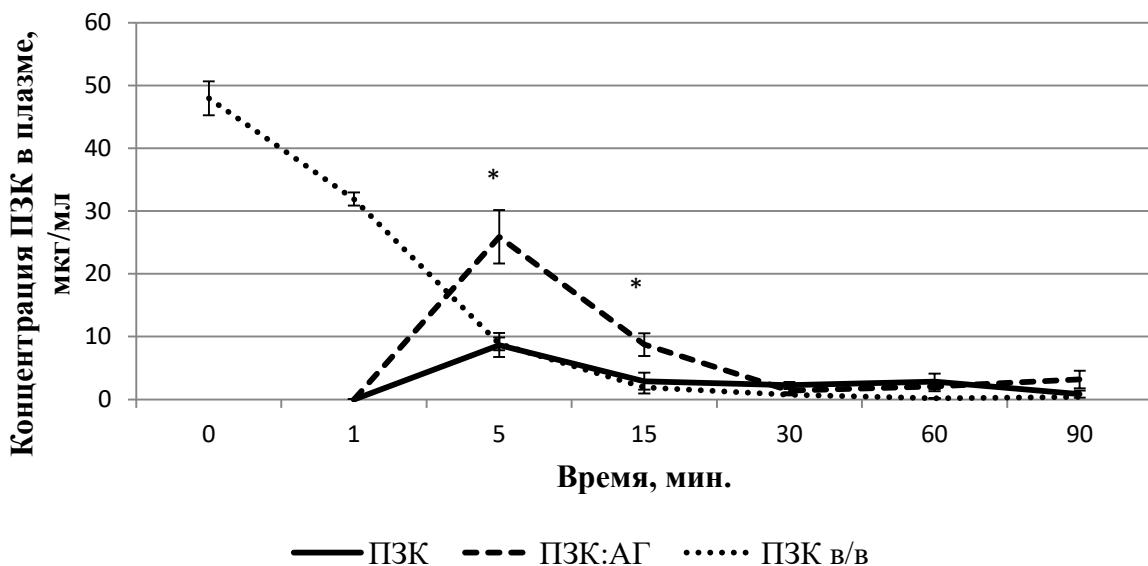


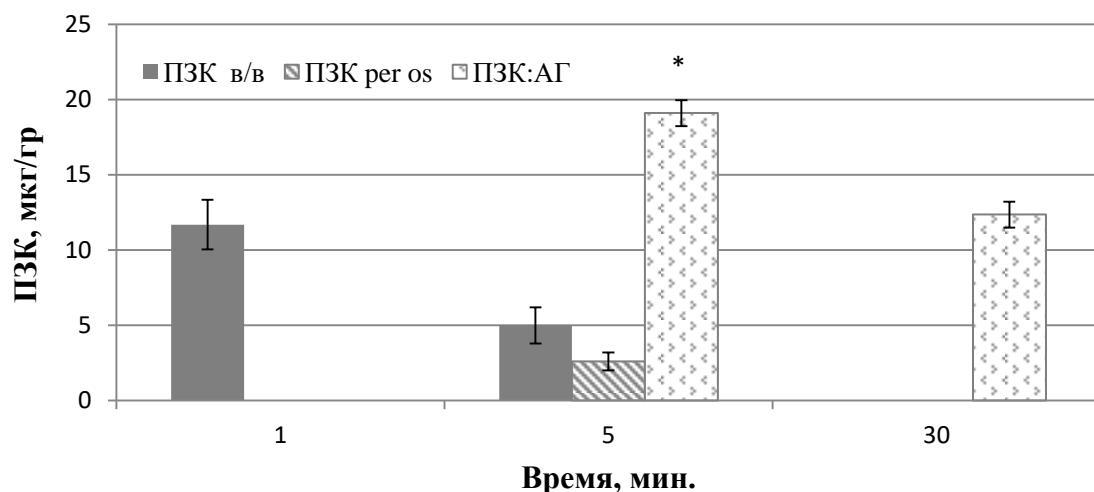
Таблица 23 – Фармакокинетические параметры после перорального введения ПЗК:АГ 1:10 в дозе 4400 мг/кг (400 мг/кг ПЗК) и ПЗК в дозе 400 мг/кг. * $p\leq 0,05$ по сравнению с ПЗК.

	ПЗК	ПЗК:АГ
T_{1/2}, мин	27,28±6,96	17,43±5,15
T_{max}, мин	5,00±0,00	5,00±0,00
C_{max}, мкг/мл	10,34±1,98	28,22±5,03*
AUC_{0-inf_obs}, мкг/(мл × мин)	312,63±53,91	389,21±44,65

Через 5 мин, несмотря на одинаковую с чистым ПЗК концентрацию в крови, в печени обнаруживается большее количество ПЗК, введенного в/в.

Таким образом, комплексообразование с АГ усиливает биодоступность ПЗК и в значительной степени увеличивает его концентрацию в органе-мишени.

Рисунок 60 – Концентрация ПЗК в печени после однократного перорального введения ПЗК:АГ 1:10 в дозе 4400 мг/кг (400 мг/кг ПЗК), ПЗК в дозе 400 мг/кг. Внутривенно ПЗК вводили в дозе 40 мг/кг. * $p\leq 0,05$ по сравнению с ПЗК в аналогичной точке. Мыши-самцы CD-1, n=5.



3.2. Комплексы с глицирризиновой кислотой

3.2.1. Исследование фармакологических свойств комплекса АТ:Na₂ГК 1:10

Гиполипидемическое действие комплекса АТ:Na₂ГК 1:10 изучали на модели Тритон WR1339-индуцированной гиперлипидемии у белых мышей. На этом же объекте провели изучение фармакокинетики комплекса в сравнении с АТ при пероральном введении.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что АТ и АТ:Na₂ГК при внутрижелудочном введении дозозависимо снижают уровень общего холестерина у животных с индуцированной гиперлипидемией. Результаты представлены в таблице 24.

Из приведенных данных следует, что АТ:Na₂ГК более выраженно (носит характер тренда, поскольку статистически не достоверно) проявляет свое фармакологическое действие по сравнению с АТ в аналогичных дозах. Однако это действие несколько менее выражено по сравнению с АТ:АГ 1:10.

Таблица 24 – Гиполипидемический эффект после однократного перорального введения комплекса АТ:Na₂ГК 1:10 в дозе 550 и 1100 мг/кг и АТ в дозе 50 и 100 мг/кг (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа	ОХ, ммоль/л	ТГ, ммоль/л
Контроль (Tyloxapol)	16,19±0,69	35,14±3,58
АТ, 50 мг/кг	13,63±0,75*	36,85±1,97
АТ, 100 мг/кг	12,16±0,75*	36,94±1,65
АТ:Na ₂ ГК 1:10, 550 (50) мг/кг	12,01±1,22*	35,21±3,20
АТ:Na ₂ ГК 1:10, 1100 (100) мг/кг	11,69±0,96*	35,57±2,85

Примечание: * p ≤ 0,05 по сравнению с контролем

Результаты изучения фармакокинетики комплекса представлены на рисунке 61 и в таблице 25. AT:Na₂ГК вводили мышам в дозе 550 мг/кг, AT в дозе 50 мг/кг внутрижелудочно, однократно, натощак. В крови оценивали концентрацию AT в обоих случаях.

Рисунок 61 – Фармакокинетическая кривая после внутрижелудочного введения AT:Na₂ГК 1:10 в дозе 550 мг/кг (50 мг/кг AT) и AT в дозе 50 мг/кг (мыши-самцы CD-1, n=5 на каждую временную точку). *p ≤ 0,05 по сравнению с AT в аналогичной точке.

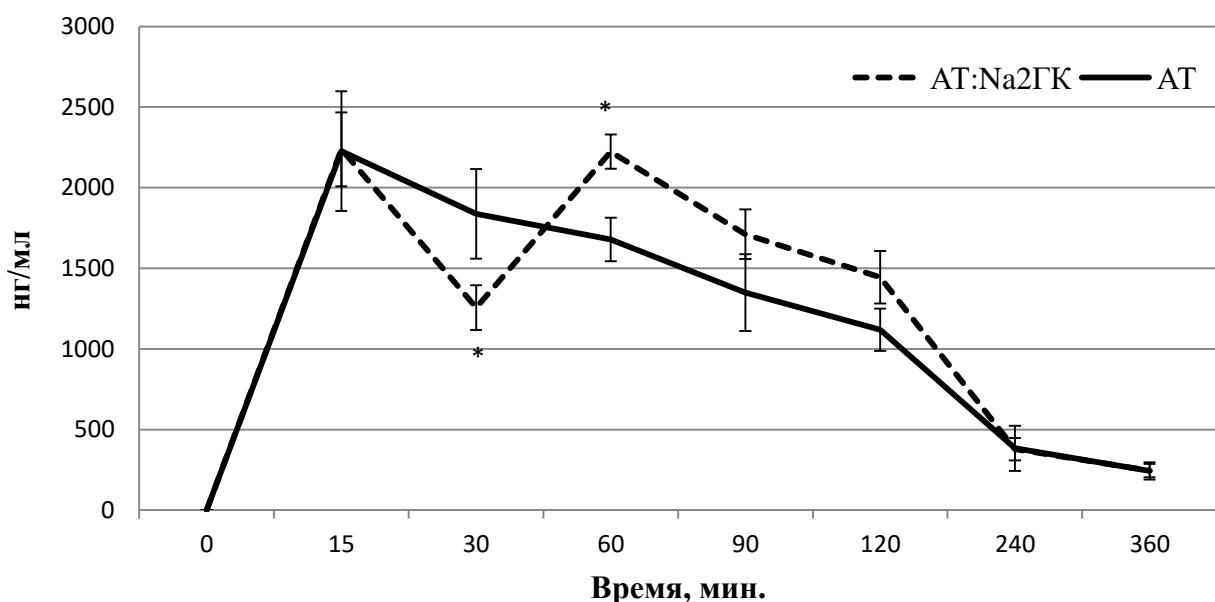


Таблица 25 – Фармакокинетические параметры после однократного перорального введения комплекса AT:Na₂ГК 1:10 в дозе 550 мг/кг (50 мг/кг AT) и AT в дозе 50 мг/кг. * p ≤ 0,05 по сравнению с AT.

	AT:Na ₂ ГК 1:10	AT
T _{1/2} , мин	100,00±13,03	88,50±8,27
T _{max} , мин	42,00±11,02*	18,80±3,75
C _{max} , нг/мл	2420,6±157,11	2590,00±267,84
AUC _{0-inf_obs} , нг/(мл × мин)	385932,80±15692,19	336424,20±55251,22

Анализ фармакокинетики показывает, что T_{max} АТ из комплекса увеличился в 2,2 раза по сравнению с чистым АТ, при этом C_{max} в обоих случаях оказался одинаковым. Такой эффект может быть причиной замедленного высвобождения молекул АТ из мицелл ГК. Существование таких мицелл в водных растворах ГК и ее композиций с лекарственными веществами было показано ранее методом гель-фильтрационной хроматографии. Кроме этого, были измерены их молекулярные массы и оценены размеры и доказана инкорпорация таких молекул по типу «гость-хозяин» (Dushkin A. V. et al., 2010). Такие данные значительно отличаются от описанных ранее по АТ:АГ, где T_{max} пролонгировалось лишь на 11,2 мин, но при этом C_{max} увеличилось в 1,13 раза. Вероятно, в данном случае два пика на фармакокинетической кривой, в отличие от АТ:АГ, обусловлены именно замедленной абсорбцией, а не особенностью фармакокинетики АТ. Первый пик – это всасывание свободного АТ и начало высвобождения АТ из мицелл ГК, а второй пик полностью сформирован высвободившимся АТ. В пользу этой гипотезы можно также считать большую растворимость АТ:Na₂ГК 1:10 в воде, чем у АТ:АГ 1:10 (2,02 и 0,47 г/л, соответственно). Это свидетельствует о предпочтительности молекул АТ (растворимость в воде составляет 0,131 г/л) находится внутри мицелл ГК, куда развернуты гидрофобные участки гликозида. Также, полученные фармакокинетические данные объясняют различия фармакодинамики исследованных комплексов.

3.2.2. Исследование фармакологических свойств комплекса СИМ:Na₂ГК 1:10

Гиполипидемическое действие комплекса СИМ:Na₂ГК 1:4 изучали на модели Тритон WR1339-индуцированной гиперлипидемии у белых мышей. На этом же объекте провели изучение фармакокинетики комплекса в сравнении с СИМ при пероральном введении. Результаты гиполипидемического действия представлены в таблице 26.

Из полученных данных видно, что, несмотря на то, что все тестируемые вещества достоверно снизили ОХ, такой разницы в эффекте между комплексом и СИМ, как в случае с СИМ:АГ, не было обнаружено. СИМ в комплексе проявляет аналогичный чистому СИМ эффект. Однако здесь следует иметь в виду, что СИМ вводится растворенным не просто в воде как комплекс, а в виде водно-твиновой суспензии, где твин выступает в роли солюбилизатора.

Таблица 26 – Гипохолестеринемическое действие СИМ и СИМ:Na₂ГК 1:4 (мыши-самцы CD-1, n=10).

Группа	ОХ, ммоль/л	ТГ, ммоль/л
СИМ, 40 мг/кг	15,61±0,99*	45,55±1,41
СИМ , 80 мг/кг	11,89±1,86*	37,25±4,45
СИМ:Na ₂ ГК 1:4, 200 (40) мг/кг	16,41±0,53*	46,85±1,41
СИМ:Na ₂ ГК 1:4, 400 (80) мг/кг	12,38±1,19*	34,19±4,17
Контроль (Тритон)	18,17±0,38	46,13±1,65

Примечание: *p≤0,05 по сравнению с контролем

Фармакокинетические исследования проводили в дозе СИМ и СИМ:Na₂ГК 40 мг/кг и 200 мг/кг, соответственно. Вещества вводили перорально, однократно. Как видно из рисунка 62 и таблицы 27, C_{max} СИМ в крови после введения комплекса повышается не слишком выражено (на 34%), что значительно меньше, чем после введения СИМ:АГ 1:10 (136%). AUC также увеличивается не столь значительно, в 1,6 раза (в случае СИМ:АГ в 2 раза).

Рисунок 62 – Фармакокинетическая кривая после перорального введения СИМ в дозе 40 мг/кг и СИМ:Na₂ГК 1:4 в дозе 200 мг/кг (40 мг/кг СИМ), мыши-самцы CD-1, n=5 в каждой временной точке. *p<0,05 в сравнении с СИМ в одинаковой временной точке.

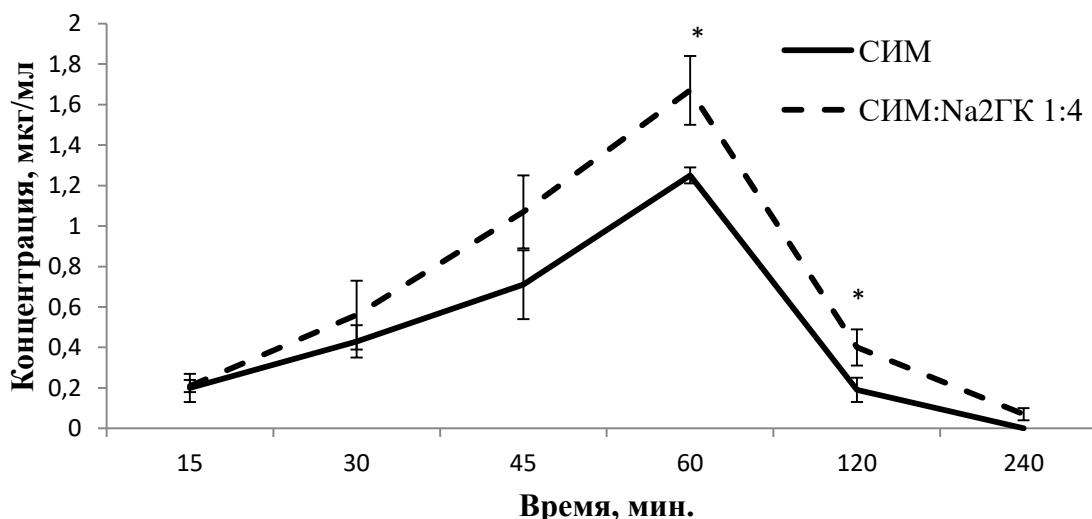


Таблица 27 – Фармакокинетические параметры после перорального введения СИМ в дозе 40 мг/кг и СИМ:Na₂ГК 1:4 в дозе 200 мг/кг (40 мг/кг СИМ).

