

УДК 579.61, 577.181.5

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМА ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ МОЛЕКУЛ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ (ОБЗОР)

© 2025 г. А. А. Скуредина^{1,*}, Н. Г. Белогурова¹, Е. В. Кудряшова¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: anna.skuredina@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.09.2024 г.

После доработки 20.10.2024 г.

Принята к печати 10.11.2024 г.

Разнообразие структуры и супрамолекулярной архитектуры существующих систем доставки антибактериальных препаратов создает проблему выбора методов исследования *in vitro* свойств лекарственных форм (ЛФ) и определения влияния носителя на противомикробные свойства препарата. В обзоре рассмотрены основные микробиологические методы исследования противомикробной активности, которые используются при исследовании ЛФ, дана оценка методов исследования в соответствии с типом и химической природой носителя препарата. Кроме того, обсуждены инструментальные методы и экспериментальные методики изучения механизма противомикробного действия ЛФ, а также *in vitro* эффекты, которые наиболее часто описываются в литературе при инкапсулировании препаратов. Обзор предоставляет исследователю стратегию анализа противомикробных свойств, разрабатываемых ЛФ на основании физико-химических свойств системы, что позволяет более комплексно оценить дальнейшие перспективы ЛФ.

Ключевые слова: антибактериальная активность, системы доставки лекарств, микроскопия клеток

DOI: 10.31857/S0555109925020013 EDN: ENIIBM

На сегодняшний день большинство доступных лекарственных средств представляет собой основное действующее вещество (лекарственную молекулу) и в ряде случаев вспомогательные компоненты, которые необходимы для получения удобной формы использования медицинского препарата в соответствии со способом применения, консистенции и др. Так, для получения таблетированных форм, капсул, мазей и т.д., как правило, используются желатин, гуаровая и ксантановая камедь, альгинат натрия, производные целлюлозы и др. [1–3]. Несмотря на наличие дополнительных компонентов многие лекарственные средства не всегда обладают выраженным терапевтическим эффектом, поскольку основное действующее вещество может обладать низкой биодоступностью, не достигается необходимая концентрация препарата в плазме крови, не обеспечивается длительное высвобождение. При этом наблюдаются выраженные побочные эффекты. Разработка и тестирование принципиально новых лекарственных

молекул является длительным и дорогостоящим процессом, поэтому для достижения максимальной эффективности и безопасности уже известных препаратов существуют подходы по инкапсуляции биологически активных молекул в системы доставки лекарств [4].

Лекарственная форма препарат-носитель (ЛФ) обладает рядом значимых преимуществ по сравнению со свободным препаратом: увеличение растворимости вещества, снижение его токсичности, адресная доставка и т.д. Важно отметить, что за последние два десятилетия область разработки ЛФ претерпела значительную эволюцию с точки зрения подходов к дизайну носителя лекарства. Главным образом, произошел переход от макро- и наноматериалов к “умной” адресной доставке, что позволяет в перспективе вывести на рынок препарат с локальным действием [5].

ЛФ являются объектом интереса не только научного сообщества, но и медицинских компа-

ний. Так, известны коммерчески доступные ЛФ для небольших лекарственных молекул — Арикайсе (“Arikayce”, Insmad Inc., США, липосомальная форма аминогликозида амикацина) [6], Амбизом (“AmBisome”, Astellas Pharma, США, липосомальная форма амфотерицина В) [7], Абраксан (“Abraxane”, Bristol-Myers Squibb Company, США, комплекс паклитаксела с альбумином), а также более крупных веществ — Онпатро (“Onpattro”, Alnylam Pharmaceuticals, США, ПЭГилированные липидные наночастицы с малой интерферирующей РНК) и др. [8, 9].

Для современной медицины особенно актуальны системы доставки лекарств для антибактериальных препаратов, поскольку, несмотря на широкий успех применения противомикробных агентов, бактериальные инфекции по-прежнему остаются серьезной угрозой здоровью человека. Новые ЛФ антибактериальных молекул особенно необходимы в связи с тяжелыми респираторными заболеваниями (в том числе постковидной пневмонией) и распространением устойчивых к антибиотикам штаммов. В качестве носителей противомикробных веществ используются системы различной химической природы (неорганические материалы, природные и синтетические органические полимеры и др.), разнообразной формы (твердые порошки, растворы, эмульсии и т.д.) и супрамолекулярной архитектуры (гидрогели, волокна, частицы, нанотрубки и т.д.), а также встречается сочетание нескольких компонентов [10]. При этом посредством подбора химической структуры, оптимального размера, поверхностного заряда и химической модификации носителя возможно достижение таргетной доставки и локального высвобождения препарата. Так, наиболее известным примером адресной доставки является нацеливание на маннозные рецепторы макрофагов при терапии внутриклеточных патогенов, таких как *Mycobacterium tuberculosis*. Однако подобные системы широко изучены, в первую очередь, для цитостатических препаратов, а в случае противомикробных средств изучены мало [10–12].

Важно отметить, что многие работы сосредоточены на дизайне, получении и глубокой характеристике только физико-химических параметров антибактериальных ЛФ таких, как: эффективность загрузки носителем лекарственной молекулой (в % от добавленного или мг/мг носителя), механические параметры материала, размеры и химическая структура носителя, высвобождение лекарства в буферные системы и т.д. В ряде случаев исследуется цитотоксичность предложенных систем и фармакокинетические параметры [13–17]. Однако при разработке новой ЛФ антибактериального препарата исследование противомикробного действия является крайне необходимым для подтверждения действия лекарственной молекулы в системе доставки и сравнения полученных ре-

зультатов с эффективностью действия свободного препарата, что позволит оценить целесообразность использования носителя.

В связи с разнообразием носителей и их свойств, а также наличием в литературе множества типов и вариаций методов исследования антибактериальной активности, возникают трудности при выборе наиболее релевантного подхода для исследования противомикробных свойств ЛФ. Кроме того, накопленный опыт и улучшение приборной базы обуславливают возникновение новых подходов снижения временных и денежных затрат. При этом в литературе нет рекомендаций по выбору наиболее релевантных подходов для качественного и количественного анализа антибактериальной активности разработанной ЛФ на основании физико-химических свойств носителя.

Обзор включает описание различных экспериментальных методов анализа *in vitro* свойств ЛФ, оценку релевантности использования того или иного метода в зависимости от физико-химических свойств ЛФ, а также примеры изучения механизма действия ЛФ *in vitro*. Кроме того, рассмотрены наиболее часто встречающиеся эффекты на антибактериальные свойства ЛФ, вызванные носителем. Обзор будет полезным для исследователей, заинтересованных в комплексном полноценном анализе ЛФ не только с точки зрения физико-химических, но и биологических свойств.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Классическим подходом к анализу противомикробной активности являются исследования, проведенные с использованием микроорганизмов. Основные подходы указаны в Методических указаниях (МУК 4.2.1890—04) Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России от 2004 г., которые аналогичны рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам и Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США. Несмотря на то, что данные методы были разработаны во второй половине XX века, они все еще актуальны и не претерпели значительных изменений для исследования *in vitro* свойств ЛФ.

Основными параметрами антибактериальной активности являются минимальная ингибирующая (подавляющая) концентрация (МИК или МПК), определяющая наименьшую концентрацию препарата, которая подавляет видимый рост клеток, и минимальная бактерицидная концентрация (МБК), соответствующая наименьшей концентрации препарата, которая обуславливает гибель 99.9% микроорганизмов. Как правило, в литературе для изучения антибактериальной активности ЛФ авторы определяют преимущественно только МИК [18, 19].

При исследовании антибактериальной активности ЛФ в качестве тест-культур используются различные штаммы как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Основными штаммами при проведении исследований *in vitro* являются штаммы грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, например, *E. coli* ATCC 25922, реже можно встретить *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Среди грамположительных клеток чаще всего используется штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, а также *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [20–27]. Важно отметить, что в рамках одного вида возможны сильные расхождения в результатах исследования антибактериальной активности одного и того же вещества, поскольку штаммы могут сильно различаться по морфологии и ζ -потенциалу поверхности, наличию слизистой капсулы, адгезии к материалам, химическому составу клеточной стенки, эффективности продукции ферментов и т.д. [28, 29]. Например, ранее нами было показано, что препарат фторхинолонового ряда левофлоксацин в 10 раз менее эффективно действует на штамм *E. coli* JM109, чем на штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli* MN1, при этом МИК *E. coli* ATCC 25922 = МИК *E. coli* MN1 [30].

Важно отметить, что при сравнении полученных результатов с данными литературы возможны расхождения, обусловленные типом среды и материалом используемого пластика. Результаты могут сильно различаться вплоть до 100 раз [31]. Так, в работе [32] исследовали антибактериальные свойства нескольких катионных дезинфицирующих средств на штаммах *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* с использованием четырех типов сред (МН1, МН2, TSB и LB) и двух материалов пластика (полипропилен и полистирол). Показано, что значения МИК для препаратов колистина и полимиксина В при использовании чашек Петри из полипропилена, как минимум, в 4 раза ниже по сравнению с полистирольными чашками. Разница значений МИК может достигать нескольких порядков, при этом данный эффект наблюдался для всех четырех питательных сред. Важно отметить, что для большинства исследуемых молекул различия в значениях МИК были значимы только для сред МН2 и TSB для обоих типов пластика, хотя наблюдались и исключения.

В другой работе [22] также отметили влияние среды на величину наблюдаемого антибактериального эффекта. Так, проведены исследования антибактериального эффекта нитрата серебра и гентамицина *in vitro* на рост культур *S. aureus* и *E. coli* в средах МНВ и FBS. МИК и МБК нитрата серебра в 2–8 раз ниже в среде FBS, в то время как для гентамицина наблюдался противоположный эффект примерно в той же степени. Такой результат указывает на влияние компонентов плазмы

крови на проявление антибактериальных свойств некоторых веществ.

Таким образом, возможны небольшие, а также значительные различия полученных данных в зависимости от условий проведения эксперимента, от особенностей штамма, типа среды и материала пластика, что осложняет проведение корреляции с результатами других научных групп. Тем не менее, существует ряд общих правил, которые встречаются во многих литературных источниках. В первую очередь, для корректного проведения исследований и сравнении полученных данных с литературными источниками необходимо использовать стандартизованную клеточную культуру $\sim 1.5 \times 10^8$ КОЕ/мл, что соответствует по оптической плотности 0.1 или 0.5 стандарту МакФарланда (суспензии, образованной преципитатом сульфата бария).

