

Разработка новых препаратов, создание новых лекарственных форм, а также технологии их получения является одним из современных направлений фармакологии. Актуальным на сегодняшний день является создание водных растворимых форм лекарственных препаратов, поскольку использование плохо растворимых лекарственных препаратов в виде порошков, микроэмульсий, суспензий достаточно часто приводит к закупорке капилляров. Одним из подходов к повышению растворимости является использование мицеллярных систем [1-6]. Однако, не ясно, будет ли сохраняться биологическая активность лекарственных веществ при солюбилизации в мицеллах. Биологическая активность химических соединений стимулирует их исследование на предмет пригодности для последующего применения в качестве лекарственных средств. В частности, производные бензофуроксана обладают широким спектром биологической активности [7]. Известна антибактериальная и антигрибковая активность гетероциклических производных о-хининона, способность ингибировать моноаминоксидазу, а также сосудорасширяющее действие определенным образом замещенных бензофуроксанов [7]. 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксан, ДХДНБФО, является компонентом некоторых биологически активных смесей [8]. Ярко выраженная антибактериальная и фунгицидная активность позволяют использовать, в качестве прекурсоров лекарственных препаратов [8]. Изученные авторами [9] 14 соединений в ряду 5,7-дизамещенных-4,6-динитробензофуроксана обладают выраженными антимикробными, антимикотическими и акарицидными свойствами. Исследование смеси 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофуроксана - «Нитроксан» [10] показало широкий спектр проявляемой ею биологической активности - фунгицидной, бактерицидной, акарицидной, спороцидной, вирулицидной. Смесь 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксана, 5,7-дихлор-6-нитробензо-фуроксана и 5,7-дихлор-4-нитробензофуроксана, которая известна как «Тримиксан» оказывает выраженный эффект на нитроксидергическое состояние организма [11]. Этим же свойством обладают «Хлофузан» (4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразан) и «Фениксан» (5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофу-роксан) [12]. ДХДНБФО в качестве основного компонента входит в состав лекарственной формы наружного применения «Димиксан» - двухкомпонентной системы на основе 5-нитро-4,6-дихлорбензофуроксана и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуроксана. Наиболее перспективной областью применения «Димиксана» как лекарственного средства вследствие его высокой акарицидной и фунгицидной активности является ветеринария и медицина [13]. Известны антипаразитарные препараты «Дегельм» и «Депрот», основой которых являются четвертичные соли фосфония с высшими алкильными радикалами нитрозамещённого бензофуроксана в качестве генератора NO. [14,15]. В связи с тем, что растворимость соединений и композиций на основе производных бензофуроксана в воде довольно ограничена, ранее уже возникала

необходимость подбора подходящего растворителя этих форм для создания наиболее удобной для применения лекарственной формы. В связи с плохой растворимостью «Эктоцида» в воде возникла необходимость подобрать подходящие растворители для создания удобных для применения лекарственных форм. Лучшим растворителем для «Эктоцида» явился диметилсульфоксид. При разработке стойких суспензий в качестве поверхностно - активных веществ авторами [16] использовались ПЭО - 400 и стеарокс - 6. В качестве мазевой основы использовали ПЭО - 400, ПЭО-1500 и вазелин. Также были показаны стойкие суспензии как для композиций на основе «Димиксана». Например, были разработаны состав и методика получения солюбилизированной формы «Димиксана» в водной среде [13]. Таким образом, благодаря своей биологической активности бензофуроксаны используются в качестве компонента лекарственных препаратов антигельминтного действия, при лечении грибковых и чесоточных заболеваний, а также могут быть прекурсором лекарственных средств сосудорасширяющего, антиагрегирующего, противоракового, антилейкемического действия. Однако, биологическая активность ДХДНБФО, солюбилизированного в классических мицеллах ионных и неионных ПАВ не изучалась. Экспериментальная часть 5,7-Дихлор-4,6-динитробензофуроксан: ДХДНБФО, синтезирован Л.М. Юсуповой в лаборатории на кафедре ХТОСА КНИТУ по известной методике [17]. Хорошо растворим в органических растворителях (ДМСО, ацетонитрил), но не растворяется в воде и гексане. Молекулярная масса 295 г/моль. В работе использовали следующие ПАВ. Додецилсульфат натрия (ДСН) фирмы «Aldrich». брутто-формула $C_{12}H_{25}OSO_3Na$,. после трехкратной перекристаллизации из этанола. Содержание основного вещества 98%. Структурная формула: Цетилтриметиламмонийбромид, (ЦТАБ) $C_{16}H_{33}N+(CH_3)_3Br$ фирмы «Sigma», перекристаллизовывали из этанола. Содержание основного вещества 99,5%. Структурная формула: p-1,1,3,3-тетраметилбутил фенокси полиоксиэтилен гликоль, Tr X-100 фирмы «Merck». Брутто формула: $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, где $n = 9-10$. Содержание основного вещества составляет 98,5 %. Структурная формула: Цетиловый эфир полиоксиэтилена (10), Brij 56 (полиалкиленоксид) фирмы «Aldrich»: $C_{12}H_{25}O-(CH_2)_4-(CH_2CH_2O)_{10}-H$ Для приготовления растворов использовали воду дважды перегнанную деионизированную воду. Для определения биологической активности готовили водные мицеллярные растворы в концентрациях: ДСН - $1,00 \cdot 10^{-2}$ моль/л; ЦТАБ - $5,00 \cdot 10^{-3}$ моль/л; Tr X-100 - $5,00 \cdot 10^{-3}$ моль/л; Brij 56 - $5,00 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Антимикробное действие композиций определяли аналогично [18]. В качестве тест-объектов нами были использованы следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* NCTC 8035, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* 1773, *Aspergillus niger* (VKMF-1119). Бактериостатические