	СИМ:Na ₂ ГК 1:4	СИМ
t _{1/2} , мин	29,22±0,41	31,16±1,40
T _{max} , мин	60±0,00	60±0,00
C _{max} , мкг/мл	1,67±0,09*	1,24±0,06
AUC _{0-inf} , (мкг × мин/мл)	134,88±4,23*	83,86±4,10

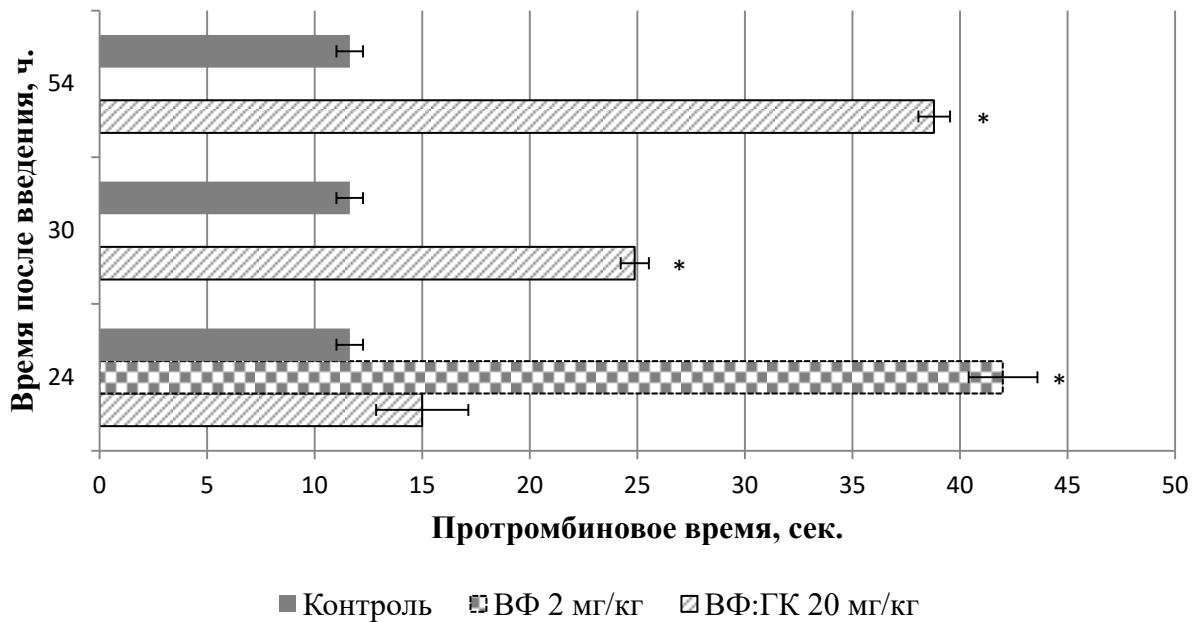
Примечание: *p<0,05 в сравнении с СИМ.

Этим фактом можно объяснить отсутствие разницы фармакодинамики между СИМ и его комплексом с Na₂ГК. Скорее всего, свою роль здесь также играют мицеллы ГК, которые СИМ не выгодно покидать. Его растворимость в воде составляет всего 0,0028 г/л, что в 46 раз меньше, чем у АТ.

3.2.3. Исследование фармакологических свойств комплекса ВФ:ГК 1:10

Протромбиновое время после однократного перорального введения ВФ:ГК 1:10 и ВФ крысам было изучено через 24, 30 и 54 часов. Комплекс вводили в дозе 20 мг/кг, что в пересчете на ВФ составляет 1,8 мг/кг. ВФ, использованный в качестве препарата сравнения, вводили в эквивалентной дозе 2 мг/кг. Было установлено, что через сутки не происходит выраженного увеличения времени свертываемости крови после введения комплекса, что отличается от ВФ, после введения которого, через 24 часа протромбиновое время составило 42 сек, (рисунок 63). Измерение ПВ в последующие временные интервалы показало, что сравнимый с ВФ эффект развивается только через 54 часа после однократного введения. Такие результаты контрастируют с данными, полученными при изучении комплекса ВФ:АГ, где выраженный эффект проявился уже спустя сутки после введения. При этом растворимость в воде, в случае комплекса с ГК, больше таковой у комплекса с АГ более, чем в 2,5 раза. Причиной этому может служить замедленное высвобождение молекул ВФ из мицелл ГК, и, как следствие, ухудшение абсорбции в ЖКТ и более длительное накопление ВФ в печени с отсрочкой антикоагулянтного действия. Ранее было показано, что различные компоненты диеты животных могут влиять на его токсический (антикоагулянтный) эффект, так, например, крысы, получавшие вместо воды молоко, при пероральном введении ВФ оказались более устойчивыми к его антикоагулянтному действию (Colvin H. W. et al., 1974). Вероятнее всего липофильной молекуле ВФ более выгодно переходить в мицеллы, образованные желчными кислотами и продуктами метаболизма липидов молока или находиться в мицеллах ГК, чем проходить через не перемешиваемый водный слой кишечного эпителия (Loftsson T. et al., 2007) на пути к клеточной мембране энтероцитов.

Рисунок 63 – Протромбиновое время после перорального введения ВФ:ГК 1:10 (крысы сток Wiatar, n=5). *p<0,05 в сравнении с контролем.



Таким образом, использование комплексов ВФ:ГК представляется не перспективным, ввиду длительного наступления антикоагулянтного действия после однократного перорального введения.

3.2.4. Исследование фармакологических свойств комплекса ПЗК:Na₂ГК 1:10

Влияние комплексообразования с Na₂ГК на биодоступность ПЗК было оценено при сравнении фармакокинетики ПЗК в дозе 400 мг/кг и ПЗК:Na₂ГК 1:10 в дозе 4400 мг/кг, которые вводили однократно *per os* белым мышам. Результаты представлены на рисунке 64 и в таблице 28.

Стоит отметить двухпиковую фармакокинетическую кривую, где первый пик это, вероятно, абсорбция свободного ПЗК и ПЗК, начинающего высвобождение из мицелл. Второй пик – это абсорбция ПЗК, полностью высвободившегося из мицелл Na₂ГК. Таким образом, исходя из полученных

данных, можно сделать вывод, что в мицеллах находится большая часть ПЗК. Это и способствует сдвигу T_{max} на 13 минут и увеличению AUC.

Рисунок 64 – Фармакокинетика ПЗК в дозе 400 мг /кг и его комплекса с $\text{Na}_2\text{ГК}$ в дозе 4400 мг/кг (400 мг/кг ПЗК) после перорального введения (мыши-самцы CD-1, n=5 в каждой временной точке). * $p<0,05$ в сравнении с ПЗК в аналогичной точке.

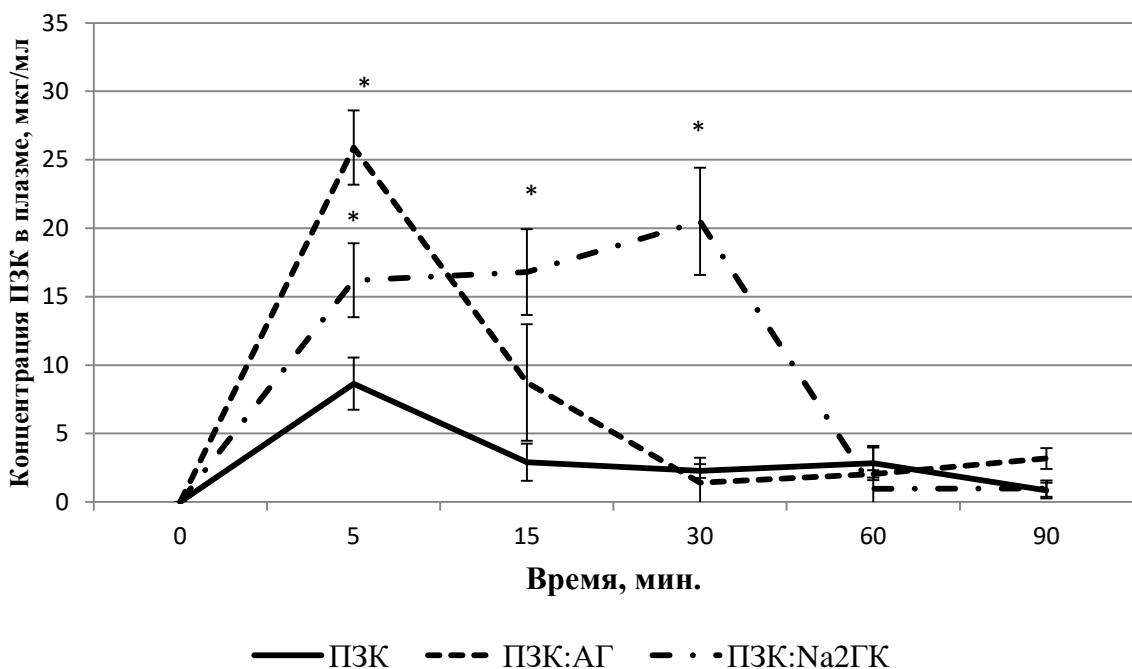


Таблица 28 – Фармакокинетические параметры ПЗК в дозе 400 мг/кг и его комплекса с $\text{Na}_2\text{ГК}$ в дозе 4400 мг/кг (400 мг/кг ПЗК) после перорального введения.

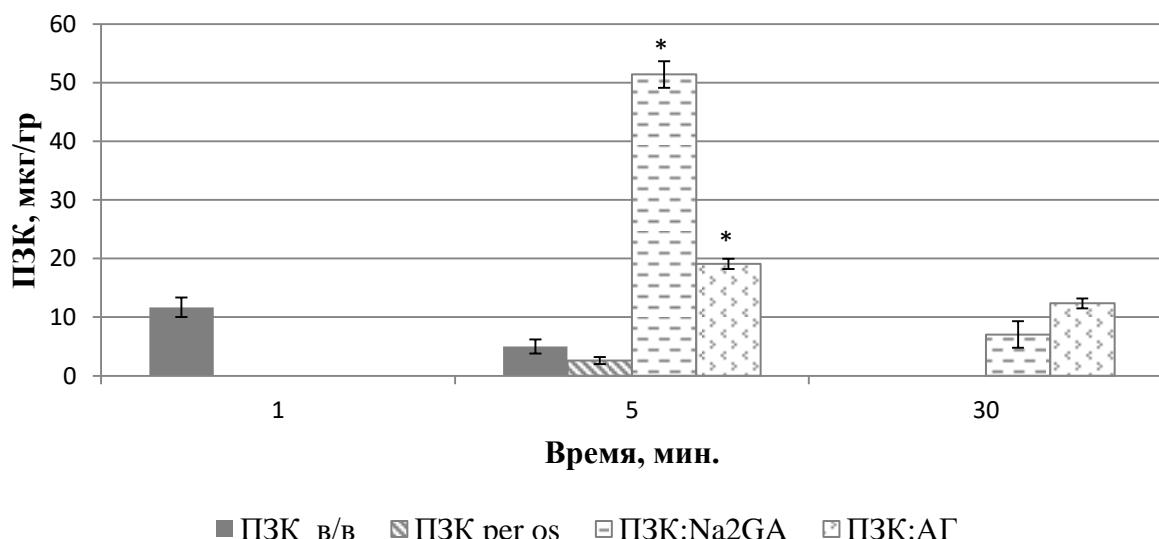
	ПЗК	ПЗК:Na ₂ ГК
$T_{1/2}$, мин	27,28±6,96	22,57±11,08
T_{max} , мин	5,00±0,00	18,75±3,75*
C_{max} , мкг/мл	10,34±1,98	24,61±5,94*
AUC_{0-inf_obs} , мкг/(мл × мин)	312,63±53,91	863,72±195,13*

Примечание: * $p<0,05$ в сравнении с ПЗК.

Совокупно это объясняет повышение острой токсичности комплекса (ЛД_{50} ПЗК: $\text{Na}_2\text{ГК} = 1560 \text{ мг/кг}$, ЛД_{50} ПЗК $> 2500 \text{ мг/кг}$) и способствует уменьшению эффективной дозы ПЗК, которую необходимо вводить в живой организм для получения противопаразитарного действия и, как следствие, снижает ксенобиотическую нагрузку.

Как и в случае с АГ, была изучена концентрация ПЗК в печени после однократного перорального введения ПЗК:Na₂ГК 1:10 в дозе 4400 мг/кг (доза ПЗК 400 мг/кг). Дизайн эксперимента был аналогичен комплексу с АГ. Полученные концентрации ПЗК в печени отличались от таковых у комплекса ПЗК:АГ, но имеют корреляцию с его фармакокинетикой в комплексе с Na₂ГК (рисунок 65). Через 5 минут после введения его концентрация была выше в 2,6 раза больше, чем в случае ПЗК:АГ, однако через 30 минут оказалась меньше практически в два раза. Концентрация в крови, при этом, имеет обратную тенденцию, т.е. через 5 минут после введения ПЗК в крови определяется меньше, чем через 30 мин.

Рисунок 65 – Концентрация ПЗК в печени после перорального введения ПЗК:Na₂ГК 1:10 в дозе 4400 мг/кг (400 мг/кг ПЗК), ПЗК в дозе 400 мг/кг. Внутривенно ПЗК вводили в дозе 40 мг/кг. Мыши-самцы CD-1 n=5 в каждой точке времени. *p<0,05 в сравнении с ПЗК в аналогичной точке.



Полученные данные, вероятно, обусловлены некоторой метаболической емкостью печени и при ее превышении излишки ПЗК пропускаются в системный кровоток. Такой эффект был обнаружен после введения обоих комплексов.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что, как и в комплексе с АГ, ПЗК:Na₂ГК значительно улучшает биодоступность и накопление ПЗК в органе-мишени.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АГ, Na₂ГК И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ЛС *IN VITRO*

В результате проведенных фармакодинамических и фармакокинетических исследований комплексов ЛС с АГ и Na₂ГК, стало очевидным влияние дополнительных факторов, помимо улучшения растворимости в воде, на биодоступность ЛС из комплексов. Наиболее наглядными являются эксперименты с АТ и СИМ, где лучшая растворимость комплексов с Na₂ГК не приводила к лучшей биодоступности. К таким факторам может относиться непосредственное влияние носителей на мембрану клеток кишечного эпителия: оно может заключаться в изменении свойств липидного бислоя, плотности межклеточных контактов или ингибировании транс-мембранных белков множественной лекарственной устойчивости, таких как Р-гликопротеины. Для выяснения дополнительного механизма повышения биодоступности ЛС из исследуемых комплексов были проведены эксперименты *in vitro* на двух видах клеточных линий – Caco-2 (клетки эпителиальной колоректальной аденокарциномы человека) и STO-TG-piro (клеточная линия эмбрионильных фибробластов мыши устойчивая к антибиотику пуромицину).