Определение стандарта МакФарланда возможно с использованием спектрофотометрии, нефелометрии или с использованием программного обеспечения для обработки фотографий. Наиболее удобным методом является исследование поглощения при длине волны примерно 625 нм [33–35].

Тем не менее, авторы [36] рекомендуют перед проведением исследований удостовериться, какому точному значению КОЕ/мл соответствует эквивалент стандарта МакФарланда. Показано, что из 25 штаммов микроорганизмов вышеописанное соотношение характерно только для *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp. и *Hafnia alvei*, в то время как для других бактериальных клеток установлено большое разнообразие полученных значений: от 30 до 300% от ожидаемых (от 0.5×10^8 до 3×10^8 КОЕ/мл). Бóльшее количество клеток, например, в случае *E. coli*, *Enterococcus* и *Acinetobacter*, по-видимому, обусловлено тем, что для достижения необходимых значений мутности требуется определенное количество клеток, которые обладают меньшим размером. В таких случаях рекомендуют использовать стандарты МакФарланда 0.25 или 0.1.

Рассмотрим несколько методов определения МИК вещества *in vitro* как с использованием жидких питательных сред (бульонная культура), так и с использованием твердых питательных сред.

Микробиологические методы исследования в жидких питательных средах. Поскольку наблюдается корреляция между общим количеством клеток и поглощением при длине волны 600–650 нм, то спектрофотометрический метод анализа образцов бактериальной культуры с ЛФ является наиболее простым и удобным для выявления противомикробного действия ЛФ и определения значения МИК в жидких питательных средах [37, 38]. Например, метод серийных разведений основан на внесении в образцы жидкой бактериальной культуры раствора лекарства и измерении оптической плотности через заданные промежутки времени

в течение 12–24 ч. Важно отметить, что оптическая плотность соответствует общему числу клеток (как живых, так и мертвых), что не позволяет сделать выводы о механизме антибактериального действия ЛФ. Данный подход нашел широкое применение для исследований ЛФ, например, нековалентных комплексов карвакрола с циклодекстрином [39]. Выделяют макрометод и микрометод, которые в основном различаются объемом исследуемого образца. Так, в макрометодe используется ~ 1 мл бактериальной культуры, а в микрометодe — до 0.2 мл [18].

Неоспоримое преимущество микрометода заключается в небольшом расходе реагентов и клеточной культуры. Например, в работе [40] исследована антибактериальная активность фторхинолона моксифлоксацина, инкапсулированного в липосомы, на штамме *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 в 96-луночном полистирольном планшете. К клеткам добавляли раствор препарата в стерильной TSB среде для достижения финального объема каждой пробы 200 мкл, использовали двухкратное разведение в диапазоне концентраций 0.078 нМ–73.48 мкМ. После инкубации при 37°C в течение 18 ч проводилась детекция клеточного роста при длине волны 570 нм.

Макрометод значительно более удобен для изучения свойств гидрогелей и нерастворимых материалов. В таком случае стерильный фрагмент ЛФ помещают непосредственно в бактериальную культуру. Например, в [41] исследовали скаффолды (пористые материалы, которые можно использовать для заселения клеток, а затем и роста тканей) из поли-ε-капролактона, содержащие хитозан и антимикробное средство ванкомицин. Диски 10 мм в диаметре и 1 мм в толщину помещали в 1 мл TBS среды с *E. coli* ATCC 25922 или *S. aureus* ATCC 25923 в 48-луночном планшете. После 24 ч инкубации спектрофотометрически определяли противомикробную активность при длине волны 640 нм.

Часто *in vitro* исследования в жидких средах дополняются исследованиями с использованием твердых питательных сред, т.е. инкубация клеток с ЛФ и последующее визуальное определение бактериального роста посредством подсчета КОЕ. Например, авторы [42] добавляли микрочастицы хитозана, загруженные фторхинолоном ципрофлоксацином, к *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 или *S. aureus* ATCC 29213 и спустя 24 ч инкубации высевали по 100 мкл на чашки Петри. Данный метод подходит для исследования как жидких, так и твердых ЛФ. Так, в работе [43] исследовали свойства линалоола, загруженного в нановолокна, на *E. coli* ATCC 10536 и *S. aureus* ATCC 25923. Волокна инкубировали в 20 мл пробирках в течение 24 ч, после чего производили высев культур на чашки Петри в различных разведениях (10^1 – 10^9) в нескольких повторах. Для

количественной оценки влияния системы доставки на антибактериальную активность препарата авторы использовали следующую формулу:

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

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

Авторы [44] также использовали аналогичный метод для исследования свойств другого препарата — триклозана. В работе исследовали кинетику противомикробного действия нековалентных комплексов антибактериального препарата и олигосахарида или полимера на его основе на *S. mutans* ATCC 33402. Для построения кривых (time-kill curves) клетки инкубировали с заданным образцом 24 ч, в течение этого времени производили отбор аликвот и высев на твердую питательную среду с последующим подсчетом КОЕ. Далее построили график в полулогорифмических координатах (lg(КОЕ/мл) от времени инкубации.

Для полуколичественного сравнения действия препаратов, а также минимизации использованного расходного лабораторного материала, можно использовать метод точечного анализа на одной чашке (single-plate — serial dilution spotting, SP-SDS), который на сегодняшний день активно описывается в литературе. Согласно данному методу высев образца производится на одной чашке в различных разведениях (рис. 1) [45]. Например, чашку Петри делят на восемь секторов: верхний и нижний сектор оставляют под маркировку штамма и подтверждение стерильности буферного раствора соответственно, каждый из оставшихся шести секторов соответствует высеву бактериальной культуры в заданном разведении. В каждый сектор вносят несколько проб раствора клеток с образцом (чаще всего 10–12 капель до 20 мкл), начиная с наименьшего разведения. Таким образом, после инкубации на чашке возникает множество “точек”, состоящих из КОЕ (рис. 1а). В работе [46] помимо подробного описания методики, также предлагается посмотреть видеоролик с инструкцией проведения эксперимента.

Метод точечного анализа на одной чашке использовался в работе [40], в которой исследованы свойства липосомальных форм антибактериального препарата моксифлоксацина на *S. epidermidis*. Клетки инкубировали с моксифлоксацином или липосомами, загруженными этим фторхинолоном методом активной загрузки, в течение 24 ч; далее образцы анализировали методом точечного анализа на одной чашке. Было показано, что во всех секторах чашки Петри с липосомальной формой моксифлоксацина, в несколько раз меньше КОЕ по сравнению с секторами чашки только с моксифлоксацином.

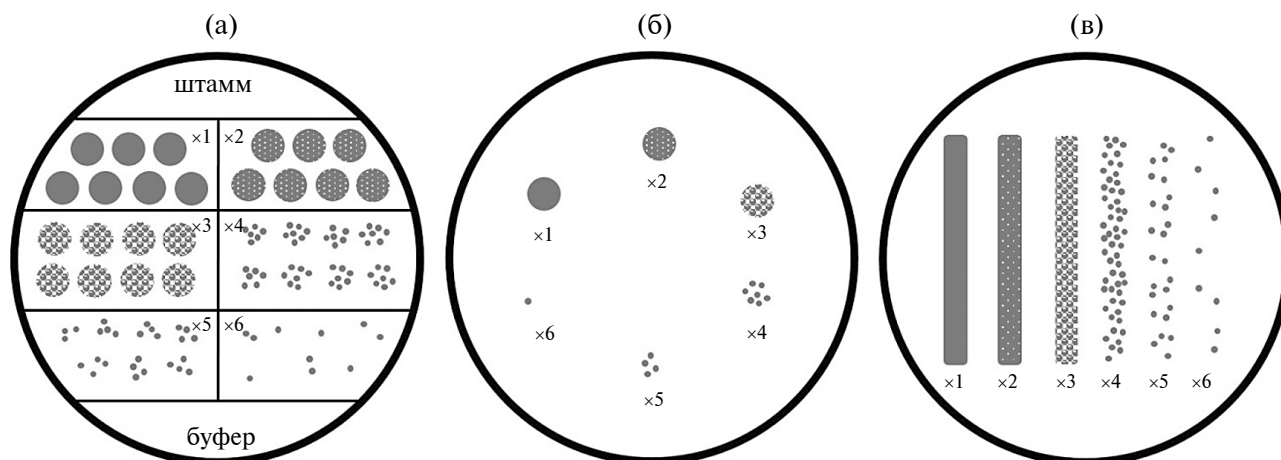


Рис. 1. Схематическое изображение результатов метода точечного анализа. Нанесение капли образца в (а) нескольких повторах и (б) однократно; (в) в форме линий. $\times 1$ – 6 разведение культуры.

Возможно размещение капель образцов на чашке в различных разведениях без маркировки секторов в произвольном порядке (рис. 16) [45]. Авторы работы также предлагают анализировать количество растущих микроколоний с помощью флуоресцентного микроскопа (40-кратное увеличение) спустя несколько часов после посева без традиционной длительной инкубации клеток. Был проведен анализ количества микроколоний в трех участках (площадью 5.67 мм^2 каждый) в капле, после чего была проведена экстраполяция на весь объем капли ($5 \text{ мкл} \approx 19.62 \text{ мм}^2$). Установлено, что такой метод предоставляет достоверные результаты для *E. coli* и *Ralstonia solanacearum* через 4 ч или 10 ч инкубации соответственно при разведениях $\geq 10^6$, что значительно сокращает время получения результатов анализа по сравнению с классическим высевом культур.

В работе [47] на одну чашку Петри наносили семь полосок с помощью многоканальной пипетки (в каждой полосе по 10 мкл раствора). Помимо визуальной оценки и подсчета КОЕ *Streptococcus mutans* авторы предложили алгоритм для обработки фотографий чашек. Авторы получали реальные изображения результатов эксперимента без обработки, а также разработали алгоритм, состоящий из двух основных этапов: обработка изображений для выявления областей, представляющих интерес, и сегментация с подсчетом КОЕ для каждого разведения с использованием метода кросс-корреляционной гранулометрии. Предложенный алгоритм продемонстрировал точность выше 80% для разведений, в которых присутствует КОЕ со средним радиусом от 1.5 до 2.5 пикселей, и точность близкую к 100%, когда средний радиус КОЕ более 2.5 пикселей. Наличие шума на изображениях может привести к ложноположительным результатам, когда шум интерпретируется как

КОЕ, или ложноотрицательным результатам, когда не происходит надлежащей сегментации скоплений КОЕ. Таким образом, одновременное присутствие КОЕ малых размеров и наличие шумов напрямую влияет на точность результата.