фунгистатические свойства изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде по методикам [18]. Для приготовления композиций первоначально готовили мицеллярные растворы изучаемых поверхностно-активных веществ. Затем проводили процесс солюбилизации ДХДНБФО. Для этого избыточное количество ДХДНБФО заливали раствором ПАВ определенной концентрации (в эппендорфе), и тщательно встряхивали в течение 24 часов до достижения максимальной растворимости. Осадок отделяли при помощи центрифуги при температуре $25 \pm 0,5$ °C. Концентрация солюбилизированного ДХДНБФО определялась спектрофотометрически при 410 нм, в пересчете на этанол с использованием $\epsilon = 2259$ моль $\cdot$ л $\cdot$ см $^{-1}$ на спектрофотометре Agilent 8453. Антимикробное действие изучалось для растворов ДХДНБФО, солюбилизированных в мицеллах изучаемых ПАВ в исходных концентрациях: для водного раствора - 0,00153 моль/л; для раствора Tr X-100 - 0,00488 моль/л; для Brij 56 - 0,00590 моль/л; для ДСН - 0,00595 моль/л; для ЦТАБ - 0,00301 моль/л; для бинарных растворов ДМСО : H₂O (20 об.%.:80 об.%) - $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. 1 мл соответствующего раствора ДХДНБФО добавляли непосредственно в 10 мл агаризованной питательной среды (МПА) или среды Сабуро (для грибов). Полученную суспензию тщательно перемешивали и вносили в стерильные чашки Петри. В контрольные чашки добавляли 1 мл соответствующего растворителя. Опыт проводили в трёхкратной повторности. После застывания агара на поверхность среды бактериологической петлёй наносили культуру каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде бляшек на МПА и агар Сабуро соответственно. Чашки с МПА инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °C в течение 48 ч. Чашки со средой Сабуро инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)$ °C в течение 5 суток. Испытания проводили в лаборатории Химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН. Обсуждение результатов Для увеличения растворимости ДХДНБФО мы использовали мицеллярные растворы ионных ПАВ: цетилтриметиламмоний бромида, ЦТАБ; додецилсульфата натрия, ДСН. В качестве неионных ПАВ использовали: Tr X-100, который имеет в составе молекулы гидрофобный (4-третоктилфенол) и гидрофильные фрагменты (из остатков оксида этилена, в количестве 9-10); Brij 56, который содержит в качестве гидрофобного блока додецильный радикал нормального строения: C₁₂H₂₅O-(CH₂)₄-(CH₂CH₂O)₁₀-H. Для определения биологической активности использовали мицеллярные растворы соответствующих ПАВ с солюбилизированным ДХДНБФО Впервые введенное Мак - Беном в понятие «солюбилизация» (от позднелатинского solubilis - растворимый), в настоящее время означает «коллоидное растворение, самопроизвольное и обратимое проникание какого-либо вещества (солюбилизата), слаборастворимого в данной жидкой среде, внутрь находящихся в ней мицелл поверхностно-активного вещества или молекулярных клубков (глобул) высокомолекулярного соединения» [2]. Для организованных, в

частности мицеллярных сред, образованных ПАВ, солюбилизация возможна благодаря их специфическому строению. Как известно, мицеллы - это агрегаты дифильных молекул, имеющих в своем составе длинный гидрофобный фрагмент (как правило, углеводородный радикал различного строения) и гидрофильный фрагмент - головную группу. Мицеллы образуются по достижении критической концентрации, которая называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). ККМ зависит от многих факторов. Этот вопрос хорошо описан в литературе [19-22] и поэтому мы на нем не останавливаемся. Однако отметим, что именно дифильное строение мицелл ответственно за возможность проявления солюбилизации, возможность инкорпорировать различные по гидрофобности и полярности соединения в различной области - неполярном ядре, в области головных групп, в пограничном слое. Например, гидрофобное ядро мицеллы может быть использовано как область для инкапсулирования разнообразных плохо растворимых терапевтических и диагностических агентов. Такое инкапсулирование существенно увеличивает биодоступность, защищает их от деструктивных факторов (рис. 1) [22]. Мицеллы можно рассматривать как потенциальные системы для доставки лекарств, преимуществом которых является легкость приготовления [3]. По сути дела большинство лекарственных веществ (ЛВ) являются органическими соединениями и закономерности, выявленные для них, наблюдаются для ЛВ.