4.1. Исследование свойств АГ, Na₂ГК и их комплексов с ЛС на клеточной линии Caco-2

Клеточная линия Caco-2 является стандартной моделью *in vitro* для оценки проницаемости ЛВ через стенку ЖКТ *in vivo*. Эти клетки сохраняют практически полные морфо-функциональные свойства, присущие клеткам кишечного эпителия, в том числе экспрессируют белки множественной лекарственной устойчивости, как, например, Р-гликопротеин. Как правило, полученные в таких экспериментах данные имеют хорошую корреляцию с биодоступностью ЛС в живых организмах (Artursson P. et al., 2001; Pade V. et al., 1998).

В первую очередь было изучено влияние АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ на монослой клеток. В качестве критерия использовали изменения уровня трансэпителиального электрического сопротивления (TEER), которое отражает ток ионов через плотные межклеточные контакты и используется для подтверждения конфлюэнтности монослоя клеток (Van Breemen R. B. et al., 205). Было установлено, что данный показатель изменяется разнонаправленно у АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ и зависит от концентрации (рис. 66, 67). $\text{Na}_2\text{ГК}$ в концентрации 0,5 и 2,5% снижает TEER, а АГ в аналогичных концентрациях увеличивает. Полученные результаты можно объяснить различными свойствами исследуемых веществ. Известно, что ГК способна встраиваться в липидный бислой клеточной мембраны и, тем самым, нарушать его структуру и свойства (Selyutina O. Y. et al., 2016), и, следовательно, влиять на плотность межклеточных контактов. Результаты АГ можно расценивать как адгезию к клеткам монослоя и создания препятствия для тока ионов, тем более, что адгезия полисахаридов к эпителиальным клеткам описана в литературе (Luzardo M. C. et al., 2000; Moschini R. et al., 2014). Оба этих свойства могут вносить дополнительный вклад в увеличении биодоступности ЛС из комплексов.

Из комплексов, изученных *in vivo*, для экспериментов на клетках были выбраны комплексы с АТ и ПЗК. Для АТ в литературе описано участие белков множественной лекарственной устойчивости (Pgp) в снижении его биодоступности, а для ПЗК такая информация отсутствует. Хотя известно, что резистентность к ПЗК некоторых облигатных паразитов, как, например, *Schistosoma mansoni* обусловлена вовлечением Pgp-подобных белков переносчиков (Pinto-Almeida A. et al., 2015).

Рисунок 66 – Трансэпителиальное сопротивление (TEER) клеток Caco-2 после инкубации с $\text{Na}_2\text{ГК}$. * $p<0,05$ в сравнении с контролем в аналогичной точке.

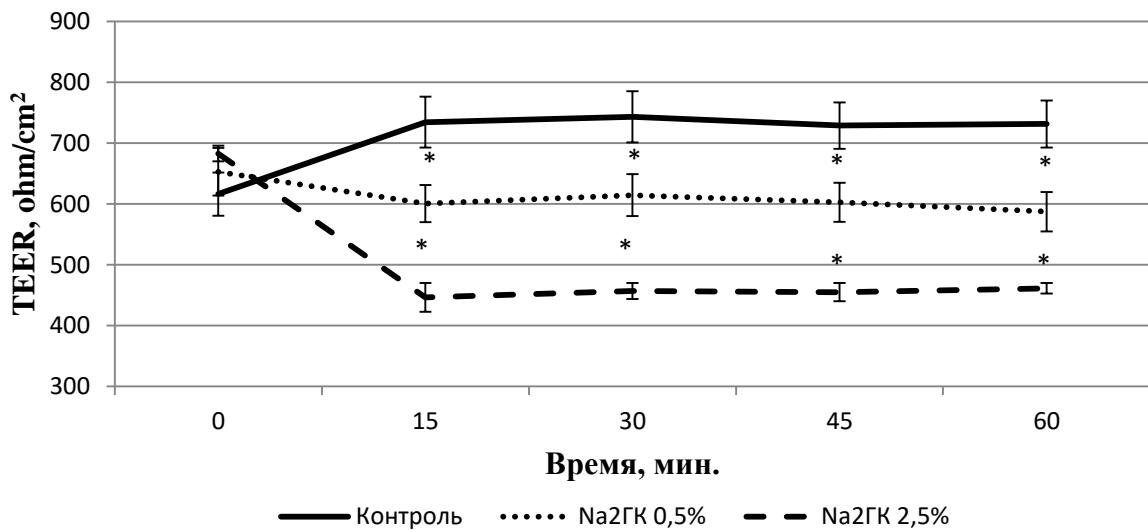
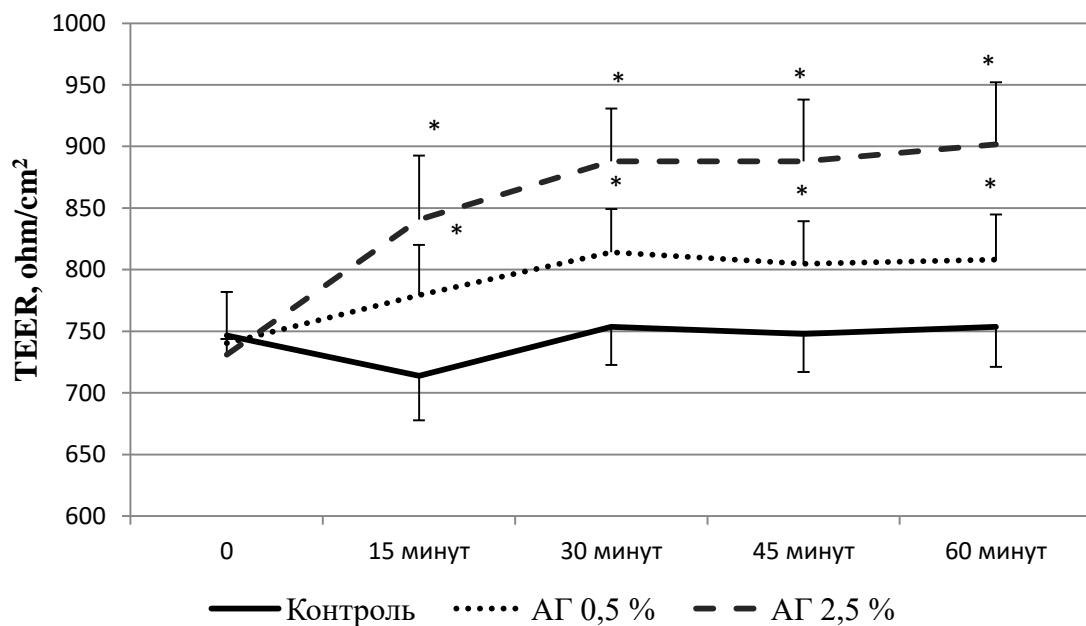
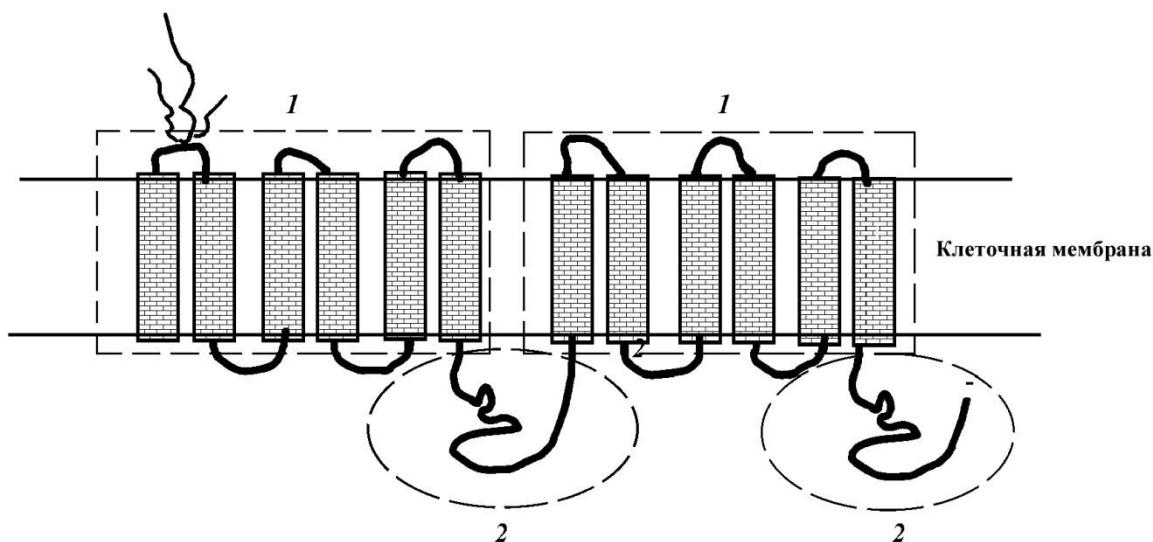


Рисунок 67 – Трансэпителиальное сопротивление (TEER) клеток Caco-2 после инкубации с АГ. * $p<0,05$ в сравнении с контролем в аналогичной точке.



При изучении комплекса АТ:АГ 1:10 было обнаружено значительное увеличение абсорбции АТ из комплекса по сравнению с чистым АТ (рисунок 69). Наблюдаемый эффект может быть следствием блокирования/снижения активности СYP3A4 и/или Р-гликопротеидов молекулами АГ, которые, как было показано в наших экспериментах, способны к адгезии к клеточному монослою. Такая адгезия, вероятно, может приводить к взаимодействию с доменами Р-гликопротеида, расположенными на внешней части клеточной мембранны (рис. 68) и блокировать действие этого трансмембранного белка-переносчика.

Рисунок 68 – Структура белка множественной лекарственной устойчивости PgP: 1) трансмембранные домены (выделены прямоугольниками); 2) домены связывания с АТФ, выделены овалами (Stavrovskaya A. A., 2000).



Также из литературных источников известно (Wu X. et al., 2000; González, R. C. B. et al., 2004; Kawakami K. et al., 2002), что различные химические вещества, как, например, верапамил, производные полиэтиоксилированного касторового масла, эмульгирующий агент Cremophore RH 60 и твин 80 могут повышать абсорбцию ЛС, являющихся субстратами для СYP3A4 и Р-гликопротеида, включая АТ.

Коэффициент проницаемости (P_{app}) для АТ в комплексе с АГ составил $19,04 \pm 2,00 \times 10^{-6}$ см/сек, в то время, как для АТ – $8,33 \pm 0,79 \times 10^{-6}$ см/сек. Комплекс АТ:Na₂ГК показал большее повышение абсорбции АТ ($P_{app} 64,95 \pm 0,03 \times 10^{-6}$ см/сек), которое может быть обусловлено также ингибирированием PgР, но не за счет адгезии, как у АГ, а за счет изменения свойств клеточной мембранны после встраивания молекул ГК. Кроме того, и само изменение свойств клеточной мембранны может способствовать усилению проницаемости АТ.

ПЗК в комплексах с АГ и Na₂ГК показал лучшую абсорбцию через клеточный монослой, но более низкий P_{app} ($0,84 \pm 0,01 \times 10^{-6}$ см/сек и $0,82 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ см/сек, соответственно), чем чистый ПЗК ($1,09 \pm 0,01 \times 10^{-6}$ см/сек). Это обусловлено повышением его растворимости в воде и отсутствием вклада PgР. Аналогичный коэффициент проницаемости ПЗК из обоих комплексов обусловлен практически одинаковой его растворимостью в воде в этих случаях. При сравнении кривых абсорбции, можно увидеть несколько худшую динамику у комплекса с Na₂ГК, особенно выраженную во временных точках 15, 30 и 120 мин (Рисунок 70). Меньшие концентрации ПЗК в этих случаях, а в особенности в начальных точках, могут быть результатом более замедленного высвобождению ПЗК из мицелл ГК, чем из комплексов с АГ.

Рисунок 69 – Проницаемость АТ через монослой клеток Сaco-2. * $p \leq 0,05$ по сравнению с АТ:АГ в аналогичной точке, # $p \leq 0,05$ по сравнению с АТ в аналогичной точке.

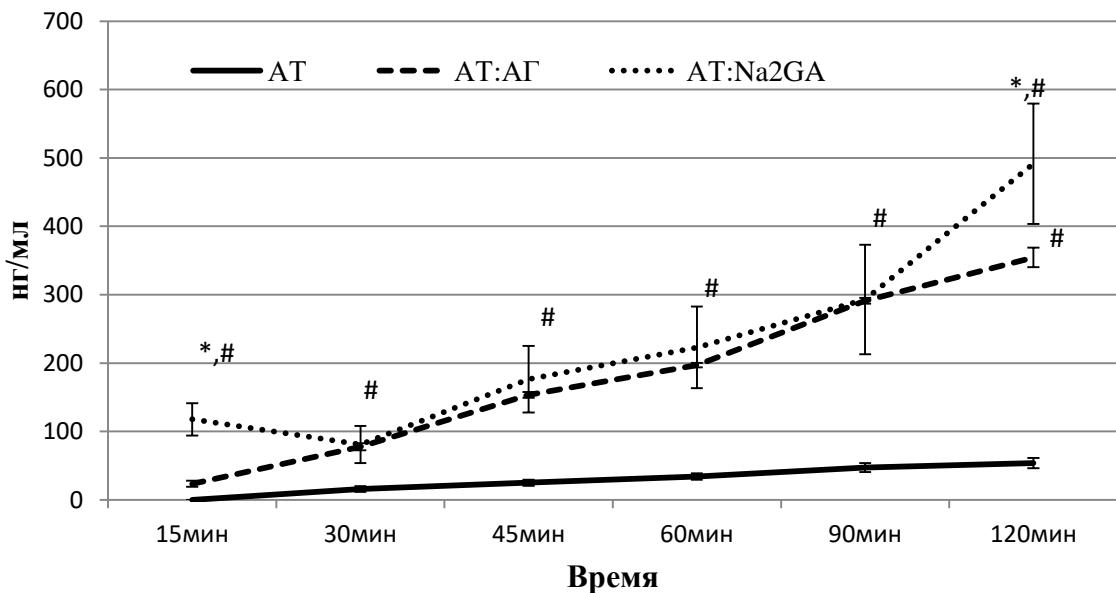
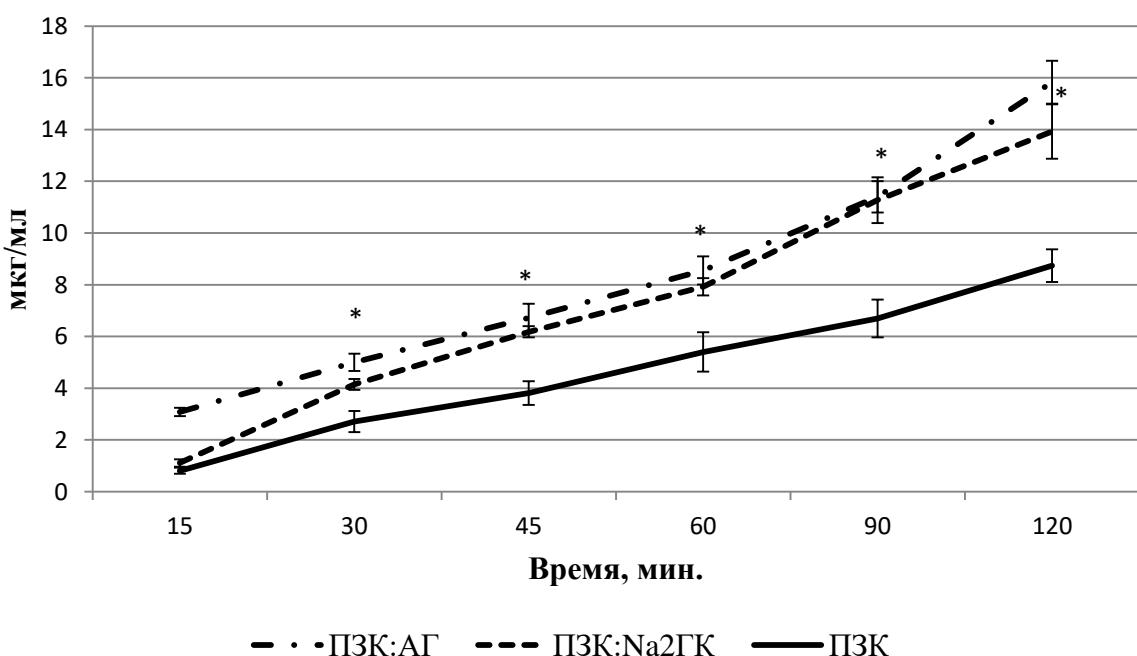


Рисунок 70 – Проницаемость ПЗК через монослой клеток Сaco-2. * $p \leq 0,05$ по сравнению с ПЗК в аналогичной точке.