Микробиологические методы исследования с использованием твердых питательных сред. В большинстве методов исследования антибактериальной активности препаратов используются исключительно твердые питательные среды. Наиболее часто встречается метод серийных разведений, в котором исходную бактериальную культуру высевает на чашки Петри с твердой питательной средой, содержащей лекарственный препарат (рис. 2а) [48]. В данном методе не используется ряд препаратов вследствие их нестабильности при высоких температурах [49]. Из важных преимуществ метода, важно отметить возможность одновременного исследования нескольких штаммов (рис. 2б). Так, в работе [50] авторы одновременно исследовали 43 клинических штамма *Klebsiella pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, которые выделялись при внутрибольничных инфекциях. Для исследования противомикробной активности ЛФ такой подход в литературе не встречается, что, по-видимому, связано с низкой стабильностью некоторых супрамолекулярных систем в условиях высоких температур. Тем не менее, инкапсуляция системы доставки в агар может быть использована для имитации высвобождения лекарства в ткани, что подробнее будет рассмотрено далее.

Для оценки антибактериальной активности ЛФ наиболее часто используется метод исследования на твердых средах Кирби-Бауэра, который позволяет одновременно проводить анализ антибактериальной активности 1–5 образцов (рис. 3), а также разнообразных типов ЛФ. Определить точное

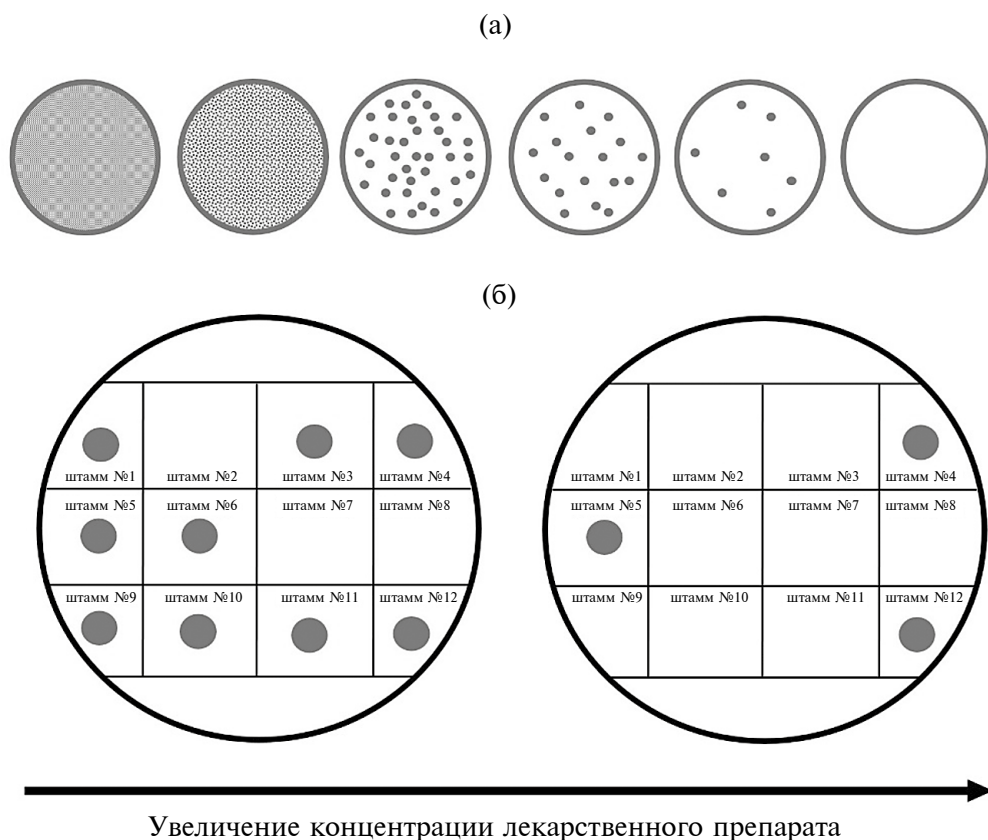


Рис. 2. Схема результатов эксперимента с использованием метода серийных разведений (а) и проверки чувствительности нескольких штаммов (б). Стрелкой показано направление увеличения концентрации лекарственного препарата, содержащегося в чашках Петри.

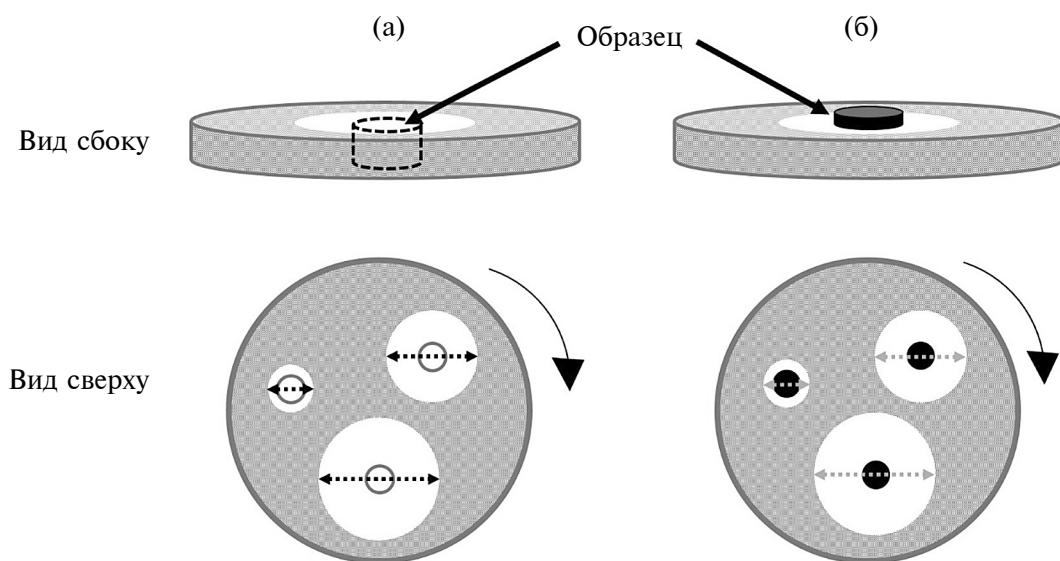


Рис. 3. Схема результатов исследования антибактериальной активности методом Кирби-Бауэра (а) и методом диффузии в агар (б). Белым цветом указаны зоны ингибирования бактериального роста. Пунктирными стрелками указаны диаметры зон ингибирования. Закругленной стрелкой указано направление увеличения концентрации лекарственного препарата в образце.

значение МИК не представляется возможным, поскольку количественно сложно оценить, сколько препарата участвовало в диффузии [19]. Метод нашел широкое применение для качественного подтверждения антибактериальной активности препаратов в случае инкапсуляции в твердые или полимерные носители, а также гели (например, металлических пластин, скаффолдов и др.) [18, 51, 52]. В этом случае не используется диск, пропитанный препаратом, а сами ЛФ помещаются на поверхность чашки Петри.

Важно отметить, что метод Кирби-Бауэра подразумевает линейную зависимость логарифма ($\lg$ или $\ln$) концентрации препарата от размера возникающей зоны ингибирования бактериального роста (радиуса или квадрата радиуса) [53, 54].

Важно отметить, что при использовании метода Кирби-Бауэра или другого варианта диффузионного метода E-test возможно возникновение отдельных колоний в зоне ингибирования роста бактерий: как по краю зоны ингибирования, так и внутри данного участка (рис. 4).

Подобный эффект наблюдали авторы [50] при исследовании свойств препарата фосфомицина на 43 штаммах *Klebsiella pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью. Авторы ссылаются на дополнительные материалы Европейского комитета по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам [55], в которых указано, что приемлемо наличие отдельных КОЕ вблизи границы зоны ингибирования. При этом диаметр зоны ингибирования необходимо измерять, не учитывая данный рост. Считается, что препарат не проявляет достаточную активность только в случае равномерного распределения КОЕ по всей предполагаемой зоне ингибирования.

В литературе часто встречается метод диффузии в агар (рис. 3), который схож с диффузионными методами. Основное отличие заключается в том, что вместо использования диска или полоски из фильтровальной бумаги, необходимо удалить фрагмент агара из твердой питательной среды диаметром 6–10 мм с нанесенной бактериальной культурой [56–59]. В полученную лунку помещают раствор исследуемого вещества и после инкубации чашек производят оценку диаметров зон ингибирования роста клеток [59–61].

Так, в работе [62] исследовали активность линалоола, нанесенного на модифицированные глутатионом наночастицы золота. Образцы в концентрации 10 мкг/мл (в пересчете на препарат) помещали в лунки диаметром 6 мм. Увеличение диаметра зон ингибирования бактериального роста *E. coli* и *S. aureus* свидетельствовало о синергетическом эффекте в проявлении антибактериальной активности ЛФ, по сравнению с компонентами линалоолом и наночастицами золота.

Выбор микробиологического метода исследования лекарственной формы. Микробиологические методы являются инструментом для доказательства наличия антибактериальных свойств ЛФ, определению приблизительного или точного значения МИК, а также чувствительности микроорганизмов к ЛФ. Методы с использованием твердой питательной среды более разнообразны по сравнению с методами исследований в жидкой среде, при этом в ряде случаев возможно определить точное значение МИК.

Наиболее удобными и быстрыми методами анализа являются метод серийных разведений в жидкой питательной среде без последующего посева, метод Кирби-Бауэра, а также метод диффузии в агар, которые позволяют одновременно

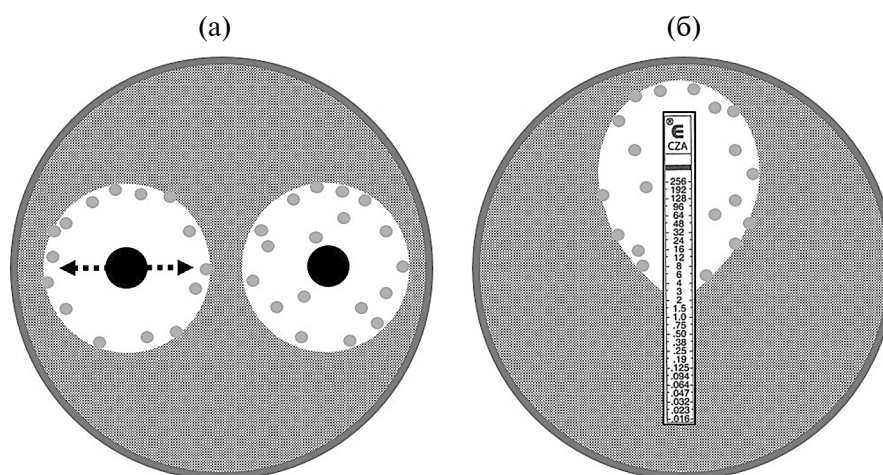


Рис. 4. Схема результатов исследования образцов методом Кирби-Бауэра (а) и E-test (б) при возникновении отдельных КОЕ в зонах ингибирования роста. Стрелкой показано корректное определение диаметра зоны ингибирования бактериального роста.