Рис. 1 - Схематическое представление солюбилизации в классических мицеллах ионных и неионных ПАВ Согласно концепции автора [3], мицеллярная солюбилизация ЛВ может увеличить его биодоступность и стабильность, поэтому дизайн оболочки для ЛВ, является интересной задачей. Для выбора подходящей среды требуется предварительное изучение растворимости ЛВ в системах мицеллярных ПАВ, что и было проведено для ДХДНБФО в [1] и показано на основе анализа физико-химических характеристик солюбилизации, что предпочтительными для этих целей являются мицеллы неионных ПАВ. 5,7-дихлор-4,6-динитробензфуросан является прекурсором лекарственных препаратов, однако неизвестно сохранится ли его биологическая активность в мицеллярных растворах. В связи с этим нами исследовано действие ДХДНБФО, солюбилизированного в мицеллах ДСН, ЦТАБ, Tr X-100, Brij 56 на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*. Методика определения биологической активности показана в экспериментальной части, а результаты испытаний - в табл.1

Таблица 1 - Результаты испытаний на биологическую активность мицеллярных растворов ДХДНБФО

Наименование препарата	Бактериальные культуры	Культуры грибов
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus cereus</i> NCTC 8035
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>gypseum</i> 1773	<i>Aspergillus niger</i> VKMF-1119	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
ЦТАБ (5*10 ⁻³ моль/л)	- - - ± ± +	I+ЦТАБ I 0,0030 моль/л ± ± ± - ± -
Brij56 (5*10 ⁻³ моль/л)	+ + + ± + +	I+Brij 56 I 0,00590 моль/л +

+ + - ± - Tr X-100 ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) + + + - ± ± I+Tr X-100 I 0,0049 моль/л + + + - ±
 - ДСН ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) + + + - ± - I+ДСН I 0,0060 моль/л + + + - ± - ДМСО: H₂O
 (20%): (80%) + + + + + + I+ДМСО I 0,02 моль/л + + + - ± - H₂O + + + + + +
 I+H₂O I 0,0016 моль/л + + + - ± - Контроль тест-микроорганизмов + + + + + + I-
 ДХДНБФО Наличие такого же роста тест-микроорганизмов, как в контроле,
 обозначают знаком (+), отсутствие роста знаком (-), слабый, замедленный или
 угнетённый рост знаком - (±). Если по сравнению с контролем на средах с
 препаратом наблюдают заметное уменьшение количества колоний на чашках
 (более 70%) или отсутствие роста тест-микроорганизмов, можно сделать
 заключение о наличии антимикробного действия. Антибактериальным действием
 ДХДНБФО, солюбилизированный в мицеллах ДСН, Tr X 100, Brij 56 не обладает.
 Мицеллы ЦТАБ обладают антибактериальным действием. Следует отметить, что
 ДХДНБФО способствует незначительному угнетению роста бактериальных тест-
 штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* NCTC 8035.
 При этом ДХДНБФО проявляет одинаковое противогрибковое действие в водных и водно-мицеллярных средах.
 Причем в отношении дрожжеподобного гриба *Candida albicans* и *Trichophyton mentagrophytes*
 (возбудитель дерматозов человека и животных) наблюдается полное угнетение
 тест-микроорганизмов, а в случае фитопатогенного гриба *Aspergillus niger*
 происходит лишь незначительное замедление его роста. Таким образом,
 антигрибковая активность ДХДНБФО сохраняется в мицеллярных системах,
 изученных анионного и неионных ПАВ. Учитывая данные по солюбилизации и
 сохранение антигрибковой активности, мицеллярные системы неионных ПАВ
 можно рекомендовать в качестве наноконтейнеров для ДХДНБФО при
 разработке систем транспорта лекарственных веществ. В этом случае
 предпочтительными являются мицеллы неионных ПАВ Brij 56 и Tr X-100
 вследствие их меньшей токсичности и меньших значениях концентраций при
 которых образуются мицеллы, ККМ. Авторы выражают благодарность
 профессору КХТОСА КНИТУ за предоставленный образец ДХДНБФО.