Меньшие концентрации ПЗК в этих случаях, а в особенности в начальных точках, могут быть результатом более замедленного высвобождению ПЗК из мицелл ГК, чем из комплексов с АГ.

4.1.2. Исследование влияния АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ на проницаемость пуромицина в клетки линии STO-TG-puro с использованием МТТ-теста

МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток. В нашей работе он был использован для оценки жизнеспособности клеток линии STO-TG-puro, устойчивых к антибиотику пуромицину, после одновременной инкубации с АГ/ $\text{Na}_2\text{ГК}$ и пуромицином.

Пуромицин является антибиотиком пуринового ряда, продуцируемым бактериями *Streptomyces alboniger* и является ингибитором синтеза белков. В клеточной биологии применяется для селекции клеток, несущих Ras ген, обуславливающий резистентность к пуромицину. Пуромицин является субстратом для Pgp (Demeuse P. et al., 2004) и проникает в клетки пассивной диффузией (www.ncbi.nlm.nih.gov). Клетки STO-TG-puro являются иммортализованными фибробластами мыши с дополнительной резистентностью к оубанину и 6-тиогуанину и экспрессируют Pgp.

В результате проведенных исследований было установлено, что АГ усиливает цитотокическое действие пуромицина (таблица 29). Данный эффект, вероятнее всего, обусловлен увеличением внутриклеточной концентрации пуромицина за счет адгезии АГ к мемbrane клетки и ингибирования арабиногалактаном Pgp и последующим истощением механизма резистентности клетки. На сам механизм резистентности АГ влиянияказать не может, поскольку пуромицин деактивируется ферментом N-ацетил-трансферазой, который экспрессируется внутри клетки и кодируется Ras геном (MacDonald C. et al., 2015). $\text{Na}_2\text{ГК}$ в этом эксперименте проявил собственную цитотоксичность, вероятно связанную со своей способностью встраиваться в клеточные мембранны (Selyutina O. Y. et al., 2016), что влечет за собой изменение ее структуры и свойств.

Таблица 29 – Выживаемость клеток STO-TG-puro в % после инкубации с пуромицином, АГ и Na₂ГК.

	Нет АГ/ Na₂ГК	АГ 0,5%	АГ 2,5%	Na₂ГК 0,5%	Na₂ГК 2,5%
Нет антибиотика	100	100,61±12,07	64,54±12,15	88,31±23,85	58,89±3,58
Пуромицин 5 мкг/мл	55,07±7,81	29,99±12,84	26,63±0,69	26,72±0,1	27,89±5,72
Пуромицин 10 мкг/мл	38,32±4,55	18,76±1,26	25,61±5,12	23,82±3,15	29,01±3,03

Таким образом, полученные данные коррелируют с результатами на клетках Сaco-2 и доказывают наличие у АГ способности ингибировать Р-гликопротеин, что является дополнительным механизмом в увеличении биодоступности ЛС из его комплексов. Na₂ГК также обладает таким механизмом действия, только проявляется он, вероятно, за счет изменения структуры клеточной мембранны после встраивания молекул ГК, а не за счет адгезии, как у АГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доставка ЛС к своей мишени в живом организме всегда сопряжена с преодолением различных барьеров возникающих на этапах абсорбции и распределения. Процесс абсорбции из ЖКТ наиболее сложен и находится под влиянием как физико-химических свойств самого ЛС (растворимость в воде, стабильность и др.), так и различных факторов внутри ЖКТ организма-реципиента (ферменты, моторика, не перемешиваемый водный слой над кишечным эпителием, транс-мембранные белки переносчики, цитохром Р450 и др.). При этом пероральный способ доставки ЛС остается наиболее распространенным в мировой медицинской практике и является самым удобным для пациентов. Для преодоления барьеров на пути ЛС, в особенности плохой растворимости в воде, используют микронизацию ЛС, создание растворимых систем доставки на основе химических (ПЭГ, липосомы, нанотрубки и др.) и природных носителей (циклогексстрины, полисахариды и др.) (Parul J. et al., 2013). Такие способы солюбилизации, как правило, увеличивают биодоступность ЛС и, например, в случае полисахаридов, обеспечивают направленную доставку ЛС (Shantha L. et al., 2005). Однако, для получения таких форм доставки необходимо использование растворителей или высоких температур, что не всегда применимо. Кроме этого, не исключаются "побочные" химические превращения ЛС и вспомогательных веществ в технологических процессах с участием жидких фаз (расплавов). Более эффективной альтернативой является одностадийный механохимический синтез без использования растворителей даже в малых количествах. При этом способе возможно получать твердые дисперсии (супрамолекулярные комплексы) с нерастворимыми в воде или термически не стабильными веществами. В качестве носителей перспективно использование растительных метаболитов, как имеющих высокое сродство к живым организмам, так и большие, возобновляемые запасы в природе. Такими свойствами обладают широко известные полисахарид арабиногалактан и гликозид глицерризиновая

кислота. Оба этих вещества широко применяются в пищевой и фармацевтической отраслях промышленности, имеют разрешение FDA и российского фарм. комитета, однако ранее не применялись в качестве средств доставки ЛС.

Для того чтобы доказать возможность повышения биодоступности ЛС с использованием описанного выше подхода и АГ с $\text{Na}_2\text{ГК}$ в качестве носителей, было необходимо провести изучение их комплексов с ЛС различных фармакологических групп. Наиболее подходящими для этих целей являются представители 2 класса ЛС согласно биофармацевтической классификации, т.е. имеющие плохую растворимость в воде и хорошую проницаемость через липидный слой клеток. Нами были выбраны представители НПВС – ацетилсалициловая кислота, ибuproфен, напроксен; средств, влияющие на сердечно-сосудистую систему – симвастатин, аторвастатин, нифедипин, варфарин; противопаразитарных ЛС – альбендазол, празиквантел. Самая низкая биодоступность среди этих веществ у симвастатина (<5%), а самая высокая у варфарина (100%). С обоими носителями были изучены комплексы с АТ, СВ, ВФ, ПЗК, С НФ, АСК, НАП, ИБ, АЛБ были изучены только комплексы с АГ.

Растворимость в воде увеличилась у всех изучаемых ЛС в комплексах как с АГ, так и с $\text{Na}_2\text{ГК}$. У веществ с наименьшей растворимостью в воде – СИМ, АТ и ВФ, наилучший результат был получен для комплексов с $\text{Na}_2\text{ГК}$. Вероятно, это связано с большим аффинитетом молекул к гидрофобному внутреннему слою мицелл ГК, что делает менее выгодным выход молекул в водную среду. Также было показано, что просто смесь, без механохимической обработки ЛС и носителя не приводит к аналогичным результатам. Однако, нами было показано, что лучшая растворимость в воде не является достаточным фактором увеличения биодоступности СИМ, АТ и ВФ в комплексе с ГК по сравнению с аналогичными комплексами с АГ. В случае статинов было показано, что биодоступность как СИМ, так и АТ выше при использовании АГ в качестве носителя. Этому свидетельствуют увеличение их C_{\max} и AUC после однократного перорального введения мышам. Кроме этого, фармакодинамические свойства таких комплексов также выше. На модели экспериментальной гиперхолестеринемии комплексы АГ

с СИМ и АТ показали гипохолестеринемический эффект либо в два раза меньшей дозе чем СВ, либо тренд к более выраженнымами эффекту в случае с АТ. В экспериментах с ВФ было показано, что в комплексе с ГК его антикоагулянтное действие, сравнимое с чистым ВФ, сдвигается на 48 часов, тогда как в комплексе с АГ происходит лишь незначительное ухудшение его абсорбции и сохранение необходимой выраженности действия через 24 часа, как и у свободного ВФ. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что солюбилизация плохо растворимых веществ со 100% биодоступностью, к которым относится ВФ, приводит к снижению биодоступности.

В случае ПЗК, вещества с относительно лучшей растворимостью в воде, не было отмечено выраженной разницы в растворимости между комплексами с $\text{Na}_2\text{ГК}$ и АГ (0,7 и 0,9 г/л). Однако, были обнаружены различия в фармакокинетике этих комплексов и в концентрации в органе мишени – печени.

Наблюдаемые отличие кривых концентрация-время, вероятно, связаны с замедлением высвобождения молекул ПЗК из мицелл ГК, что также было отмечено для комплексов с СИМ, АТ и ВФ. При этом параметры C_{\max} и AUC у обоих комплексов значительно превосходят исходный ПЗК (для комплекса с ГК $AUC/C_{\max} = 855,1/20,5$; для комплекса с АГ $598,62/25,89$; ПЗК $271,5/8,6$).

При изучении комплексов НФ, АСК, НАП, ИБ, АЛБ с АГ было установлено повышение биодоступности всех ЛС и улучшение их фармакологического действия. В случае НПВС и НФ показана возможность снижения в 2 раза эффективной гипотензивной (НФ), антиагрегантной (АСК), анальгетической и противовоспалительной (АСК, НАП, ИБ) доз. В случае комплекса с АЛБ показано повышение эффективности его антиописторхозного действия. Кроме этого, для комплексов с АСК и ИБ показано снижение гастротоксического действия этих НПВС при 30-ти дневном пероральном введении по сравнению с исходными веществами.

Полученные данные и, в особенности, различия растворимости в воде и фармакокинетики СИМ и АТ свидетельствуют о наличии дополнительного механизма увеличения биодоступности ЛС из комплексов с АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$. К таким

механизмам, вероятно, относится непосредственное влияние носителей на мембрану клеток кишечного эпителия. Оно может заключаться в изменении свойств липидного бислоя, плотности межклеточных контактов или ингибировании транс-мембранных белков множественной лекарственной устойчивости, таких как Р-гликопротеины. В этой связи были проведены исследования АГ, $\text{Na}_2\text{ГК}$ и некоторых комплексов *in vitro* на монослое клеток Caco-2, который является эталонным для изучения абсорбции ЛС из ЖКТ. Было установлено, что $\text{Na}_2\text{ГК}$ и АГ разнонаправленно влияют на монослой клеток. ГК увеличивает проницаемость монослоя для ионов, что выражается в снижении TEER, а АГ наоборот снижает, что отражается увеличением TEER. В основе этого может лежать способность молекул ГК встраиваться в мембрану клеток и изменять ее структуру (Selyutina O. Y. et al., 2016), а полисахариды известны способностью к адгезии к эпителиальным клеткам (Luzardo M. C. et al., 2000; Moschini R. et al., 2014). Более выраженный эффект в обоих случаях достигался в концентрации 2,5%, что аналогично концентрации АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ в комплексах, вводимых животным *per os*. Из комплексов изученных *in vivo* для экспериментов на клетках были выбраны комплексы с АТ и ПЗК. Для АТ в литературе описано участие белков множественной лекарственной устойчивости (Pgp) в снижении его биодоступности, а для ПЗК такой информации нет. Было установлено, что в случае АТ:АГ проницаемость (P_{app}) клеток для АТ увеличивается в 2,2 раза, а в случае АТ: $\text{Na}_2\text{ГК}$ в 7,8 раза, что подтверждает ингибирующее влияние АГ и $\text{Na}_2\text{ГК}$ на Pgp. Однако, в случае $\text{Na}_2\text{ГК}$ вероятен существенный вклад изменений свойств самой клеточной мембранны под действием этого сапонина. В экспериментах с ПЗК увеличения P_{app} обнаружено не было, а наоборот отмечено его снижение у обоих комплексов, что отражает увеличение его растворимости в воде и отсутствие влияния белков множественной лекарственной устойчивости. Кроме этого, при совместной обработке клеток STO-TG-puro (устойчивы к пуромицину) арабиногалактаном и пуромицином, обнаружено усиление проницаемости этого антибиотика в клетки и увеличение цитотоксического действия. $\text{Na}_2\text{ГК}$ в этом эксперименте проявил собственную цитотоксичность.

Полученные данные показывают, что увеличение биодоступности ЛС из комплексов с АГ и Na₂ГК происходит не только из-за улучшения растворимости в воде, но и за счет ингибирования PgP.

Таким образом, проведенные исследования доказывают перспективность и эффективность использования одностадийного механохимического получения супрамолекулярных комплексов ЛС с АГ и Na₂ГК для повышения биодоступности, снижения терапевтических доз и не желательных побочных эффектов ЛС.

ВЫВОДЫ

1. При комплексообразовании с арабиногалактаном снижаются в два раза эффективная гипотензивная доза нифедипина; анальгетические и противовоспалительные дозы ацетилсалициловой кислоты, напроксена, ибuproфена; повышается противоописторхозный эффект альбендазола (минимум на 25%); наблюдается тенденция к увеличению гипохолестеринемической активности симвастатина и аторвастатина.

2. При комплексообразовании с арабиногалактаном повышается биодоступность нифедипина (в 5,2 раза в дозе 1,75 мг/кг), ибuproфена (в среднем в 1,4 раза), аторвастатина (в 1,3 раза), симвастатина (в 2 раза) и празиквантела (в 1,25 раза).

3. При комплексообразовании с арабиногалактаном уменьшается раздражающие действие ацетилсалициловой кислоты и ибuproфена на слизистую оболочку желудка при длительном (30 дней) пероральном введении крысам.

4. При комплексообразовании аторвастатина, симвастатина и празиквантела с динатриевой солью глицеризиновой кислоты происходит повышение их биодоступности (в 1,15, 1,6 и 2,76 раза, соответственно). Снижения эффективной дозы статинов не обнаружено.

5. Установлено, что абсорбция аторвастатина, симвастатина, празиквантела, варфарина из комплексов с динатриевой солью глицеризиновой кислоты происходит медленнее, чем из комплексов с арабиногалактаном.

6. При комплексообразовании варфарина с арабиногалактаном и с динатриевой солью глицеризиновой кислоты происходит уменьшение его биодоступности (в 4,2 раза в случае с АГ; проявление эффекта лишь через 54 часа после введения в случае с $\text{Na}_2\text{ГК}$).

7. В результате экспериментов *in vitro* было показано, что повышение биодоступности изученных ЛС из комплексов с арабиногалактаном и динатриевой солью глицеризиновой кислоты происходит не только за счет

увеличения их растворимости в воде, но и благодаря адгезии арабиногалактана к клеточной мембране энteroцитов и увеличения проницаемости мембранны при взаимодействии с динатриевой солью глицирризиновой кислоты.

8. Установлено, что арабиногалактан и динатриевая соль глицирризиновой кислоты (на примере комплексов аторвастатина и празиквантела) ингибируют Р-гликопротеины (трансмембранные белки переносчики) клеточной мембраны энteroцитов, что является дополнительным механизмом в увеличении биодоступности ЛС из их комплексов.