исследовать несколько концентраций препарата. Кроме того, эти методы не требуют сложной подготовки и особых лабораторных навыков, позволяют минимизировать количество используемых реактивов и материалов.

Благодаря преимуществам этих методов их чаще всего используют исследователи при изучении противомикробного действия препаратов в системах доставки лекарств (табл. 1). В литературе не представлены стратегии по выбору конкретного метода исследования для определенного типа и химической природы носителя лекарственных средств. Важно отметить, что противомикробные свойства одного и того же типа носителя, например, липосомальных форм лекарств, часто авторы предлагают исследовать по-разному: построение кривых роста бактериальной культуры с помощью спектрофотометрии с последующим высевом и подсчетом КОЕ [40], методом серийных разведений в жидких средах [63], метод диффузии в агар [64]. Только в некоторых работах используется несколько подходов к анализу системы одного типа, что будет рассмотрено далее.

Общие тенденции и предпочтения того или иного метода преимущественно связаны исключительно с агрегатным состоянием и готовой формой ЛФ, ее потенциальным способом введения в организм, а также растворимостью самого лекарственного средства, загруженного в систему доставки, и скоростью его диффузии с диска или в агаре.

Сравнение результатов определения МИК методами Кирби-Бауэра, серийных разведений в твердых средах и микрометода в жидких питательных средах для растительных экстрактов приведено в работе [65]. Показано, что в случае использования твердых сред результаты исследований сильно различаются: МИК (метод серийных разведений) в 3–20 раз ниже по сравнению со значениями МИК (Кирби-Бауэра) независимо от тестируемого образца. Кроме того, получена сходимость результатов для данных, полученных методами серийных разведений и микрометодом для грамположительных штаммов (таких как *B. cereus* и *S. aureus*), но выявлены различия в результатах для грамотрицательных бактерий. Авторы приходят к выводу, что метод Кирби-Бауэра не является предпочтительным для исследования плохо или нерастворимых в воде препаратов, поскольку гидрофобная природа препятствует их равномерному распределению в агаризованной среде. Таким образом, диффузионный метод Кирби-Бауэра не всегда может быть надежным методом скрининга антимикробной активности растительных экстрактов, но является удобным для простого и быстрого качественного подтверждения противомикробной активности ЛФ.

При сравнении результатов метода Кирби-Бауэра и метода диффузии в агар при исследовании

нафтохинона юглона, загруженного в частицы сополимера L-молочной-гликолевой кислот (ПЛГА), показано, что только при использовании второго метода наблюдались зоны ингибирования бактериального роста. Авторы связывают этот эффект с различием в концентрации биологически активного компонента, необходимой для проведения анализа, а также присутствием носителя, который влияет на коэффициент диффузии ЛФ [66].

Выбор именно твердой питательной среды для проведения исследований обусловлен высоким содержанием воды и отсутствием значительного конвективного потока, что позволяет агарозному гелю имитировать ткань в месте имплантации [67]. Для изучения диффузии препарата в таких условиях исследователи насыщали растворами антибактериального препарата (ванкомицина или ципрофлоксацина) функционализированный полимером гидроксиапатит в форме диска. Далее материал помещали в агар методом поэтапной заливки чашки Петри, чтобы в итоге образец оказался полностью погружен в твердую среду. В течение нескольких дней проводили удаление фрагментов агара стеклянной трубкой диаметром 5 мм на различном расстоянии от ЛФ, после чего анализировали содержания лекарственного препарата в этом фрагменте. За первые 3 ч инкубации препарат обнаружен только на расстоянии 1 см от материала (10 мкг/г агара для ципрофлоксацина и 50 мкг/г агара для ванкомицина). На данном расстоянии с течением времени наблюдали увеличение концентрации вещества с достижением максимальных значений через 48–96 ч инкубации. Максимальное расстояние, которое преодолел препарат, составило 5 см при инкубации до 264 ч. Таким образом, при проведении экспериментов с использованием твердых сред высвобождение лекарства из носителя и диффузия препарата в среду являются важными показателями, которые оказывают влияние на диаметры зон ингибирования бактериального роста.

Исследования свойств ЛФ в жидких питательных средах также часто используется в экспериментах (табл. 1). Такой подход наиболее интересен с точки зрения анализа кинетики антибактериальной активности, в том числе и пролонгированного противомикробного действия, что будет подробнее рассмотрено далее.

Исследование антибактериальной активности летучих препаратов в литературе почти не встречается. Нет сведений по оценке антибактериальной активности именно газообразной фракции, что особенно актуально с точки зрения ингаляционных форм препаратов. Интересный подход к быстрому и высокоинформативному анализу подобных систем предложили авторы работы [68], в которой исследовали ряд растительных компонентов на *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* и *S. pneumoniae*. Исходная процедура представляла

Таблица 1. Примеры систем доставки лекарств различной химической природы и методов исследования антибактериальной активности лекарственных форм

Лекарственный препарат	Система доставки	Микроорганизм	Метод исследования <i>in vitro</i>	Основные результаты исследования <i>in vitro</i>	Ссылка
5-фторурацил	Наночастицы карбоксиметилхитина с Ca^{2+} и Fe^{3+}	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Метод серийных разведений (с высевом)	Показана антибактериальная активность в системе доставки. Концентрационный эффект	[26]
Линалоол	Нановолокна на основе различных производных циклодекстринов	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> ATCC 10536	Метод серийных разведений (с высевом)	Показана антибактериальная активность в системе доставки. Наибольшую противомикробную активность (на 10–20% больше по сравнению с другими образцами) на обоих штаммах продемонстрировал линалоол, загруженный в нановолокна из 2-гидроксипропил γ -циклодекстрина	[43]
Кларитромицин	Наночастицы ПЛГА	<i>E. coli</i> PTCC 1330, <i>Haemophilus influenzae</i> PTCC 1623, <i>Salmonella typhi</i> PTCC 1609, <i>S. aureus</i> PTCC 1112, <i>Streptococcus pneumoniae</i> PTCC 1240	Метод диффузии в агар	Загрузка антибиотика в частицы ПЛГА усиливала антибактериальное действие препарата на грамположительных бактериях	[61]
Азитромицин	Наночастицы ПЛГА	<i>Salmonella typhi</i> PTCC 1609	Метод серийных разведений (без высева)	Снижение МИК азитромицина в 8 раз	[23]
14 препаратов	Наночастицы ZnO	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Метод Кирби-Бауэра	Антибактериальная активность ципрофлоксацина увеличивалась в присутствии наночастиц ZnO на 22–25%. Для амоксицилина, ванкомицина, бензилпенициллина наблюдалось снижение противомикробного действия на 10–36% на <i>S. aureus</i> . Для тетрациклина и клиндамицина отсутствует влияние ZnO на свойства препаратов	[102]
Ципрофлоксацин	Гидрогель из фибрина	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27352	Метод диффузии в агар	При высвобождении из фибринового гидрогеля, ципрофлоксацин сохранял свою эффективность, сравнимую с действием свободного препарата	[103]
Куркумин	Альгинатные микросферы	<i>S. aureus</i> ATCC 12600, <i>E. coli</i> ATCC 25922	Метод диффузии в агар	Микросферы, загруженные куркумином, оказывали выраженное противомикробное действие только на <i>S. aureus</i>	[27]
Хлоргексидин	Пленки из крахмала	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Метод Кирби-Бауэра	Пленки, загруженные хлоргексидином проявляли антибактериальное действие	[104]

Примечание. Для всех ЛФ антибактериальное действие не изучалось более 48 ч.

собой классический микрометод серийных разведений: в 96-луночный планшет помещали 100 мкл бактериальной культуры вместе с препаратом. Для оценки потенциального действия газообразной фракции авторы вносили по 30 мкл агаризованной среды в отверстия в крышке напротив каждой лунки и высевали по 5 мкл культуры, далее планшет накрывали крышкой и плотно зажимали конструкцию во избежание контаминации. Далее посредством окраски клеток оценивали ингибирование роста клеток на твердой среде.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛФ

Анализ литературных источников, рассмотренных в обзоре, показал, что инкапсуляция препарата в систему доставки не изменяет механизм действия антибактериального препарата. Однако система доставки лекарств придает готовой ЛФ новые свойства, которые не были характерны для самого препарата, что может оказывать выраженное влияние на наблюдаемую антибактериальную активность, как правило, в сторону улучшения противомикробных свойств. Считается, что такой результат является следствием ряда факторов, которые можно в общем случае подразделить на два ключевых механизма: вклад носителя лекарства в проявление его свойств и выраженное изменение физико-химических свойств лекарственной молекулы вследствие инкапсуляции, например, образование ЛФ может способствовать снижению МИК на 60–70%, что показано в [44, 69].

Влияние носителя лекарств на клеточную стенку бактерий. Поскольку система доставки чаще всего имеет более крупный размер, чем сама молекула лекарственного препарата, то особую роль в антибактериальной активности может сыграть взаимодействие носителя препарата с бактериальной клеткой. Поверхность бактерий представляет собой сложно устроенную многокомпонентную систему, которая имеет различный состав в зависимости от штамма микроорганизма. Основным механизмом взаимодействия между носителем лекарственного препарата и поверхностью бактериальных клеток является адсорбция частиц на клетках [70].

Адсорбция частиц может оказывать воздействие на состояние клеточной стенки бактерий и приводить к их гибели, то есть сам носитель лекарственной молекулы в системе доставки может проявлять противомикробное действие и в отсутствии антибактериального препарата. Этот фактор необходимо учитывать при исследовании ЛФ *in vitro*. Например, широко известны противомикробные свойства различных форм хитозана [71]. Также продемонстрирована концентрационная зависимость антибактериальных свойств наночастиц, полученных посредством сшивания карбок-

симетилхитина хлоридами кальция и железа (III), на *S. aureus* ATCC 25923 [26].

С точки зрения механизма противомикробного действия известно, что катионные полимеры различной химической структуры обуславливают возникновение разрывов и/или дефектов в клеточной стенке и мембранах клетки (в случае грамотрицательных клеток как внутренней, так и внешней) и высвобождение компонентов цитоплазмы, нарушение процессов метаболизма и клеточного деления [70].