9. В результате проведенных исследований установлена перспективность и эффективность одностадийного механохимического комплексообразования плохо растворимых в воде лекарственных средств (2-й класс биофармацевтической классификации) с растительным метаболитом арабиногалактаном и динатриевой солью глицирризиновой кислоты с целью увеличения их биодоступности при пероральном введении.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AUC – area under curve (площадь под кривой)
- FDA – food and drug administration
- MRT – среднее время удерживания
- Na₂ГК – динатриевая соль глицирризиновой кислоты
- Pgp – P-гликопротеин
- TEER – трансэпителильная электрическое сопротивление
- T_{max} – время достижения максимальной концентрации
- АБЗ – альбендазол
- АГ – арабиногалактан
- АГ – арабиногалактан
- АЛГ – альгинаты
- АСК – ацетилсалициловая кислота
- АТ – аторвастатин
- БФК – биофармацевтическая классификация
- ВМ – время обработки в шаровой мельнице
- ВФ – варфарин
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГК – глицирризиновая кислота
- ГЛК – глюкуроновая кислота
- ДК – декстран
- ДСК – дифференциальная сканирующая колориметрия
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИБ – ибуuprofen
- ЛД₅₀ – среднесмертельная доза
- ЛС – лекарственно средство
- ЛФ – лекарственная форма
- НАП – напроксен

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

НФ – нифедипин

ПВ – протромбиновое время

ПЗК – празиквантел

ПУЛ – пуллулан

C_{max} – значение максимальной концентрации

САД – sistолическое артериальное давление

СИМ – симвастатин

$T_{1/2}$ – время полувыведения

ЦД – циклодекстрин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Августинович, Д. Ф. Экспериментальный описторхоз: исследование состава форменных элементов крови, гемопоэза и стартл-рефлекса у лабораторных животных / Д. Ф. Августинович, И. А. Орловская, Л. Б. Топоркова, Г. Б. Вишнивецкая, А. В. Катохин, М. Н. Львова, Е. В. Кашина, Н. П. Бондарь, Н. А. Феофанова, В. А. Мордвинов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20(2). – С. 155-164.
2. Антонова, Г. Ф. Водорастворимые вещества лиственницы и возможности их использования / Г. Ф. Антонова, Н. А. Тюкавкина // Химия древесины. – 1983. – Т. 2. – С. 89-96.
3. Бабкин, В. А. Медико-биологические свойства хлеба и мучных кондитерских изделий с арабиногалактаном лиственницы / В. А. Бабкин, Е. Н. Медведева, З. Г. Самбуева, В. Б. Хобракова, Н. А. Неверова, Б. О. Суюнчева, А. А. Таций // Химия растительного сырья. – 2012. – Т. 12. – С. 185-193.
4. Задионченко, В. С. Место Варфарина в лечении и профилактике тромбоэмболий / В. С. Задионченко, Г. Г. Шехян, А. М. Щикота, А. А. Ялымов // Регулярные выпуски «РМЖ». – 2011. – № 26. – С. 1648.
5. Здравоохранение в России. 2017: Стат.сб./Росстат. – М., 2017. – 170 с.
6. Медведева, Е. Н. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования (обзор) / Е. Н. Медведева, В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова // Химия растительного сырья. – 2003. – Т. 1. – С. 27-37.
7. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / А. Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
8. Оганов, Р. Г. Демографическая ситуация и сердечно-сосудистые заболевания в России: пути решения проблем / Р. Г. Оганов, Г. Я. Масленникова // Кардиоваск. тер. и проф. – 2007. – Т. 6, № 8. – С. 7-14.

9. Терпукова, А. Ф. О термических свойствах арабиногалактана / А. Ф. Терпукова, М. М. Чочиева, С. Л. Антоновский // Химия древесины. – 1978. – № 2. – С. 101-106.
10. Толстиков, Г. А. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине / Г. А. Толстиков, Л. А. Балтина, В. П. Гранкина. – Новосибирск: Гео, 2007. – 311 с.
11. Тринус, Ф. Н. Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ (методические рекомендации) / Ф. Н. Тринус, Н. А. Мохорт, Б. М. Клебанов. – Киев: Здоров'я, 1974. – С. 1-27.
12. Шаманаев, А. Ю. Противоотечный эффект композиции дигидрокверцетина и арабиногалактана в условиях модели хронической венозной недостаточности / А. Ю. Шаманаев, И. С. Иванов, А. В. Сидехменова, М. Б. Плотников // Бюллетень СО РАМН. – 2014. – Т. 34, № 5. – С. 22-26.
13. Achouri, D. Recent advances in ocular drug delivery / D. Achouri, K. Alhanout, P. Piccerelle, V. Andrieu // Drug Development and Industrial Pharmacy – 2013. – Vol. 39, № 11. – P. 1599-1617.
14. Adachi, H. Inhibitory effect of prostaglandin E1 on laurate-induced peripheral vascular occlusive sequelae in rabbits; optimized topical formulation with β -cyclodextrin derivative and penetration enhancer HPE-101 / H. Adachi, T. Irie, K. Uekama, T. Manako, T. Yano, M. Saita // J. Pharm. Pharmacol. – 1992. – Vol. 44. – P. 1033-1035.
15. Adachi, H. Combination effects of O-carboxymethyl-O-ethyl- β -cyclodextrin and penetration enhancer HPE-101 on transdermal delivery of prostaglandin-E(1) in hairless mice / H. Adachi, T. Irie, K. Uekama, T. Manako, T. Yano, M. Saita. // Eur. J. Pharm. Sci. – 1993. – Vol. 1. – P. 117-123.
16. Agueros, M. Cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery / M. Agueros, S. Espuelas, I. Esparza, P. Calleja, I. Pen~uelas, G. Ponchel, J. M. Irache // Expert Opin. Drug Deliv. – 2011. – Vol. 8(6). – P. 721-734.

17. Aken, H. V. Anticoagulation: The Present and Future / H. V. Aken, Ch. Bode, H. Darius // Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. – 2001. – Vol. 7(3). – P. 195-204.
18. Aline, P. The effect of mechanical grinding on the formation, crystalline changes and dissolution behaviour of the inclusion complex of telmisartan and β -cyclodextrins / P. Aline, A. Borba, M. Pinotti, G. Ricardo, S. Andrade, N. B. da Costa Jr., L. Renato, O. Junior, D. Fernandes, C. E. Maduro de Campos, H. K. Stulzer // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 133, № 20. – P. 373-383.
19. Al-Shamkhani, A. Radioiodination of alginate via covalently-bound tyrosinamide allows monitoring of its fate in vivo / A. Al-Shamkhani, R. Duncan // J. Bioact. Compat. Polym. – 1995. – Vol. 10. – P. 4-13.
20. Amidon, G. L. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability / G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, J. R. Crison // Pharm. Res. – 1995. – V. 12, № 3. – P. 413-420.
21. Amiji, M. M. Permeability and blood compatibility properties of chitosan–poly(ethylene oxide) blend membranes for haemodialysis / M. M. Amiji // Biomaterials. – 1995. – Vol. 16. – P. 593-599.
22. Amr, S. K. The effect of homogenised skin on the activity of lincosamide antibiotics / S. K. Amr, M. B. Brown, G. P. Martin, B. Forbes // Proceedings of the Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences A60. International Pharmaceutical Federation, San Francisco, USA. – 2000.
23. Arima, H. Recent advances in cyclodextrin delivery techniques / H. Arima, Y. Hayashia, T. Higashi, K. Motoyama // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2015. – Vol. 12, № 9. – P. 1425-1441.
24. Armignacco, O. Cryptic and asymptomatic *Opisthorchis felineus* infections / O. Armignacco, F. Ferri, M. A. Gomez-Morales, L. Caterini, E. Pozio // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2013. – Vol. 88(2). – P. 364-366.

25. Artursson, P. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions q of drug transport / P. Artursson, R. Palm, K. Luthman // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – Vol. 46. – P. 27-43.
26. Badawy, S. I. F. Bioavailability of danazolhydroxypropyl- β -cyclodextrin complex by different routes of administration / S. I. F. Badawy, M. M. Ghorab, C. M. Adeyeye // Int. J. Pharm. – 1996. – Vol. 145. – Vol. 137-143.
27. Baloglu, E. Bioadhesive Controlled Release Systems of Ornidazole for Vaginal Delivery / E. Baloglu, M. Özyazici, S. Y. Hizarcioğlu, T. Senyigit // Pharmaceutical Development and Technology. – 2006. – Vol. 11. – P. 477-484.
28. Behl, C. R. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery / C. R. Behl, H. K. Pimplaskar, A. P. Sileno, J. Demeireles, V. D. Romeo // Adv. Drug Del. Rev. – 1998. – Vol. 29. – P. 89-116.
29. Bellringer, M. E. β -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog / M. E. Bellringer, T. G. Smith, R. Read, C. Gopinath, P. Olivier // Food Chem. Toxicol. – 1995. – Vol. 33. – P. 367-376.
30. Benet, L. Z. The Role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in Drug Development / L. Z. Benet // J. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 102, № 1. – P. 34-42.
31. Bonnet, V. Cyclodextrin nanoassemblies: a promising tool for drug delivery / V. Bonnet, C. Gervaise, F. Djedaiñi-Pilard, A. Furlan, C. Sarazin // Drug Discovery Today. – 2015. – Vol. 20, № 9. – P. 1120-1126.
32. Boontheekul, T. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution / T. Boontheekul, H. J. Kong, D. J. Mooney // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – P. 2455-2465.
33. Braccini, I. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited / I. Braccini, S. P'erez // Biomacromolecules. – 2001. – Vol. 2, № 4. – P. 1089-1096.
34. Breemen, R. B. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption / R. B. Breemen, Y. Li // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. – 2005. – Vol. 1, № 2. – P. 175-185.

35. Brewster, M. E. Complexation – use of cyclodextrins to improve pharmaceutical properties of intramuscular formulations: in Injectable drug development. Techniques to reduce pain and irritation. / M. E. Brewster, T. Loftsson: Editors P. K. Gupta, G. A. Brazeau. – Denver: Interpharm Press, 1999. – P. 307-336.
36. Brown, G. A. Acute hormonal response to sublingual androstenediol in young men / G. A. Brown, E. R. Martin, B. S. Roberts, M. D. Vukovich, D. S. King // J. Appl. Physiol. – 2002. – Vol. 92. – P. 142-146.
37. Brown, M. B. The use of hyaluronan in topical drug delivery: in Hyaluronan: Biomedical, Medical and Clinical Aspects / M. B. Brown, B. Forbes, G. P. Martin: Editors J. Kennedy, G. O. Phillips, P. A. Williams, V. Hascall. – Cambridge: Woodhead Publishers, 2002. – P. 249-256.
38. Brown, M. B. The effects of a novel formulation of cyclosporine on antibody and cell-mediated immune reactions in the pleural cavity of rats: in Hyaluronan in Drug Delivery / M. B. Brown, A. Moore: Editor D. A. Willoughby. – London: Royal Society of Medicine Press, 1996. – P. 121-131.
39. Brown, M. B. The effect of hyaluronan on the in vitro deposition of diclofenac within the skin / M. B. Brown, C. Marriott, G. P. Martin // Int. J. Tissue Reactions – Exp. Clin. Aspects. – 1995. – Vol. 17. – P. 133-140.
40. Brown, M. B. Comparison of the effect of hyaluronan and other polysaccharides on drug skin partitioning / M. B. Brown, G. P. Martin // Int. J. Pharm. – 2001. – Vol. 225. – P. 113-121.
41. Bucolo, C. Pharmacological profile of a new topical pilocarpine formulation / C. Bucolo, P. Mangiafico // J. Ocul. Pharmacol. Ther. – 1999. – Vol. 15. – P. 567-573.
42. Bucolo, C. Pharmacological evaluation of a new timolol/pilocarpine formulation / C. Bucolo, A. Spadaro, S. Mangiafico // Ophthalmic Res. – 1998. – Vol. 30. – P. 101-106.
43. Burgalassi, S. Larch Arabinogalactan for Dry Eye Protection and Treatment of Corneal Lesions: Investigation in Rabbits / S. Burgalassi, N. Nicosia, D. Monti, G. Falcone, E. Boldrini, P. Chetoni // Journal of ocular pharmacology and therapeutics. – 2007. – Vol. 23, № 6. – P. 541-549.

44. Buttgereit, F. Gastrointestinal Toxic Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cyclooxygenase-2– Specific Inhibitors / F. Buttgereit, G. R. Burmester, L. S. Simon // Am. J. Med. – 2001. – Vol. 110(3A). – P. 13-19.
45. Cabral Marques, H. M. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. III. The pulmonary absorption of β -, DM- β - and HP- β -cyclodextrins in rabbits / H. M. Cabral Marques, J. Hadgraft, I. W. Kellaway, G. Taylor // Int. J. Pharm. – 1991. – Vol. 77. – P. 297-302.
46. Chandy, T. Chitosan – as a biomaterial / T. Chandy, C. P. Sharma // Artif. Cells Artif. Organs. – 1990. – Vol. 18. – P. 1-24.
47. Charlton, S. T. Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: In vitro characterisation studies / S. T. Charlton, S. S. Davis, L. Illum // Journal of Controlled Release. – 2007. – Vol. 118. – P. 225-234.
48. Chavanpatil, M. D. The influence of absorption enhancers on nasal absorption of acyclovir / M. D. Chavanpatil, P. R. Vavia // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2004. – Vol. 57. – P.483-487.
49. Chelladurai, S. Design and Evaluation of Bioadhesive in-Situ Nasal Gel of Ketorolac Tromethamine / S. Chelladurai, M. Mishra, B. Mishra // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2008. – Vol. 56. – P. 1596-1599.
50. Colvin Jr., H. W. Toxic Effects of Warfarin in Rats fed Different Diets / H. W. Colvin Jr., W. Lee Wang // Toxicology and applied pharmacology. – 1974. – Vol. 28. – P. 337-348.
51. Cometti, B. Pharmaceutical and clinical development of a novel progesterone formulation / B. Cometti // Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica Special Issue: Progesterone: the keystone of reproduction. – 2015. – Vol. 94, Issue Supp. S161. – P. 28-37.
52. Date, A. A. Novel delivery systems of atorvastatin should be evaluated for pharmacodynamics instead of pharmacokinetics / A. A. Date, M. S. Nagarsenker // JPP. – 2007. – Vol. 59. – P. 1583-1584.

53. Demarger-Andre, S. New properties of chitosan in lipid dispersions: in Chitin World. / S. Demarger-Andre, A. Domard: Editors Z. S. Karnicki, A. Wojtaso Pajak, M. M. Breziski, P. J. Bylowski. – Germany: Bremerhauser, 1994. – P. 153-158.
54. Demeuse, P. Puromycin selectively increases mdr1a expression in immortalized rat brain endothelial cell lines / P. Demeuse, P. Fragner, C. Leroy-Noury, C. Mercier, L. Payen, O. Fardel, P. -O. Couraud, F. Roux // Journal of Neurochemistry – 2004. – Vol. 88. – P. 23-31.
55. Dewland, P. M. Bioavailability of ibuprofen following oral administration of standard ibuprofen, sodium ibuprofen or ibuprofen acid incorporating poloxamer in healthy volunteers / P. M. Dewland, S. Reader, P. Berry // BMC Clinical Pharmacology. – 2009. – Vol. 9. – P. 19.
56. Dhirendra, K. Solid dispersions: a review / K. Dhirendra, S. Lewis, N. Udupa, K. Atin, J. Pak // Pharm Sci. – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 234-246.
57. Dietzel, K. The use of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a vehicle for intravenous administration of dexamethasone in dogs / K. Dietzel, K. S. Estes, M. E. Brewster, N. S. Bodor, H. Derendorf // Int. J. Pharm. – 1990. – Vol. 59. – P. 225-230.
58. DiMasi, J. A. The price of innovation: new estimates of drug development costs / J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski // J. Health Econ. – 2003. – Vol. 22. – P. 151-185.
59. Draget, R. I. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications / R. I. Draget, C. Taylor // Food Hydrocolloids. – 2011. – Vol. 25. – P. 251-256.
60. Duco T. Polysaccharides in wine: structures and roles / T. Duco, P. Williams, M. Moutounet, P. Pellerin // VigneVini. – 2000. – Vol. 27. – P. 36-40.
61. Dushkin, A. V. Complexes of polysaccharides and glycyrrhizic acid with drug molecules. Mechanochemical synthesis and pharmacological activity: in The complex world of polysaccharides / A. V. Dushkin, T. G. Tolstikova, M. V. Khvostov, G. A. Tolstikov: Editor D. N. Karunaratne. – Rijeka, Croatia: InTech, 2012. – P. 573-602.
62. Dushkin, A.V. Complexing of Pharmacons with Glycyrrhizic Acid as a Route to the Development of the Preparations with Enhanced Efficiency / A.V. Dushkin, E. S.

Meteleva, T. G. Tolstikova, M. V. Khvostov, M. P. Dolgikh, G. A. Tolstikov // Chemistry for sustainable development. – 2010. – V.18, №4 – P. 437-444.

63. Eason, T. Ch. Vertebrate Pesticide Toxicology Manual (Poisons): information on poisons used in New Zealand as vertebrate pesticides / T. Ch. Eason, M. Wickstrom. – Wellington, New Zealand: Department of Conservation, 2001. – 122 P.

64. Eikelboom, J. Bleeding with Direct Oral Anticoagulants vs Warfarin: Clinical Experience / J. Eikelboom, J. Merli // The American Journal of Medicine. – 2016. – Vol. 129 (11). – P. S33-S40.

65. El-Lakkany, N. Bioavailability and in vivo efficacy of a praziquantel-polyvinylpyrrolidone solid dispersion in *Schistosoma mansoni*-infected mice / N. El-Lakkany, S. H. Seif el-Din, L. Heikal // Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. – 2012. – Vol. 37. – P. 289-299.

66. Emara, L. H. Improving the Dissolution and Bioavailability of Nifedipine Using Solid Dispersions and Solubilizers / L. H. Emara, R. M. Badr, A. Abd Elbary // Drug development and industrial pharmacy. – 2002. – Vol. 28, N 7. – P. 795-807.

67. Endress, H. U. Pectins: in Phillips GO. Handbook of Hydrocolloids. 2nd edition / H. U. Endress, S. H. Christensen: Editor P. A. Williams. – Cambridge: Woodhead Publishers Ltd., 2009. – P. 274-297.

68. Evaluation of certain food additives and contaminants: WHO Technical Report Series № 909, 2002. – P. 41-42.

69. Fangueiro, J. F. Ocular Drug Delivery - New Strategies for targeting anterior and posterior segments of the eye / J. F. Fangueiro, F. Veiga, A. M. Silva, E. B. Souto // Curr. Pharm. Des. – 2016. – Vol. 22, № 9. – P. 1135-1146.

70. Feeney, M. Hydrogels of Dextran Containing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs as Pendant Agents / M. Feeney, M. Giannuzzo, P. Paolicelli, M. A. Casadei // Drug Delivery. – 2007. – Vol. 14, № 2. – P. 87- 93.

71. Felton, L. A. Influence of cyclodextrin complexation on the in vivo photoprotective effects of oxybenzone / L. A. Felton, C. J. Wiley, D. A. Godwin // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2004. – Vol. 30. – P. 95-102.

72. Felton, L. A. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on transdermal permeation and skin accumulation of oxybenzone / L. A. Felton, C. J. Wiley, D. A. Godwin // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2002. – Vol. 28. – P. 1117-1124.
73. Friðriksdóttir, H. Design and in vivo testing of 17 β -estradiol-HP β CD sublinqual tablets / H. Friðriksdóttir, T. Loftsson, J. A. Guðmundsson, G. J. Bjarnason, M. Kjeld, T. Thorstensson // Pharmazie. – 1996. – Vol. 51. – P. 39-42.
74. Frömming, K.-H. Cyclodextrins in Pharmacy / K.-H. Frömming, J. Szejtli. – Netherlands: Springer, 1994. – 225 P.
75. Fu, Z. D. Atorvastatin induces bile acid-synthetic enzyme Cyp7a1 by suppressing FXR signaling in both liver and intestine in mice / Z. D. Fu, J. Y. Cui, C. D. Klaassen // J. Lipid Res. – 2014. – Vol. 55(12). – P. 2576-2586.
76. Fukuda, H. Polyelectrolyte complexes of chitosancarboxymethyl cellulose / H. Fukuda // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1980. – Vol. 53. – P. 837-840.
77. Fundueanu, G. Pullulan-cyclodextrin microspheres. A chromatographic approach for the evaluation of the drug–cyclodextrin interactions and the determination of the drug release profiles / G. Fundueanu, M. Constantin, D. Mihai, F. Bortolotti, R. Cortesi, P. Ascenzi // Journal of Chromatography B. – 2003. – Vol. 791. – P. 407-419.
78. Gandolfi, S. A. Low-molecular-weight sodium hyaluronate in the treatment of bacterial corneal ulcers / S. A. Gandolfi, A. Massari, J. G. Orsoni // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 1992. – Vol. 230. – P. 20-23.
79. Garganeeva, A. A. Dihydropyridine calcium antagonists. Position of nifedipine in modern cardiology practice / A. A. Garganeeva // Rational Pharmacother. Card. – 2011. – Vol. 7(3). –P. 356-364.
80. Gaucher, G. Polymeric micelles for oral drug delivery / G. Gaucher, P. Satturwar, M.-Ch. Jones, A. Furtos, J.-Ch. Leroux // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2010. – Vol. 76. – P. 147-158.
81. González, R. C. B. In vitro investigation on the impact of the surface-active excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the metabolism of midazolam / R. C. B. González, J. Huwyler, F. Boess, I. Walter, B. Bittner // Biopharm. Drug. Dispos. – 2004. – Vol. 25. – P. 37-49.

82. Gordon M. Natural products: a continuing source of novel drug leads / M. Gordon, G. M. Cragg, D. J. Newman // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, № 6. – P. 3670-3695.
83. Graebin, C. S. The Pharmacological Activities of Glycyrrhizinic Acid (“Glycyrrhizin”) and Glycyrrhetic Acid: in Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry / C. S. Graebin: Editors J. M. Merillon, K. Ramawat. – Cham.: Springer, 2018.
84. Groman, E. V. Arabinogalactan for Hepatic Drug Delivery / E. V. Groman, P. M. Enriquez, C. Jung, L. Josephson // *Bioconjugate Chem.* – 1994. – Vol. 5, № 6. – P. 547-556.
85. Gurny, R. Design and evaluation of controlled release systems for the eye / R. Gurny, H. Ibrahim, A. Aebi, P. Buri, C. G. Wilson, N. Washington, P. Edman, O. Camber // *J. Control. Rel.* – 1987. – Vol. 6. – P. 367-373.
86. Harris, D. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity / D. Harris, J. R. Robinson // *J. Pharm. Sci.* – 1992. – Vol. 82. – P. 1-10.
87. Hawkey, C. J. Aspirininduced gastric mucosal damage: prevention by enteric-coating and relation to prostaglandin synthesis / C. J. Hawkey // *Br. J. Clin. Pharmac.* – 1991. – Vol. 32. – P. 77-83.
88. Hawthrone, A. B. Aspirin induced gastric mucosal damage: prevention by enteric-coating and relation to prostaglandin synthesis / A. B. Hawthrone, Y. R. Mahida, A. T. Cole, C. J. Hawkey // *Br. J. Clin. Pharmac.* – 1991. – Vol. 32. – P. 77-83.
89. Hedges, A. R. Industrial applications of cyclodextrins / A. R. Hedges // *Chem. Rev.* – 1998. – Vol. 98. – P. 2035-2044.
90. Hermens, W. A. Nasal absorption enhancement of 17β -estradiol by dimethyl- β -cyclodextrin in rabbits and rats / W. A. Hermens, M. J. Deurloo, S.G. Romeijn, J. C. Verhoef, F. W. Mercus // *Pharm. Res.* – 1990. – Vol. 7. – P. 500-503.
91. Herrero-Vanrell, R. Enhancement of the mydriatic response to tropicamide by bioadhesive polymers / R. Herrero-Vanrell, A. Fernandez-Carballido, G. Frutos, R. Cadorniga // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* – 2000. – Vol. 16. – P. 419-428.

92. Hirayama, F. Methods of investigating and preparing inclusion compounds: in Cyclodextrins and their industrial uses / F. Hirayama, K. Uekama: Editor D. Duchene. – Paris.: Editions de Sante, 1987. – P. 131-172.
93. Hirsh, J. Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range / J. Hirsh, J. E. Dalen, D. R. Anderson, L. Poller, H. Bussey, J. Ansell, D. Deykin // Chest. – 2001. – Vol. 119. – P. 8S-21S.
94. Hoon, T. J. Bioequivalence of 17 β -Estradiol Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex in Postmenopausal Women / T. J. Hoon, M. Y. Dawood, F. S. Khan-Dawood, J. Ramos, R. L. Batenhorst // J. Clin. Pharmacol. – 1993. – Vol. 33. – P. 1116-1121.
95. Hubatsch, I. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers / I. Hubatsch, E. G. Ragnarsson, P. Artursson // Nat. Protoc. – 2007. – Vol. 2, № 9. – P. 2111-2119.
96. Irie, T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation / T. Irie, K. Uekama // J Pharm Sci. – 1997. – Vol. 86, № 2. – P. 147-162.
97. Irie, T. Enhancing effects of cyclodextrins on nasal absorption of insulin in rats / T. Irie, K. Wakamatsu, H. Arima, H. Aritomi, K. Uekama // Int. J. Pharm. – 1992. – Vol. 84. – P. 129-139.
98. Jansook, P. Cyclodextrin-poloxamer aggregates as nanocarriers in eye drop formulations: dexamethasone and amphotericin / P. Jansook, W. Pichayakorn, C. Muankaew, T. Loftsson // B. Drug Dev. Ind. Pharm. – 2016. – Vol. 42, № 9. – P. 1446-1454.
99. Järvinen, T. Novel methylated cyclodextrin complexes. International patent publication / T. Järvinen, A. J. Mannila, P. Jarho // International Patent Application No. WO 03/070774 A1. – 2003.
100. Kaneo, Y. Pharmacokinetics and biodisposition of fluorescein-labeled arabinogalactan in rats / Y. Kaneo, T. Ueno, T. Tanaka, H. Iwase, Y. Yamaguchi, T. Uemura // International Journal of Pharmaceutics. – 2000. – Vol. 201, № 1. – P. 59-69.

101. Kas, H. S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems / H. S. Kas // J. Microencapsul. – 1997. – Vol. 14. – P. 689-711.
102. Kato, Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field / Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2003. – Vol. 4. – P. 303-309.
103. Katzung, B. G. Basic and Clinical Pharmacology 13 Edition / B. G. Katzung, A. J. Trevor. – USA: McGraw-Hill Education, 2015. – 1203 P.
104. Kawabata, Y. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications / Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, Sh. Yamada, S. Onoue // International Journal of Pharmaceutics. – 2011. – Vol. 420. – P. 1-10.
105. Kawakami, K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs II. In vivo study / K. Kawakami, T. Yoshikawa, T. Hayashib, Y. Nishihara, K. Masuda // J. Control. Release. – 2002. – Vol. 81. – P. 65-74.
106. Kelly, G. S. Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide / G. S. Kelly // Altern. Med. Rev. – 1999. – Vol. 4, № 2. – P. 96-103.
107. Kim, R. B. Drugs as P-Glycoprotein Substrates, Inhibitors, and Inducers / R. B. Kim // Drug Metabolism reviews. – 2002. – Vol. 34(1&2). – P. 47-54.
108. Kong, R. Atorvastatin calcium inclusion complexation with polysaccharide arabinogalactan and saponin disodium glycyrrhizate for increasing of solubility and bioavailability / R. Kong, X. Zhu, E. S. Meteleva, N. E. Polyakov, M. V. Khvostov, D. S. Baev, T. G. Tolstikova, A. V. Dushkin, W. Su // Drug Delivery and Translational Research. – 2018. – Vol. 8, № 5. – P. 1200-1213.
109. Kosaraju, S. L. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery / S. L. Kosaraju // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2005. – Vol. 45. – P. 251-258.

110. Koyama, Y. Receptor-mediated absorption of high molecular weight dextrans from intestinal tract / Y. Koyama, T. Miyagawa, A. Kawaide, K. Kataoka // J. Control. Rel. – 1996. – Vol. 41. – P. 171-176.
111. Kozjek, F. The bioavailability of oral nifedipine formulations: a statistical and simulation approach / F. Kozjek, S. Primozic, A. Mrhar, R. Karba, K. D. Raemsch, A. Janezic // Biopharmaceutics & drug disposition. – 1987. – Vol. 8. – P. 23-35.
112. Krishnamoorthy, R. Complexation of weak acids and bases with cyclodextrins: effects of substrate ionization on the estimation and interpretation of association constants / R. Krishnamoorthy, A. K. Mitra // Int. J. Pharm. Advances. – 1996. – Vol. 1. – P. 330-343.
113. Kublik, H. Nasal absorption of 17β -estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep / H. Kublik, T. K. Bock, H. Schreier, B. W. Müller // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 1996. – Vol. 42. – P. 320-324.
114. Lakkakula, J. R. A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications / J. R. Lakkakula, R. W. Maçedo Krause // Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. 877-894.
115. Laurent, T.C., Fraser, J.R.E. Hyaluronan / T.C. Laurent, J.R.E. Fraser // FASEB J. – 1992. – Vol. 6. – P. 2397-2404.
116. Lee, K. Y. Alginate: Properties and biomedical applications / K. Y. Lee, D. J. Mooney // Progress in Polymer Science. – 2012. – Vol. 37. – P. 106-126.
117. Leite Pinto, J. M. Beclomethasone/cyclodextrin inclusion complex for dry powder inhalation / J. M. Leite Pinto, H. M. Cabral Marques // S.T.P. Pharma Sci. – 1999. – Vol. 9. – P. 253-256.
118. Lennernas, H. Clinical Pharmacokinetics of Atorvastatin / H. Lennernas // Clin. Pharmacokinet. – 2003. – Vol. 42 (13). – P. 1141-1160.
119. Leuner, C. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions / C. Leuner, J. Dressman // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2000. – Vol. 50, № 1. – P. 47-60.
120. Li, P. Combined effect of complexation and pH on solubilization / P. Li, S. E. Tabibi, S. H. Yalkowsky // J. Pharm. Sci. – 1998. – Vol. 87, № 12. – P. 1535-1547.

121. Liao, Y.-H. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery / Y.-H. Liao, S. A. Jones, B. Forbes, G. P. Martin, M. B. Brown // Drug Delivery. – 2005. – Vol. 12. – P. 327-342.
122. Lim, S. T. In vivo evaluation of novel hyaluronan/chitosan microparticulate delivery systems for the nasal delivery of gentamicin in rabbits / S. T. Lim, B. Forbes, D. J. Berry, G. P. Martin, M. B. Brown // Int. J. Pharm. – 2002. – Vol. 231. – P. 73-82.
123. Lipinski, C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2001. – Vol. 46, № 1-3. – P. 3-26.
124. Liu, L. S. Pectin in controlled drug delivery – a review / L. S. Liu, M. L. Fishman, K. B. Hicks // Cellulose. – 2007. – Vol. 14. – P. 15-24.
125. Liu, L. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins / L. Liu, Q-X. Guo // Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry. – 2002. – Vol. 42, № 1. – P. 1-14.
126. Liu, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems / Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang // Adv. Drug Deliv. – 2008. – Vol. 60, № 15. – P. 1650-1662.
127. Loftsson, T. The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs / T. Loftsson, M. Masson // J. Drug Del. Sci. Tach. – 2004. – Vol. 14. – P. 35-43.
128. Loftsson, T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development / T. Loftsson, M. E. Brewster // J. Pharm. Pharmacol. – 2010. – Vol. 62, № 11. – P. 1607-1621.
129. Loftsson, T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization / T. Loftsson, M. E. Brewster // J. Pharm. Sci. – 1996. – Vol. 85, № 10. – P. 1017-1025.
130. Loftsson, T., Brewster, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency // J. Pharm. Sci. – 2012. – Vol. 101, № 9. – P. 3019-3032.