Наиболее простым экспериментальным методом для подтверждения значительных изменений в проницаемости клетки является спектрофотометрия. Например, в работе [72] исследовали противомикробную активность поли(пропиленминовых) дендримеров, функционализированных четвертичным аммонием на *E. coli* ATCC 25922, нескольких рекомбинантных штаммах *E. coli* и *S. aureus* Newman. Наличие разрывов в клеточной стенке может способствовать появлению во внешнем растворе биомолекул различной природы, в частности, нуклеиновых кислот, которые удобно детектировать по интенсивности сигнала 260 нм. Авторы добавляли дендример к клеткам и следили за спектром поглощения супернатанта через определенные промежутки времени. В случае *E. coli* TV1048 наблюдалось увеличение интенсивности сигнала при 260 нм (до 20%) относительно контроля и достижение плато, а в случае золотистого стафилококка наблюдали монотонное увеличение сигнала. По-видимому, поскольку *S. aureus* не имеет внешней мембраны, которая является дополнительным барьером для клетки, то с течением времени количество высвобождаемого материала постепенно увеличивается.

Помимо нуклеиновых кислот также возможно детектировать белки, которые были экстрагированы из клеточной стенки или из цитоплазмы, посредством анализа внешнего раствора методом УФ-спектроскопии. Полоса поглощения при 280 нм, характерная для белков, может перекрываться с полосой 260 нм, поэтому авторы [73] предлагают дополнительно вносить во внешний раствор краситель Кумаси и следить за интенсивностью сигнала при 595 нм. Этот метод показал, что растительные полифенолы флавоноиды вызывают высвобождение белков из *E. coli* ATCC 25922, причем выраженность данного явления сильно зависела от структуры биологически активной молекулы, так как эффект усиливался в ряду кемпферол > гесперетин > (+)-катехин гидрат > биоханин А.

Таким образом, спектрофотометрия позволяет определить наличие нуклеиновых кислот и белков во внешнем растворе, установить возникновение серьезных дефектов в клетке. Однако не стоит забывать, что применение спектрофотометрии возможно при определенных условиях (концен-

трации искоемых веществ должна быть достаточной для детекции, обязательное наличие контрольного образца и др.), поэтому для подтверждения экспериментальных данных полезно сочетание различных методов исследования.

Для комплексного анализа одновременного присутствия нескольких типов биомолекул в системе особое место занимает метод ИК-спектроскопии (или ИК-спектроскопии Фурье) с анализом жидких образцов. ИК-спектроскопия позволяет получить больше информации и о самих бактериальных клетках, поскольку в спектре наблюдаются полосы, соответствующие нуклеиновым кислотам, фосфолипидам ($1200\text{--}900\text{ см}^{-1}$), белкам ($1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$), углеводам ($1100\text{--}1000\text{ см}^{-1}$) и др. Следует отметить, что для разных штаммов ИК-спектры различаются по положению и структуре основных полос поглощения, а также известны различия при сравнении спектров грамотрицательных и грамположительных бактерий (полосы поглощения 1057 , 1085 и 1117 см^{-1} , соответствующие преимущественно углеводным фрагментам биомолекул) [74, 75].

Однако использование только ИК-спектроскопии для анализа противомикробной активности, определения значения МИК в литературе не встречается, по-видимому, вследствие сложности анализа полос поглощения и возможных изменений под действием ЛФ. При анализе супернатанта для детекции белков и нуклеиновых кислот под воздействием носителей лекарств применение ИК-спектроскопии также не встречается, из-за низкой концентрации компонентов. В основном ИК-спектроскопия используется для анализа отдельных штаммов или в качестве дополнительного метода анализа.

Влияние ЛФ на проницаемость клеточной мембраны удобно исследовать посредством использования липосом, которые являются моделью клеточного бислоя. При изучении взаимодействия ЛФ с везикулами можно детектировать экстракцию липидов из липосом, изменение проницаемости мембраны и распределения липидов в бислое, а также возникновение дефектов и/или разрывов в везикулах. Последнее приводит к уменьшению размеров липидных частиц и высвобождению красителя или ионов солей, предварительно загруженных в липосомы. Оба процесса удобно детектировать с помощью доступных инструментальных методов.

Важно отметить, что бактериальная клеточная стенка устроена значительно сложнее, чем липосомальный бислой, поэтому проведение исследований исключительно на везикулах недостаточно. Как правило, изменения, наблюдаемые в случае использования липосом, более выражены за счет большей доступности липидов для взаимодействия с ЛФ, в то время как для клеточных мембран данному взаимодействию мешают поверхностные

структуры (белки, полисахариды и др.). Тем не менее, не все эффекты, характерные для системы липосомы-ЛФ, наблюдаются для бактериальных клеток в присутствии ЛФ, например, пиноцитоз, рецепторный захват клетками и др. [70]

Для определения способности носителя влиять на проницаемость клетки после инкубации клеток с интересующей молекулой необходимо провести анализ внешнего раствора методом УФ-спектроскопии в диапазоне $230\text{--}300\text{ нм}$ и сравнить результаты с контролем. Отсутствие изменений в интенсивности и структуре полосы, скорее всего, указывает на отсутствие антибактериальных свойств носителя, что было подтверждено с помощью метода диффузии в агар в [76]. В работе рассмотрены анионные полимеры, полученные на основе метил- или 2-гидроксипропил β -циклодекстрина. Установлено, что полимеры в концентрации до 2 мг/мл не оказывали антимикробного действия против клеток *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis* ATCC 6633, а также не вызывали выраженных дефектов клеточных барьеров бактерий.

Важно отметить, что в случае катионных носителей антибактериальный эффект ожидаем, поскольку поликатионы способны вытеснять ионы кальция и магния из поверхностных слоев бактериальных клеток и впоследствии связываться с отрицательно заряженными функциональными группами клеточной стенки. Полианионы из-за своего заряда адсорбируются на бактериальных клетках в меньшей степени, чем положительно заряженные или нейтральные частицы [58, 77, 78], что может приводить к отсутствию выраженного антимикробного эффекта. В литературе встречаются данные об антибактериальных свойствах полианионов, чаще всего пептидов [79], тем не менее, систематических исследований противомикробного действия полианионов и механизма их действия не проводилось. Таким образом, поликатионы имеют явное преимущество, как вещества с известным выраженным противомикробным действием.

Следует отметить, что в присутствии комбинации полианионов различной химической природы (гексафосфата, этилендиаминтетраацетата и др.) и антибактериального препарата наблюдается выраженное увеличение действия лекарства. Считается, что увеличение чувствительности бактерий к препарату может быть обусловлено удалением ионов кальция и магния из клеточных поверхностных слоев вследствие взаимодействия с полианионами. Снижение концентрации катионов может приводить к дестабилизации поверхностных структур микроорганизма, что облегчает транспорт лекарственных молекул внутрь клетки [59, 80].

Такой эффект можно использовать при разработке систем доставки лекарств. Так, авторы [61] предложили использовать ПЛГА в качестве

носителя антибиотика кларитромицина. Инкапсулированный препарат продемонстрировал увеличение антибактериального эффекта в 2–4 раза на 5 различных штаммах (метод диффузии в агаре), при этом наиболее выраженный эффект наблюдается для клеток *S. aureus*, что может быть связано с менее выраженной барьерной функцией грамположительных клеток. Более высокую чувствительность грамположительных клеток к препаратам и ЛФ отмечают и авторы [27] при исследовании альгинатных микросфер, загруженных куркумином.

Микроскопические методы исследования взаимодействия носителя с бактериальными клетками. Визуализацию взаимодействия носителей с грамположительными и грамотрицательными клетками можно осуществить с помощью микроскопических методов анализа. В частности, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) является удобным инструментом для детекции живых, мертвых и делящихся клеток, а также анализа изменений в клеточной стенке бактерий: дефектов и/или разрывов во внутренней и/или внешней мембране, отделение клеточной стенки от клетки, образование выростов и пузырьков на поверхности бактерий, определения морфологических изменений содержимого цитоплазмы, а также потерь клеточного содержимого и агрегации [42, 81, 82].

В работе [83] получены полимерсомы на основе диблоксополимера из метоксиполиэтиленгликоля и полимолочной кислоты. Частицы содержали ампициллин в гидрофильной части и наночастицы серебра в гидрофобной части полимерсомы. ЛФ добавляли к *E. coli* в различных концентрациях относительно лекарственного препарата и инкубировали в течение 25 ч с периодическим измерением оптической плотности растворов при 600 нм. Следует отметить, что для полимерсом наблюдался синергический эффект (при сравнении с действием ампициллина в свободном виде, полимерсом с ампициллином или отдельно наночастиц серебра) при изучении антибактериального эффекта на бактериях *E. coli*, имеющих ген устойчивости к ампициллину. Таким образом, системы доставки могут сохранять антибактериальный эффект в случае резистентных штаммов.

Некоторые образцы клеток с полимерсомами подвергали многоэтапной процедуре фиксации, дегидратации и контрастирования для исследования методом ПЭМ. На полученных микрофотографиях бактериальных клеток, инкубированных с полимерсомами, наблюдалась выраженная агрегация белков и множественные изменения морфологии клеточной стенки, что указывало на выраженный антибактериальный эффект ЛФ. Кроме того, метод ПЭМ позволяет визуализировать адсорбцию системы доставки на поверхности клеток, поскольку полимерсомы из-за присутствия неорганических металлических частиц представ-

ляют собой хорошо различимые черные точки. Показано, что наночастицы серебра адсорбируются на всей поверхности клеточной стенки, при этом ориентированы перпендикулярно мембране *E. coli*, что указывает на преимущественно гидрофобные взаимодействия частиц с внешней мембраной клетки.

При использовании носителей органической природы фиксация и исследование взаимодействия ЛФ с бактериальной поверхностью может быть затруднена. Кроме того, из-за сложной пробоподготовки частицы могут десорбироваться с поверхности бактерий. Так, ранее было исследовано влияние полимеров на основе циклодекстрина на *E. coli* JM109, *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 и *B. subtilis* ATCC 6633 методом ПЭМ [30, 84]. На микрофотографиях срезов не было обнаружено частиц, а только бактериальные клетки. Для улучшения визуализации ЛФ было предложено проводить предварительную инкубацию частиц с ионами меди, а для визуализации адсорбции полимеров на бактериях проводить непосредственно высушивание образца на подложке без фиксации. При такой пробоподготовке на микрофотографиях клетки представляют собой темные “отпечатки” овальной формы в случае *E. coli* и *L. fermentum* и вытянутой формы восьмерки в случае *B. subtilis*. Инкубация в течение 1 ч клеток бактерий в присутствии ионов двухвалентной меди не приводила к визуальным изменениям формы клеток, однако частицы, контрастированные ионами металла, приобретали темный цвет, что позволило детектировать их присутствие в образце. На микрофотографиях всех бактерий, которые инкубировались с подготовленным полимером, была обнаружена адсорбция полимера на поверхности клеток. При этом селективность по отношению к конкретной клеточной структуре не обнаружена, но наблюдалась агрегация частиц, а в ряде случаев полимер полностью “обволакивал” клетки.

Важно отметить, что адсорбция ЛФ на поверхности клеток могла быть фактором усиления антибактериальной активности лекарств, поскольку носитель облегчает поиск мишени лекарством, т.е. возможна реализация высокой локальной концентрации лекарственного препарата.

Часто результаты ПЭМ дополняются исследованиями микроорганизмов с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), которая позволяет детально визуализировать поверхность клеток. Так, можно подтвердить адсорбцию частиц на поверхности клеточной стенки [42, 85], а также возникновение деформации и агрегации клеток микроорганизмов [62, 86, 87]. С помощью метода СЭМ также возможно оценить адсорбцию бактериальных клеток на ЛФ, что особенно важно для анализа возможного развития инфекции в месте локализации импланта. Так, для исследования роста и распространения бактерий непосредственно

на носителе лекарства в работе [41] ЛФ исследованы методом СЭМ после выдерживания в бактериальной культуре. Показано, что ванкомицин, загруженный в поли-ε-капролактон, полностью препятствует прикреплению и размножению *S. aureus* ATCC 25923 на поверхности скаффолда, а на СЭМ изображениях образцов, которые инкубировали с *E. coli* ATCC 25922, наблюдалось выраженное уменьшение количества “сидячих” бактерий.

СЭМ позволяет также исследовать формирование биопленок. Например, в работе [88] исследовали влияние куркумина, загруженного в наночастицы серебра на формирование биопленок *P. aeruginosa* ATCC 14886, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* ATCC 9144. Для этого в 96-луночный планшет на дно лунок помещались кусочки стерильных покровных стекол, далее вносили бактериальную культуру и ЛФ куркумина. После инкубации клеток проводили промывку стекол от “несвязавшихся” бактерий, их фиксацию 2%-ным раствором глутарового альдегида и последующее обезвоживание в присутствии этанола. Согласно СЭМ-изображениям в присутствии ЛФ наблюдалось меньшее количество клеток, чем в контроле, что указывает на способность ЛФ предотвращать образование биопленки у некоторых штаммов бактерий.

Тем не менее, дифференциация живых и мертвых клеток методом СЭМ невозможна. Для количественной характеристики живых микроорганизмов используется флуоресцентная спектроскопия. Для этого проводят окрашивание биопленок, полученных аналогично методике, рассмотренной выше, флуоресцентными красителями (например, Syto9 и пропидий йодид). Зеленая флуоресценция будет указывать на жизнеспособные бактериальные клетки, красная — на погибшие клетки. Так, в работах по изучению влияния частиц оксида цинка на ряд грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов показано, что ЛФ способствует уменьшению общего количества клеток в пленке, а также значительному увеличению числа мертвых клеток.

Общее количество клеток и изменения в формировании биопленки можно оценить и с помощью классической оптической спектроскопии, для чего в работах проводят окрашивание бактерий на предметных стеклах с помощью кристаллического фиолетового. Изображения получают посредством светового микроскопа при 40-кратном увеличении. При выдерживании образцов клеток в акридиновом оранжевом возможно получение изображений более высокого разрешения с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM). Эти методы подтверждают результаты флуоресцентной спектроскопии: в присутствии оксида цинка структура

биопленок была менее плотной и более тонкой по сравнению с контрольным образцом [89, 90].

Атомная силовая (АСМ) и сканирующая зондовая микроскопия являются особенными инструментальными методами, поскольку позволяют детально исследовать поверхность бактериальных клеток, тонкую структуру клеточной стенки, белковые выросты на поверхности клеток и др. [91].

Авторы работы [92] предложили новый π-катионный полиэлектролит (поли{[2,5-бис(2-(N,N,N-триэтиламоний)этоксид)-1,4-фенилен]-1,4-фенилен}) в качестве потенциального антибактериального средства, который также можно использовать и в качестве носителя. В работе были изучены морфологические и механические изменения клеточной стенки *E. coli* дикого типа и штамма, устойчивого к ампициллину. Под действием полиэлектролита наблюдалась агрегация обоих штаммов, как в параллельных, так и в перпендикулярных плоскостях относительно подложки. Авторы также исследовали влияние полиэлектролита на механические свойства клеточной поверхности посредством построения и анализа карты распределения модуля Юнга. Показано, что поверхность клеток, после обработки полимером, была менее жесткой, чем у необработанных клеток. Снижение жесткости может быть связано с возникновением дефектов в клеточной стенке. Действительно, авторы наблюдали постепенное увеличение шероховатости поверхности клеток (RSM параметра — стандартного отклонения всех значений высот в пределах выбранной области) при увеличении концентрации полимера. Данные эффекты подтверждаются и другими признаками деформации клеточной стенки: возникновением везикулярных или мицеллярных образований размерами ~ 100 нм на поверхности или вблизи клеток.

Аналогичные изменения в шероховатости поверхности *E. coli* EB1-1 были отмечены в работе [93] при исследовании мицелл на основе полилактида-поли (этиленгликоля)-полиэтиленimina, загруженного тетрациклином. Установлено, что после обработки ЛФ бактерии начали “сплющиваться”, что привело к резкому увеличению среднеквадратичного значения (RMS) бактерий (138.600 нм), при этом данное изменение было значительно больше, чем в образце, который инкубировали со свободным тетрациклином (76.038 нм). Авторы связали увеличение шероховатости поверхности с результатом выделения некоторых внутриклеточных компонентов.

Новым комплексным подходом к исследованию бактериальных клеток относится комбинирование атомно-силовой микроскопии и ИК-спектроскопии (АСМ-ИК), благодаря которому, становится возможно одновременно определять физические свойства и химический состав образца с наноразмерным разрешением [94]. На сегодняш-

ний день в литературе не встречаются работы по исследованию ЛФ с помощью такого подхода, однако ценность потенциальных результатов делает АСМ-ИК очень перспективным методом для исследования влияния ЛФ на бактериальные клетки. Например, с помощью АСМ-ИК следили за образованием телец включения в штаммах *E. coli* под действием различных факторов стресса: теплового шока, добавления солей тяжелых металлов, пероксида водорода или пептидов, усиливающих агрегацию эндогенных белков. В общей сложности в этой работе рассмотрены данные АСМ-ИК по двум волновым числам, соответствующим колебаниям амидной связи, для 12030 клеток, содержащих 3539 телец включения, и 1343 спектра. Анализ полученных спектров позволил определить конкретный тип стресса, примененного к клеткам, как в спектральном режиме, так и в режиме визуализации, но не позволил выявить каких-либо изменений свойств телец в течение двухчасового периода восстановления после теплового шока [95].

Таким образом, исследование ЛФ микроскопическими методами анализа не дает количественного результата по определению антибактериальной активности ЛФ (например, МИК), однако визуализация микроорганизмов позволяет получить дополнительную информацию о взаимодействии ЛФ с клетками, влиянии ЛФ на формирование биопленки, а также сделать вывод о механизме действия ЛФ (возникновение дефектов и/или разрывов в мембране, изменениях клеточного содержания и др.).

Исследование пролонгированного антибактериального действия препарата. Важно отметить, что инкапсуляция лекарственных молекул в систему доставки, как правило, обуславливает замедленное высвобождение препарата из ЛФ, то есть может придавать системе длительное антибактериальное воздействие. Пролонгированное действие может способствовать поддержанию концентрации препарата на необходимом уровне для достижения эффективной терапии, снижению дозировки и количества инъекций/приема препарата, а также уменьшению вероятности возникновения побочных эффектов. Такие системы являются особенно востребованными для разработки высокоэффективных ЛФ перорального и парентерального применения, а также покрытий имплантатов [96–98]. В литературе описаны ЛФ с замедленным высвобождением препарата от нескольких часов до 50 сут в модельных условиях [43, 67, 99].

Обычно в жидких средах проводят исследования кинетики роста микроорганизмов в присутствии ЛФ с детектированием оптической плотности в течение не более 24 ч. Так, с помощью данного подхода исследовали свойства тимола, загруженного в пленки из полипропилена или полиэтилена низкой плотности в течение 12 ч [100] и белковых

нановолокон с инкапсулированным куркумином в течение 28 ч [101].

Следует отметить, что основные методы исследования противомикробных свойств *in vitro*, описанные выше, как правило, проводятся в течение 12–24 ч. За это время некоторые ЛФ могут высвобождать только небольшую часть лекарственного препарата. Например, инкапсуляция фторхинолонов методом темплатного синтеза (введение лекарственной молекулы до введения линкера в систему) позволяет получить наночастицы, которые могут высвобождать от 4 до 20% биологически активного вещества за первые 24 ч [78].

Таким образом, зависимость антибактериальной активности от времени является важным инструментом для оценки пролонгированности потенциального действия ЛФ *in vivo*. Для исследования противомикробных свойств ЛФ более 24–48 ч существует два основных подхода: анализ пробы высвобожденной порции препарата в модельных условиях или длительная инкубация клеток с ЛФ.

Первый способ с использованием твердых питательных сред предложен в работе [52]. Авторы модифицировали поверхность гидроксиапатита, нанесенного на титановый материал, полимером на основе метил β-циклодекстрина и линкера 1,2,3,4-бутанететракарбоновой кислоты с целью разработки покрытия для имплантов с высокой сорбционной емкостью по отношению к лекарственным средствам. Полученный материал держивали в растворах препаратов рифампицина и/или тобрамицина, далее инкубировали в растворе фосфатного буфера при 37°C. Через определенные промежутки времени внешний раствор, содержащий высвобожденный препарат/ы, а также ЛФ, исследовали методом Кирби-Бауэра на *S. aureus* CIP224 и *Enterobacter cloacae* iR129i2B, часто встречающихся возбудителях инфекций при протезировании. Таким образом, оценивалась как активность свободного препарата, оставшегося в материале на протяжении 21–24 сут на основе анализа диаметров зон ингибирования бактериального роста.