131. Loftsson, T. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: properties and usage in pharmaceutical formulations / T. Loftsson, M. E. Brewster, H. Derendorf, N. Bodor // Pharm. Ztg. Wiss. – 1991. – Vol. 136. – P. 5-10.
132. Loftsson, T. Topically effective ocular hypotensive acetazolamide and ethoxyzolamide formulations in rabbits / T. Loftsson, H. Fridriksdottir, E. Stefansson, S. Thórisdóttir, O. Guthmundsson, T. Sigthórsson // J. Pharm. Pharmacol. – 1994. – Vol. 46. – P. 503-504.
133. Loftsson, T. Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray / T. Loftsson, H. Gudmundsdottir, J. F. Sigurjonsdottir, H. H. Sigurdsson, S. D. Sigfusson, M. Másson, E. Stefánsson // Int. J. Pharm. – 2001a. – Vol. 212. – P. 29-40.
134. Loftsson, T. Cyclodextrins in drug delivery / T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 335-351.
135. Loftsson, T. Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery / T. Loftsson, T. Järvinen // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1999a. – Vol. 36. – P. 59-79.
136. Loftsson, T. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice / T. Loftsson, M. Masson // Int. J. Pharm. – 20016. – Vol. 225. – P. 15-30.
137. Loftsson, T. Cyclodextrins as co-enhancers in dermal and transdermal drug delivery / T. Loftsson, M. Masson, H. H. Sigurdsson, P. Magnusson, F. L. Goffic // Pharmazie. – 1998. – Vol. 53. – P. 137-139.
138. Loftsson, T. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins / T. Loftsson, M. Masson, J. F. Sigurjonsdottir // S.T.P. Pharma Sci. – 19996. Vol. 9. – P. 237-242.
139. Loftsson, T. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs / T. Loftsson, K. Matthíasson, M. Másson // Int. J. Pharm. – 2003a. – Vol. 262, № 1-2. – P. 101-107.
140. Loftsson, T. The effects of cyclodextrins on topical delivery of hydrocortisone: the aqueous diffusion layer / T. Loftsson, S. D. Sigfusson, H. H. Sigurasson, M. Masson // S.T.P. Pharma Sci. – 20036. – Vol. 13. – P. 125-131.

141. Loftsson, T. Preparation of solid drug/cyclodextrin complexes of acidic and basic drugs / T. Loftsson, H. H. Sigurdsson, M. Másson, N. Schipper // Pharmazie. – 20046. – Vol. 59, № 1. – P. 25-39.
142. Loftsson, T. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye / T. Loftsson, E. Stefánsson // Acta Ophthalmol. Scand. – 2002. – Vol. 80. – P. 144-150.
143. Loftsson, T. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes / T. Loftsson, S. B. Vogensen, M. E. Brewster, F. K. Dottir // J. Pharm. Sci. – 2007. – Vol. 96. – P. 2532-2546.
144. Lu, R. Enhanced bioavailability of raloxifene hydrochloride via dry suspensions prepared from drug/HP- β -cyclodextrin inclusion complexes / R. Lu, S. Liu, Q. Wang, X. Li // Pharmazie. – 2015. – Vol. 70, № 12. – P. 791-797.
145. Lullmann, H. Color Atlas of Pharmacology 2nd Edition / H. Lullmann, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger. – Thieme, 2000. – 386 P.
146. Luzardo, M. C. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers / M. C. Luzardo, F. Amalfa, A. M. Nuñez, S. Díaz, A. C. Biondi De Lopez, E. A. Disalvo // Biophys. J. – 2000. – Vol. 78. – P. 2452-2458.
147. MacDonald, C. Puromycin- and methotrexate-resistance cassettes and optimized Cre-recombinase expression plasmids for use in yeast / C. MacDonald, R. C. Piper // Yeast. – 2015. – Vol. 32. – P. 423-438.
148. Marsico, F. NSAIDs and cardiovascular risk / F. Marsico, S. Paolillo, P. P. Filardi // J. Cardiovasc. Med. – 2017. – V.18 (1). – P. 40-43.
149. Marttin, E. Nasal absorption of dihydroergotamine from liquid and powder formulations in rabbits / E. Marttin, S. G. Romeijn, J. C. Verhoef, F. W. Merkus // J. Pharm. Sci. – 1997. – Vol. 86. – P. 802-807.
150. Marttin, E. Efficacy, safety and mechanism of cyclodextrins as absorption enhancers in nasal delivery of peptide and protein drugs / E. Marttin, J. C. Verhoef, F. W. Merkus // J. Drug Target. – 1998. – Vol. 6, № 1. – P. 17-36.
151. Masood, F. Haracterization and application of roxithromycin loaded cyclodextrin based nanoparticles for treatment of multidrug resistant bacteria / F.

Masood, T. Yasin, H. Bukhari, M. Mujahid // Mater Sci. Eng. C Mater Biol. Appl. – 2016. – Vol. 61. – P. 1-7.

152. Matsubara, K. Improvement of nasal bioavailability of lutenizing hormone releasing hormone agonist buserelin by cyclodextrin complexation in rats / K. Matsubara, K. Abe, T. Irie, K. Uekama // J. Pharm. Sci. – 1995. – Vol. 84. – P. 1295-1300.

153. Matsuda, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery / H. Matsuda, H. Arima // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1999. – Vol. 36. – P. 81-99.

154. Mauro, V. F. Clinical Pharmacokinetics and Practical Applications of Simvastatin / V. F. Mauro // Clin. Pharmacokinet. – 1993. – Vol. 24. – P. 195-202.

155. McEwan, L. E. Topical diclofenac/hyaluronan gel in the treatment of solar keratosis / L. E. McEwan, J. G. Smith // Aust. J. Derm. – 1997. – Vol. 38. – P. 187-189.

156. McGettigan, P. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries / P. McGettigan, D. Henry // PLoS Med. – 2013. – Vol. 10, № 2. – P. e1001388.

157. McKenne, J. M. Pharmacologic Characteristics of Statins / J. M. McKenne // Clin. Cardiol. – 2003. – Vol. 26 (Suppl. III). – P. III-32-III-38.

158. Mehansho H. Arabinogalactan fiber composition containing milk or soy proteins / H. Mehansho, R. V. Nunes, A. L. Durr, R. I. Mellican, S. E. Manchuso // PCT Int. Appl. WO 2002026054 A2. 2002. / CA – 2002. – V. 136. 262300.

159. Mehvar, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents / R. Mehvar // Journal of Controlled Release. – 2000. – Vol. 69. – P. 1-25.

160. Mehvar, R. Molecular weight-dependent pharmacokinetics of fluorescein-labeled dextrans in rats / R. Mehvar, T. L. Shepard // J. Pharm. Sci. – 1992. – Vol. 81. – P. 908-912.

161. Mendes, C. Investigation of β -cyclodextrin-norfloxacin inclusion complexes. Part 1. Preparation, physicochemical and microbiological characterization / C. Mendes, B. P. Wiemes, A. Buttchevitz, A. P. Christ, K. G. Ribas, A. I. Adams, M. A.

Silva, P. R. Oliveira // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2015. – V. 13, № 1. – P. 119-129.

162. Merkus, F. W. Cyclodextrin in nasal drug delivery / F. W. Merkus, J. C. Verhoef, E. Marttin, S. G. Romeijn, P. H. van der Kuy, W. A. Hermens, N. G. Schipper // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1999. – Vol. 36. – P. 41-57.
163. Merkus, F. W. Absorption enhancing effect of cyclodextrins in itranasally administered insulin in rats / F. W. Merkus, J. Verhoef, S. G. Romeijn, N. G. Schipper // Pharm. Res. – 1991. – Vol. 8. – P. 588-592.
164. Meteleva, E. S. Physicochemical Properties and Anti-Opisthorchosis Effect of Mechanochemically Synthesized Solid Compositions of Praziquantel with Glycyrrhizic Acid Disodium Salt / E. S. Meteleva, Yu. S. Chistyachenko, L. P. Suntsova, M. A. Tsyganov, G. B. Vishnivetskaya, D. F. Avgustinovich, M. V. Khvostov, N. E. Polyakov, T. G. Tolstikova, V. A. Mordvinov, A. V. Dushkin, N. Z. Lyakhov // Doklady Biochemistry and Biophysics – 2018. – Vol. 481, № 1. – P. 228-231.
165. Meyer, K. The polysaccharide of the vitreous humor / K. Meyer, J.W. Palmer // J. Biol. Chem. – 1934. – Vol. 107. – P. 629-634.
166. Moreira, C. A. Sodium hyaluronate as a carrier for intravitreal gentamicin—an experimental-study / C. A. Moreira, D. K. Armstrong, R. W. Jelliffe, A. T. Moreira, C. C. Woodford, P. E. Liggett, M. D. Trousdale // Acta Ophthalmol. (Copenh). – 1991a. – Vol. 69. – P. 45-49.
167. Moreira, C. A. In vitro and in vivo studies with sodium hyaluronate as a carrier for intraocular gentamicin / C. A. Moreira, D. K. Armstrong, R. W. Jelliffe, A. T. Moreira, C. C. Woodford, P. E. Liggett, M. D. Trousdale // Acta Ophthalmol. (Copenh). – 1991б. – Vol. 69. – P. 50-56.
168. Morimoto, K. Effects of low-viscosity sodium hyaluronate preparation on the pulmonary absorption of rh-insulin in rats / K. Morimoto, K. Metsugi, H. Katsumata, K. Iwanaga, M. Kakemi // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2001. – Vol. 27. – P. 365-371.
169. Morozova, E. A. Analgesic properties of new pyrrolidinomorphinan derivatives: Revealing potential pathways / E. A. Morozova, T. G. Tolstikova, A.V.

Bolkunov, M. P. Dolgikh, E. E. Shults // Natural Product Communication. – 2008. – Vol. 3(10). – P. 1621-1624.

170. Morris, G. A. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan / G. A. Morris, M. S. Kök, S. E. Harding, G. G. Adams // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. – 2010. – Vol. 27. – P. 257-284.

171. Moschini, R. Interaction of arabinogalactan with mucins / R. Moschini, F. Gini, M. Cappiello, F. Balestri, G. Falcone, E. Boldrini, U. Mura, A. Del-Corso // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. – Vol. 67. – P. 446-451.

172. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / Mosmann T. // J. Immunol. Methods. – 1983. – Vol. 65, № 1-2. – P. 55-63.

173. Nagabandi, V. Enhancement of Dissolution Rate of Naproxen by Lipid Based Solid Dispersions / V. Nagabandi, A. K. Chandragiri, S. Thota, P. Katakam // J. Pharm. Sci. & Res. – 2014. – Vol. 6(2). – P. 78-82.

174. Nazir, T. Dermal delivery of cyclosporine A entrapped liposomal gels – preformulation. Franz cell diffusion studies using silastic membranes / T. Nazir, G. P. Martin, M. B. Brown // Pharm. Sci. 3(suppl.). – 2001. – P. 1429.

175. Oakenfull, D. G. The chemistry of high-methoxyl pectins: in The Chemistry and Technology of Pectin / D. G. Oakenfull: Editor R. H. Walter. – New York: Academic Press, 1991. – P. 87-108.

176. Odonmazig, P. Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dahurica* L.) / P. Odonmazig, A. Ebringerova, E. Machova, J. Alfoldi // Carbohydr. Res. – 1994. – Vol. 252. – P. 317-324.

177. Onsoyen, E. Metal recovery using chitosan / E. Onsoyen, O. Skaugrud // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 1990. – Vol. 49. – P. 395-404.

178. Pade, V. Link between Drug Absorption Solubility and Permeability Measurements in Caco-2 Cells / V. Pade, S. Stavchansky // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1998. – Vol. 87, № 12. – P. 1604-1607.

179. Pakharukova, M. Y. The first comprehensive study of praziquantel effects in vivo and in vitro on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda) / M. Y. Pakharukova, A. G. Shilov, D. S. Pirozhkova, A. V. Katokhin, V. A. Mordvinov // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2015. – Vol. 46(1). – P. 94-100.
180. Parul, J. Bioavailability enhancement of poorly soluble drugs by SMEDDS: a review / J. Parul, A. Geeta, H. SL, K. Amanpreet // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. – 2013. – Vol. 3(1). – P. 98-109.
181. Patel, A. R. Preparation and in vivo evaluation of SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) containing fenofibrate / A. R. Patel, P. R. Vavia // AAPS J. – 2007. – Vol. 9. – P. 344-352.
182. Pinto-Almeida, A. The Role of Efflux Pumps in *Schistosoma mansoni* Praziquantel Resistant Phenotype / A. Pinto-Almeida, T. Mendes, A. Armada, S. Belo, E. Carrilho, M. Viveiros, A. Afonso // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10(10). – P. e0140147.
183. Pouton, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system / C. W. Pouton // European journal of pharmaceutical sciences. – 2006. – Vol. 29. – P. 278-287.
184. Prajapati, V. D. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications / V. D. Prajapati, J. K. Jani, S. M. Khanda // Carbohydrate Polymers. – 2013. – Vol. 95. – P. 540-549.
185. Prime, D. Review of dry powder inhalers / D. Prime, P. J. Atkins, A. Slater, B. Sumby // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1997. – Vol. 26. – P. 51-58.
186. Raemdonck, K. Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations / K. Raemdonck, T. F. Martens, K. Braeckmans, J. Demeester, S. C. De Smedt // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2013. – Vol. 65. – P. 1123-1147.
187. Rajewski, R. A. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery / R. A. Rajewski, V. J. Stella // J. Pharm. Sci. – 1996. – Vol. 85. – P. 1142-1168.

188. Rashid, T. J. Factors affecting the absolute bioavailability of nifedipine / T. J. Rashid, U. Martin, H. Clarke, D. G. Waller, A. G. Renwick, C. F. George // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1995. – Vol. 40. – P. 51-58.
189. Redenti, E. Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs. Thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications / E. Redenti, L. Szente, J. Szejtli // J. Pharm Sci. – 2001. – Vol. 90, № 8. – P. 979-986.
190. Redenti, E. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications / E. Redenti, L. Szente, J. Szejtli // J. Pharm Sci. – 2000. – Vol. 89, № 1. – P. 1-8.
191. Rigter, I. M. Relative Bioavailability of Three Newly Developed Albendazole Formulations: a Randomized Crossover Study with Healthy Volunteers / I. M. Rigter, H. G. Schipper, R. P. Koopmans, H. J. M. van Kan, H. W. Frijlink, P. A. Kager, H.-J. Guchelaar // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48(3). – P. 1051-1054.
192. Rinaudo, M. Polyelectrolytes derived from natural polysaccharides: in Monomer, Polymers and Composites from Renewable Resources / M. Rinaudo: Editors M. Belgacem, A. Gandini. – Amsterdam: Elsevier, 2008. – P. 495-516.
193. Robinson, R. R. Nutritional benefits of larch arabinogalactan. Advanced Dietary Fiber Technology / R. R. Robinson, J. Causey, J. L. Slavin: Editors B. V. McCleary, L. Prosky. – Oxford: Blackwell Science Ltd., 2001. – P. 443–451.
194. Rolin, C. Pectin: in Polysaccharides: structural diversity and functional versatility / C. Rolin, B. U. Nielsen, P. E. Glahm: Editor S. Dumitaiu. – New York: Marcel Dekker, 1998. – P. 377-431.
195. Romeijn, S. G. The effect of nasal drug formulations on ciliary beating in vitro / S. G. Romeijn, J. C. Verhoef, E. Marttin, F. W. Merkus // Int. J. Pharm. – 1996. – Vol. 135. – P. 137-145.
196. Saettone, M. F. Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic-acid / M. F. Saettone, P. Chetoni, M. T. Torracca, S. Burgalassi, B. Giannaccini // Int. J. Pharm. – 1989. – Vol. 51. – P. 203-212.

197. Saettone, M. F. Mucoadhesive ophthalmic vehicles – evaluation of polymeric low-viscosity formulations / M. F. Saettone, D. Monti, M. T. Torracca, P. Chetoni // J. Ocul. Pharmacol. – 1994. – Vol. 10. – P. 83-92.
198. Saha, N. R. Studies on methylcellulose/pectin/montmorillonite nanocomposite films and their application possibilities / N. R. Saha, G. Sarkar, I. Roya, D. Rana, A. Bhattacharyya, A. Adhikari, A. Mukhopadhyay, D. Chattopadhyay // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 136. – P. 1218-1227.
199. Schante, C. E. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications / C. E. Schante, G. Zuber, C. Herlin, T. F. Vandamme // Carbohyd. Polym. – 2011. – Vol. 85. – P. 469-489.
200. Schipper, N. G. Nasal absorption of 17- β -estradiol and progesterone from dimethyl-cyclodextrin inclusion formulation in rats / N. G. Schipper, W. A. Hermens, S. G. Romeyn, J. Verhoef, F. W. Merkus // Int. J. Pharm. – 1990. – Vol. 64. – P. 61-66.
201. Scomparina, A. Novel folated and non-folated pullulan bioconjugates for anticancer drug delivery / A. Scomparina, S. Salmasoa, S. Bersania, R. Satchi-Fainarob, P. Caliceti // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 42, N 5. – P. 547-558.
202. Selyutina, O. Y. Influence of glycyrrhizin on permeability and elasticity of cell membrane: perspectives for drugs delivery / O. Y. Selyutina, N. E. Polyakov, D. V. Korneev, B. N. Zaitsev // Drug Deliv. – 2016. – Vol. 23. – P. 858-65.
203. Sevelius, H. Bioavailability of naproxen sodium and its relationship to clinical analgesic effects / H. Sevelius, R. Runkel, E. Segre, S. S. Bloomfield // Br. J. Clin. Pharmac. – 1980. – Vol. 10. – P. 259-263.
204. Seymour, L. W. Intraperitoneal and subcutaneous retention of a soluble polymeric drug-carrierbearing galactose / L. W. Seymour, R. Dunkan, V. Chytry, J. Strohalm, K. Ulbrich, J. Kopeček // Journal of Controlled Release. – 1991. – Vol. 16. – P. 255-262.
205. Shao, Z. J. Pulmonary absorption of recombinant human growth hormone in rats / Z. J. Shao, A. K. Mitra // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 1996. – Vol. 42. – P. 199-203.

206. Shao, Z. Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. III. Pulmonary route of delivery / Z. Shao, Y. Li, A. K. Mitra // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 1994. – Vol. 40. – P. 283-288.
207. Sharma, N. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview / N. Sharma, A. Baldi // Drug Delivery. – 2016. – Vol. 23, № 3. – P. 739-757.
208. Srivastava, S. K. Dextrans-potential polymeric drug carriers for flurbiprofen / S. K. Srivastava, D. K. Jain, P. Trivedi // Pharmazie. – 2003. – Vol. 58, № 6. – P. 389-391.
209. Siepmann J. Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery 1st Edition / J. Siepmann, R. A. Siegel, M. J. Rathbone. – Springer, 2012. – 592 p.
210. Singh, R. S. Pullulan: Microbial sources, production and applications / R. S. Singh, J. K. Saini, J. F. Kennedy // Carbohydrate Polymers. – 2008. – Vol. 73. – P. 515-531.
211. Singh, R. S. Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting / R. S. Singh, N. Kaur, J. F. Kennedy // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 123. – P. 190-207.
212. Singla, A. K., Chawla, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update / A. K. Singla, M. Chawla // J. Pharm. Pharmacol. – 2001. – Vol. 53. – P. 1047-1067.
213. Sinha, V. R. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs / V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan // International Journal of Pharmaceutics. – 2004. – Vol. 274. – P. 1-33.
214. Sinha, V. R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery / V. R. Sinha, R. Kumria // International Journal of Pharmaceutics. – 2001. – Vol. 224. – P. 19-38.
215. Skjak-Braek, G. Chitin and Chitosan-Source, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Application / G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. A. Sandford. – Netherlands: Springer, 1989. – 835 p.
216. Sneader, W. Drug discovery: A History / W. Sneader. – John Wiley & Sons Ltd., 2006. – 469 p.

217. Sosnik, A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art / A. Sosnik // ISRN Pharmaceutics. – 2014. –Vol. 2014. – Article ID 926157, 17 p.
218. Sriamornsak, P. Application of pectin in oral drug Delivery / P. Sriamornsak // Expert Opin. Drug Deliv. – 2011. – Vol. 8, № 8. – P. 1009-1023.
219. Sriamornsak, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review / P. Sriamornsak // Silpakorn. Univ. Int. J. – 2003. – Vol. 3. – P. 206-228.
220. Stavrovskaya, A. A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells / A. A. Stavrovskaya // Biochemistry (Moscow). – 2000. – Vol. 65, № 1. – P. 95-106.
221. Stella, V. J. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery / V. J. Stella, R. A. Rajewski // Pharm. Res. – 1997. – Vol. 14. – P. 556-567.
222. Stella, V. J. Mechanism of drug release from cyclodextrin complexes / V. J. Stella, V. M. Rao, E. A. Zannou, V. Zia // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1999. – Vol. 36. – P. 3-16.
223. Strickley, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations / R. G. Strickley // Pharm. Res. – 2004. –Vol. 21. – P. 201-230.
224. Suflet, D. M. Phosphorylated polysaccharides. 2. Synthesis and properties of phosphorylated dextran / D. M. Suflet, G. C. Chitanu, J. Desbrieres // Carbohydr. Polym. – 2010. – Vol. 82, № 4. – P. 1271-1277.
225. Suhonen, P. Ocular absorption and irritation of pilocarpine prodrug is modified with buffer, polymer, and cyclodextrin in the eyedrop / P. Suhonen, T. Jarvinen, K. Lehmussaari, T. Reunamaki, A. Urtti, // Pharm. Res. – 1995. – Vol. 12. – P. 529-533.
226. Surendrakumar, K. Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based drypowder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs / K. Surendrakumar, G. P. Martyn, E. C. M. Hodgers, M. Jansen, J. A. Blair // J. Control. Rel. – 2003. – Vol. 91. – P. 385-394.

227. Szente, L. Spontaneous opalescence of aqueous gamma-cyclodextrin solutions: complex formation or self-aggregation? / L. Szente, J. Szejtli, G. L. Kis // *J. Pharm. Sci.* – 1998. – Vol. 87, № 6. – P. 778-781.
228. Tang, P. Characterization and In Vitro Evaluation of the Complexes of Posaconazole with β - and 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin / P. Tang, L. Wang, X. Ma, K. Xu, X. Xiong, X. Liao, H. Li // *AAPS PharmSciTech.* – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 104-114.
229. Thirawong, N. Viscometric study of pectin–mucin interaction and its mucoadhesive bond strength / N. Thirawong, R. A. Kennedy, P. Sriamornsak // *Carbohydrate Polymers.* – 2008. – Vol. 71. – P. 170-179.
230. Thoren, L. The dextrans — clinical data / L. Thoren // *Devel. Biol. Stand.* – 1981. – Vol. 48. – P. 157-167.
231. Tiwari, G. Drug delivery systems: An updated review / G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S. K. Bannerjee // *Int. J. Pharm Investig.* – 2012. Vol. 2, № 1. – P. 2-11.
232. Tønnesen, H. H. Alginate in drug delivery systems / H. H. Tønnesen, J. Karlsen // *Drug Development and Industrial Pharmacy.* – 2002. – Vol. 28, № 6. – P. 621-630.
233. Toth, C. A. Receptor-mediated endocytosis of carcinoembryonic antigen by rat liver kupffer cells / C. A. Toth, P. Thomas, S. A. Broitman, N. Zamcheck // *Cancer Research.* – 1985. – Vol. 45. – P. 392-397.
234. Trevor, A. J. *Katzung & Trevor's Review of Pharmacology: Examination & Board Review*, 8e / A. J. Trevor, B. G. Katzung, S. B. Masters. – McGraw-Hill Professional, 2008. – 631 p.
235. Tripodo, G. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges / G. Tripodo, A. Trapani, M. L. Torre, G. Giammona, G. Trapani, D. Mandracchia // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 2015. – Vol. 97. – P. 400-416.

236. Tripodo, G. Current research on hyaluronic acid-drug bioconjugates / G. Tripodo, H. Zhang, S. Huang, X. Yang, G. Zhai // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 86. – P. 310-317.
237. Uekama, K. Cyclodextrin Drug Carrier Systems / K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie // Chem Rev. – 1998. – Vol. 98, № 5. – P. 2045-2076.
238. URL. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>
239. URL.
<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/puromycin#section=Top>
240. URL. <http://www.rlsnet.ru>
241. Urtti, A. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs / A. Urtti, L. Salminen // Surv. Ophthalmol. – 1993. – Vol. 37. – P. 435-456.
242. Van Breemen, R. B. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption / R. B., Van Breemen, Y. Li // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2005. – Vol. 1(2). – P. 175-185.
243. Varshosaz, J. Dextran conjugates in drug delivery / J. Varshosaz // Expert Opin. Drug Deliv. – 2012. – Vol. 9(5). – P. 509-523.
244. Varshosaz, J. Effectiveness of budesonide-succinate-dextran conjugate as a novel prodrug of budesonide against acetic acid-induced colitis in rats / J. Varshosaz, J. Emami, A. Fassihi, N. Tavakoli, M. Minaiyan, F. Ahmadi, P. Mahzouni, F. Dorkoosh // Int. J. Colorectal Dis. – 2010. – Vol. 25, №10. – P. 1159-1165.
245. Varshosaz, J. Synthesis and evaluation of dextran-budesonide conjugates as colon specific prodrugs for treatment of ulcerative colitis / J. Varshosaz, J. Emami, N. Tavakoli, A. Fassihi, M. Minaiyan, F. Ahmadi, F. Dorkoosh // Int. J. Pharm. – 2009. – Vol. 365, № 1-2. – P. 69-76.
246. Vélaz, I. Effect of PEG 4000 on the dissolution rate of naproxen / I. Vélaz, M. Sánchez, C. Martín, M. C. Martínez-Ohárriz // Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. – 1998. – Vol. 23(2). – P. 103-108.
247. Vince, A. J. The effect of lactulose, pectin, arabinogalactan, and cellulose on the production of organic acids and metabolism of ammonia by intestinal bacteria in

a faecal incubation system / A. J. Vince, N. I. McNeil, J. D. Wager, O. M. Wrong, // Br. J. Nutr. – 1990. – Vol. 63. – P. 17-26.

248. Vyas, S. Ketorolac-dextran conjugates: synthesis, in vitro and in vivo evaluation / S. Vyas, P. Trivedi, S. C. Chaturvedi, // Acta Pharm. – 2007. – Vol. 57, № 4. – P. 441-450.

249. Walker, G. J. Dextrans: in Biochemistry of Carbohydrates II, Vol. 16 / G. J. Walker: Editor D. J. Manners. – Baltimore: University Park Press, 1978. – P. 75-125.

250. Wall, D. A. Administration as hydroxypropyl β -cyclodextrin complexes does not slow rates of pulmonary drug absorption in rats / D. A. Wall, J. Marcello, D. Pierdomenico, A. Farid // S.T.P. Pharma Sci. – 1994. – Vol. 4. – P. 63-68.

251. Washington, N. Ocular drug delivery: in Physiological pharmaceutics. Barriers to drug absorption (2nd Edition) / N. Washington, C. Washington, C. G. Wilson. – London: Taylor & Francis, 2001. – P. 249-270.

252. Washington, N. Pulmonary drug delivery: in Physiological Pharmaceutics. Barriers to drug absorption (2nd Edition) / N. Washington, C. Washington, C. G. Wilson. – London: Taylor & Francis, 2001. – P. 221-247.

253. Wientjes, M. G. Nonlinear Pharmacokinetics of Aspirin in Rats / M. G. Wientjes, G. Levy // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1988. – Vol. 245(3). – P. 809-815.

254. Wolf, J. E. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratosis / J. E. Wolf, J. R. Taylor, E. Tschen, S. W. Kang // Int. J. Dermatol. – 2001. – Vol. 40. – P. 709-713.

255. Wu, X. Atorvastatin Transport in the Caco-2 Cell Model: Contributions of P-Glycoprotein and the Proton- Monocarboxylic Acid Co-Transporter / X. Wu, L. R. Whitfield, B. H. Stewart // Pharmaceutical Research. – 2000. – Vol. 17, №. 2. – P. 209-215.

256. Xi, K. Liver targeting of interferon through pullulan conjugation / K. Xi, Y. Tabata, K. Uno, M. Yoshimoto, T. Kishida, Y. Sokawa, Y. Ikada // Pharmaceutical Research. – 1996. – Vol. 13. – P. 1846-1850.

257. Xing, P. Colon-Targeted Delivery of IgY Against Clostridium difficile Toxin A and B by Encapsulation in Chitosan-Ca Pectinate Microbeads / P., Xing, Y.,

Shi, C. Dong, H. Liu, Y. Cheng, J. Li, D. Sun, M. Li, K. Sun, D. Feng // AAPS PharmSciTech. – 2017. – Vol. 8, № 4. – P. 1095-1103.

258. Yang, T. Cyclodextrins in nasal delivery of lowmolecular-weight heparins: in vivo and in vitro studies / T. Yang, A. Hussain, J. Paulson, T. J. Abbruscato, F. Ahsan // Pharm. Res. – 2004. – Vol. 21. – P. 1127-1136.

259. Yeomans, N. D. Aspirin: Old drug, new uses and challenges / N. D. Yeomans // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2011. – Vol. 26. – P. 426-431.

260. Yoneyama, M. Effects of pullulan intake in humans / M. Yoneyama, K. Okada, T. Mandai, H. Aga, S. Sakai, T. Ichikawa // Journal of the Japanese Society of Starch Science – 1990. – Vol., 37. – P. 123-127.

261. Yoo, S. D. Increased bioavailability of clomipramine after sublingual administration in rats / S. D. Yoo, B. M. Yoon, H. S. Lee, K. C. Lee // J. Pharm. Sci. – 1999. – Vol. 88. – P. 1119-1121.

262. Zhang, W. Novel pectin-based carriers for colonic drug delivery / W. Zhang, K. M. Mahuta, B. A. Mikulski, J. N. Harvestine, J. Z. Crouse, J. C. Lee, M. G. Kaltchev, C. S. Tritt // Pharm. Dev. Technol. – 2016. – Vol. 21, № 1. – P. 127-30.

263. Zhang, Y. PKSolver: an add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel / Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie // Comput. Methods Progr. Biomed. – 2010. – Vol. 99. – P. 306-314.

264. Zhang, Z. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats / Z. Zhang, H. Bu, Z. Gao, Y. Huang, F. Gao, Y. Li // International Journal of Pharmaceutics. – 2010. – Vol. 394. – P. 147-153.

265. Zhang, Z. Fabrication of a Micellar Supramolecular Hydrogel for Ocular Drug Delivery / Z. Zhang, Z. He, R. Liang, Y. Ma, W. Huang, R. Jiang, S. Shi, H. Chen, X. Li // Biomacromolecules. – 2016. – Vol. 17, № 3. – P. 798-807.