Показано, что за 30 мин высвобождалось достаточное количество препарата/ов для проявления выраженной противомикробной активности. Однако при более длительном временном промежутке в случае *E. cloacae* наблюдалось снижение диаметров зон ингибирования роста в 2 и 4 раза за 1 и 7 сут соответственно, на среде с *S. aureus* зоны ингибирования роста и вовсе отсутствовали уже через 6 ч инкубации материала.

Важно отметить, что исследование антибактериальной активности проводилось ежедневно на бактериальной культуре, которая находилась в одной и той же фазе роста. Такой подход можно рассматривать, например, для пероральных ЛФ

для оценки системного действия в заданном временном интервале. В случае контакта ЛФ с местом инфекции, как в случае покрытий имплантов, можно провести оценку пролонгированного антибактериального действия образца в динамике роста микроорганизмов (в течение нескольких дней).

В работах [58, 84] предложена методика для исследования антибактериальной активности ЛФ: в течение 7–8 дней. Ночную культуру *E. coli* JM109 или *E. coli* МН1 разбавляли в 2 раза свежей питательной средой и вносили раствор ЛФ. Далее образцы инкубировались в течение недели при 37°C при активном перемешивании и с периодическим отбором аликвот для анализа. Было установлено, что для сохранения нормальной морфологии клеточного содержимого за столь длительный промежуток времени необходимо, чтобы концентрация препарата была близка к МИК. Более высокие концентрации (~ больше 10 МИК) приводили к быстрой гибели всех микроорганизмов, что не позволяло исследовать противомикробные свойства более 24–48 ч, а, следовательно, и оценить пролонгированное антибактериальное действие.

При анализе нековалентных комплексов моксифлоксацина с сульфобутиловым эфиром β -циклодекстрина, установлено усиление противомикробного действия на 15–20% в течение первых 4 сут для обоих штаммов *E. coli*. При инкапсуляции моксифлоксацина в наночастицы на основе циклодекстрина продемонстрировано увеличение антибактериальной активности до 12 раз на 3 сут и до 2 на 7 сут. Важно отметить, что для наночастиц с крайне медленным высвобождением препарата (около 20% за 7 сут) данный эффект не наблюдается [58, 84].

ЛФ с выраженным усилением противомикробной активности и пролонгированным антибактериальным действием являются перспективными для разработки препаратов с меньшей дозировкой.

Подводя итог, можно заключить, что не существует регламентированной методики для изучения, как пролонгированного антибактериального действия самого препарата, так и его ЛФ. Кроме того, в литературе не встречаются исследования по поиску корреляции между степенью замедления высвобождения лекарства из ЛФ в модельных условиях, антибактериальной активностью ЛФ и *in vitro* антибактериальной активностью. Такие исследования необходимы для более грамотной разработки новых ЛФ с заданными свойствами на этапе дизайна соответствующего носителя.

Разработка систем доставки лекарств является активно развивающейся областью, которая открывает новые возможности для получения высокоэффективных ЛФ различных препаратов, в том числе антибактериальных веществ. Для потенциального практического использования и дальнейшего изу-

чения наиболее перспективных ЛФ помимо дизайна структуры и исследования физико-химических свойств предложенной системы необходим анализ противомикробных свойств *in vitro*.

Среди множества существующих методик исследования антибактериальной активности для качественного и количественного (МИК) определения свойств ЛФ следует руководствоваться их растворимостью, агрегатным состоянием и формой, предполагаемым способом введения в организм, а не химической природой носителя. Наблюдаемые различия между противомикробными свойствами ЛФ и самим препаратом наиболее выражены в случае жидких питательных сред, поскольку для твердых питательных сред наблюдаются ограничения по времени проведения эксперимента и возможны трудности, связанные с диффузией ЛФ и лекарственных молекул.

Наиболее часто используется метод разведений в жидкой питательной среде с или без последующего посева для липосом, мицелл, органических полимеров и других частиц. При этом количество КОЕ анализируют при посеве каждой точки на отдельную чашку Петри или полуколичественно — методом точечного анализа. Для твердых носителей лекарств (скаффолды или покрытия имплантов) преимущественно используется метод Кирби-Бауэра.

Несмотря на то, что инкапсуляция препарата в систему доставки не оказывает влияния на механизм действия препарата, носитель может в значительной степени влиять на свойства лекарственного препарата *in vitro*, например, способствовать проявлению более выраженного противомикробного действия, придавать системе пролонгированный антибактериальный эффект, а также адсорбироваться на носителе, что создает высокую локальную концентрацию препарата. Для выявления различных аспектов взаимодействия можно использовать разнообразные микроскопические методы, такие как оптическая и конфокальная микроскопия, флуоресцентная микроскопия (ПЭМ, СЭМ и АСМ), которые позволяют наглядно наблюдать возникновение дефектов и/или разрывов в клеточной стенке, изменения в шероховатости клеточной поверхности и др.

Комплексный подход к изучению свойств разрабатываемых систем доставки лекарств позволит более тщательно отбирать наиболее перспективные антибактериальные ЛФ, что оправданно с точки зрения последующих длительных дорогостоящих испытаний.

На сегодняшний день анализ свойств ЛФ *in vitro* становится многосторонним комплексным подходом, который требует уверенных навыков в различных областях: преимущественно микробиологии, а также спектроскопии, микроскопии и др.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам (лауреат А.А. Скуредина).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Damian F., Harati M., Schwartzenhauer J., Van Cauwenberghe O., Wettig S.D.* // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 2. P. 214.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020214>
2. *Pradal J.* // *J. Pain Res.* 2020. V. 13. P. 2805–2814.
<https://doi.org/10.2147/JPR.S262390>
3. *Veiga M.-D., Ruiz-Caro R., Martín-Illana A., Notario-Pérez F., Cazorla-Luna R.* // *Polymer Gels*. 2018. P. 197–246.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6083-0_8
4. *Adepu S., Ramakrishna S.* // *Molecules*. 2021. V. 26. № 19. P. 5905.
<https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
5. *Sultana A., Zare M., Thomas V., Kumar T.S.S., Ramakrishna S.* // *Med. Drug Discov.* 2022. V. 15. P. 100134.
<https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>
6. *Shirley M.* // *Drugs*. 2019. V. 79. № 5. P. 555–562.
<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01095-z>
7. *Adler-Moore J., Proffitt R.T.* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. V. 49. P. 21–30.
https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.21
8. *Liu P., Chen G., Zhang J.* // *Molecules*. 2022. V. 27. № 4. P. 1372.
<https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
9. *Park H., Otte A., Park K.* // *J. Control. Release*. 2022. V. 342. P. 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>
10. *Gao W., Chen Y., Zhang Y., Zhang Q., Zhang L.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. V. 127. P. 46–57.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.015>
11. *Devnarain N., Osman N., Fasiku V.O., Makhathini S., Salih M., Ibrahim U.H. et al.* // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2021. V. 13. № 1.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1664>
12. *Zhang W., Hu E., Wang Y., Miao S., Liu Y., Hu Y. et al.* // *Int. J. Nanomedicine*. 2021. V. 16. P. 6141–6156.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S311248>
13. *Mohapatra A., Harris M.A., LeVine D., Ghimire M., Jennings J.A., Morshed B.I. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2018. V. 106. № 6. P. 2169–2176.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34015>
14. *Eskitoros-Togay Ş.M., Bulbul Y.E., Tort S., Demirtaş Korkmaz F., Acartürk F., Dilsiz N.* // *Int. J. Pharm.* 2019. V. 565. P. 83–94.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.073>
15. *Güncüm E., Bakırel T., Anlaş C., Ekici H., Işıklan N.* // *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2018. V. 41. № 4. P. 588–598.
<https://doi.org/10.1111/jvp.12505>
16. *Que Y., Yang Y., Zafar H., Wang D.* // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.993095>
17. *Abou Assi R., M. Abdulbaqi I., Seok Ming T., Siok Yee C., A. Wahab H., Asif S.M. et al.* // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. № 11. P. 1052.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111052>
18. Методические Указания. 2004. № ББК 52.64. 1–91 p.
19. *Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K.* // *J. Pharm. Anal. Elsevier*, 2016. V. 6. № 2. P. 71–79.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
20. *Li J., Rong K., Zhao H., Li F., Lu Z., Chen R.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013. V. 13. № 10. P. 6806–6813.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7781>
21. *Guo L., Gong S., Wang Y., Sun Q., Duo K., Fei P.* // *Foodborne Pathog. Dis.* 2020. V. 17. № 6. P. 396–403.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2713>
22. *Ando Y., Miyamoto H., Noda I., Miyaji F., Shimazaki T., Yonekura Y. et al.* // *Biocontrol Sci.* 2010. V. 15. № 1. P. 15–19.
<https://doi.org/10.4265/bio.15.15>
23. *Mohammadi G., Valizadeh H., Barzegar-Jalali M., Lotfipour F., Adibkia K., Milani M. et al.* // *Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V.*, 2010. V. 80. № 1. P. 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.027>
24. *Mostafa A.A., Al-Askar A.A., Almaary K.S., Dawoud T.M., Sholkamy E.N., Bakri M.M.* // *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. V. 25. № 2. P. 361–366.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
25. *Liu X., Cai J., Chen H., Zhong Q., Hou Y., Chen W. et al.* // *Microb. Pathog.* 2020. V. 141. P. 103980.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103980>
26. *Dev A., Mohan J.C., Sreeja V., Tamura H., Patzke G.R., Hussain F. et al.* // *Carbohydr. Polym.* 2010. V. 79. № 4. P. 1073–1079.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.038>
27. *Uyen Thanh N., Abdul Hamid Z., Thi L., Ahmad N.* // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020. V. 58. P. 101796.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101796>
28. *Chao Y., Zhang T.* // *Langmuir*. 2011. V. 27. № 18. P. 11545–11553.
<https://doi.org/10.1021/la202534p>

29. Naveed M., Tianying H., Wang F., Yin X., Chan M.W.H., Ullah A. et al. // *Curr. Res. Biotechnol.* 2022. V. 4. P. 290–301.
<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.06.002>
30. Skuredina A.A., Tychinina A.S., Le-Deygen I.M., Golyshev S.A., Kopnova T.Y., Le N.T. et al. // *Polymers.* 2022. V. 14. P. 4476.
<https://doi.org/10.3390/polym14214476>
31. Kavanagh A., Ramu S., Gong Y., Cooper M.A., Blaskovich M.A.T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019. V. 63. № 1.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01760-18>
32. Bock L.J., Hind C.K., Sutton J.M., Wand M.E. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2018. V. 66. № 5. P. 368–377.
<https://doi.org/10.1111/lam.12863>
33. Lahuerta Zamora L., Pérez-Gracia M.T. // *J.R. Soc. Interface.* 2012. V. 9. № 73. P. 1892–1897.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0809>
34. Schug A.R., Bartel A., Scholtzek A.D., Meurer M., Brombach J., Hensel V. et al. // *Vet. Microbiol.* 2020. V. 248. P. 108791.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108791>
35. Pinna A., Donadu M.G., Usai D., Dore S., Boscia F., Zanetti S. // *Cornea.* 2020. V. 39. № 11. P. 1415–1418.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002375>
36. Lozano G.E., Beatriz S.R., Cervantes F.M., María G.N.P., Francisco J.M.C. // *African J. Microbiol. Res.* 2018. V. 12. № 31. P. 736–740.
<https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8893>
37. Rodríguez-López M.I., Mercader-Ros M.T., Pellicer J.A., Gómez-López V.M., Martínez-Romero D., Núñez-Delgado E. et al. // *Food Control.* 2020. V. 108. P. 106814.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106814>
38. Darbasizadeh B., Fatahi Y., Feyzi-barnaji B., Arabi M., Motasadizadeh H., Farhadnejad H. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 141. P. 1137–1146.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.060>
39. Kamimura J.A., Santos E.H., Hill L.E., Gomes C.L. // *LWT — Food Sci. Technol.* 2014. V. 57. № 2. P. 701–709.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.014>
40. Natsaridis E., Gkartziou F., Mourtas S., Stuart M.C.A., Kolonitsiou F., Klepetsanis P. et al. // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 2. P. 370.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020370>
41. García-González C.A., Barros J., Rey-Rico A., Redondo P., Gómez-Amoza J.L., Concheiro A. et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 4. P. 3349–3360.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b17375>
42. Kucukoglu V., Uzuner H., Kenar H., Karadenizli A. // *Int. J. Pharm.* 2019. V. 569. P. 118578.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118578>
43. Aytac Z., Yildiz Z.I., Kayaci-Senirmak F., Tekinay T., Uyar T. // *Food Chem.* 2017. V. 231. P. 192–201.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.113>
44. Jug M., Kosalec I., Maestrelli F., Mura P. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 54. № 5. P. 1030–1039.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.009>
45. Bhuyan S., Yadav M., Giri S.J., Begum S., Das S., Phukan A. et al. // *J. Microbiol. Methods.* 2023. V. 207. P. 106707.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106707>
46. Thomas P., Sekhar A.C., Upreti R., Mujawar M.M., Pasha S.S. // *Biotechnol. Reports.* 2015. V. 8. P. 45–55.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>
47. Boukouvalas D.T., Belan P., Leal C.R.L., Prates R.A., de Araújo S.A. 2019. P. 410–418.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-13469-3_48
48. Chen C., Qu F., Wang J., Xia X., Wang J., Chen Z. et al. // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2016. V. 123. № 2. P. 1583–1590.
<https://doi.org/10.1007/s10973-015-4999-9>
49. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Agar Dilution. // *Clinical Microbiology and Infection.* 2000. V. 6. № 9. P. 509–515.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>
50. Mączyńska B., Paleczny J., Oleksy-Wawrzyniak M., Choroszy-Król I., Bartoszewicz M. // *Pathogens.* 2021. V. 10. № 5. P. 512.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10050512>
51. Huang D., Zuo Y., Zou Q., Zhang L., Li J., Cheng L. et al. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011. V. 22. № 7. P. 931–944.
<https://doi.org/10.1163/092050610X496576>
52. Taha M., Chai F., Blanchemain N., Neut C., Goube M., Maton M. et al. // *Int. J. Pharm.* 2014. V. 477. № 1–2. P. 380–389.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.026>
53. Orszulik S.T. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2020. V. 20. № 3. P. 277–283.
<https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1719070>
54. Orszulik S.T. // *J. Microbiol. Methods.* 2022. V. 200. P. 106538.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106538>
55. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Routine and Extended Internal Quality Control for MIC Determination and Disk Diffusion as Recommended by EUCAST. Version 9.0. 2019. <http://www.eucast.org>
56. Missoun F., Ríos A.P. de los, Ortiz-Martínez V., Salar-García M.J., Hernández-Fernández J., Hernández-Fernández F.J. // *Processes.* 2020. V. 8. № 9.
<https://doi.org/10.3390/PR8091163>
57. Li Y., Zhou J., Gu J., Shao Q., Chen Y. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2022. V. 215. P. 112514.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112514>
58. Skuredina A., Le-Deygen I., Belogurova N., Kudryashova E. // *Carbohydr. Res.* 2020. P. 108183.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108183>
59. Azhdarzadeh M., Lotfipour F., Zakeri-Milani P., Mohammadi G., Valizadeh H. // *Adv. Pharm. Bull.* 2012. V. 2. № 1. P. 17–24.
<https://doi.org/10.5681/apb.2012.003>

60. *Almekhlafi S., Thabit A.A.M.* // J. Chem. Pharm. Res. 2014. V. 6. № 3. P. 1242–1248.
61. *Valizadeh H., Mohammadi G., Ehyaei R., Milani M., Azhdarzadeh M., Zakeri-Milani P. et al.* // Pharmazie. 2012. V. 67. № 1. P. 63–68.
<https://doi.org/10.1691/ph.2012.1052>
62. *Jabir M.S., Taha A.A., Sahib U.I.* // Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol. 2018. V. 46. P. 345–355.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1457535>
63. *Furneri P.M., Fresta M., Puglisi G., Tempera G.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. № 9. P. 2458–2464.
<https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2458-2464.2000>
64. *Le-Deygen I.M., Mamaeva P.V., Skuredina A.A., Safronova A.S., Belogurova N.G., Kudryashova E.V.* // J. Funct. Biomater. 2023. V. 14. № 7. P. 381.
<https://doi.org/10.3390/jfb14070381>
65. *Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S.S.* // J. Microbiol. Methods. 2010. V. 81. № 2. P. 121–126.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
66. *Arasoglu T., Derman S., Mansuroglu B., Yelkenci G., Kocyigit B., Gumus B. et al.* // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 123. № 6. P. 1407–1419.
<https://doi.org/10.1111/jam.13601>
67. *Hoang Thi T.H., Chai F., Leprêtre S., Blanchemain N., Martel B., Siepmann F. et al.* // Int. J. Pharm. 2010. V. 400. № 1–2. P. 74–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.035>
68. *Houdkova M., Rondevaldova J., Doskocil I., Kokoska L.* // Fitoterapia. 2017. V. 118. P. 56–62.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.02.008>
69. *Liang H., Yuan Q., Vriesekoop F., Lv F.* // Food Chem. 2012. V. 135. № 3. P. 1020–1027.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.054>
70. *Skuredina A.A., Yakupova L.R., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V.* // Lomonosov Chem. J. 2023. V. 64. № №5, 2023. P. 441–459.
<https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-5-441-459>
71. *Harish Prashanth K.V., Tharanathan R.N.* // Trends Food Sci. Technol. 2007. V. 18. № 3. P. 117–131.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
72. *Chen C.Z., Cooper S.L.* // Biomaterials. 2002. V. 23. № 16. P. 3359–3368.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00036-4)
73. *He M., Wu T., Pan S., Xu X.* // Appl. Surf. Sci. 2014. V. 305. P. 515–521.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.03.125>
74. *Kochan K., Perez-Guaita D., Pissang J., Jiang J.H., Peleg A.Y., McNaughton D. et al.* // J.R. Soc. Interface. 2018. V. 15. № 140.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0115>
75. *Wongthong S., Tippayawat P., Wongwattanakul M., Pong-ngern P., Wonglakorn L., Chanawong A. et al.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 36. № 2. P. 22.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2788-5>
76. *Yakupova L.R., Skuredina A.A., Kopnova T.Y., Kudryashova E.V.* // Polysaccharides. 2023. V. 4. № 4. P. 343–357.
<https://doi.org/10.3390/polysaccharides4040020>
77. *Dillen K., Bridts C., Van der Veken P., Cos P., Vandervoort J., Augustyns K. et al.* // Int. J. Pharm. 2008. V. 349. № 1–2. P. 234–240.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.041>
78. *Skuredina A.A., Tychinina A.S., Le-Deygen I.M., Golyshv S.A., Belogurova N.G., Kudryashova E.V.* // React. Funct. Polym. 2021. V. 159. № 498. P. 104811.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104811>
79. *Camacho-Cruz L.A., Velazco-Medel M.A., Cruz-Gómez A., Bucio E.* // Advanced Antimicrobial Materials and Applications. 2021. P. 1–42.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-7098-8_1
80. *Vaara M.* // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. № 3. P. 395–411.
81. *Rybal'chenko O.V.* // Microbiology. 2006. V. 75. № 4. P. 476–480.
<https://doi.org/10.1134/S0026261706040187>
82. *Ulvatne H., Haukland H., Olsvik Ø., Vorland L.* // FEBS Lett. 2001. V. 492. № 1–2. P. 62–65.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02233-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02233-5)
83. *Geilich B.M., van de Ven A.L., Singleton G.L., Sepúlveda L.J., Sridhar S., Webster T.J.* // Nanoscale. 2015. V. 7. № 8. P. 3511–3519.
<https://doi.org/10.1039/C4NR05823B>
84. *Skuredina A.A., Kopnova T.Y., Tychinina A.S., Golyshv S.A., Le-deygen I.M., Belogurova N.G. et al.* // Molecules. 2022. V. 27. P. 8026.
<https://doi.org/10.3390/molecules27228026>
85. *Nicolosi D., Scalia M., Nicolosi V.M., Pignatello R.* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2010. V. 35. № 6. P. 553–558.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.01.015>
86. *Song J., Han B., Song H., Yang J., Zhang L., Ning P. et al.* // J. Environ. Radioact. 2019. V. 208–209. P. 106027.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106027>
87. *Kumar Tyagi A., Bukvicki D., Gottardi D., Veljic M., Guerzoni M.E., Malik A. et al.* // Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2013. V. 2013. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2013/382927>
88. *Jaiswal S., Mishra P.* // Med. Microbiol. Immunol. 2018. V. 207. № 1. P. 39–53.
<https://doi.org/10.1007/s00430-017-0525-y>
89. *Fahimmunisha B.A., Ishwarya R., AlSalhi M.S., Devanesan S., Govindarajan M., Vaseeharan B.* // J. Drug Deliv. Sci. Technol. Elsevier, 2020. V. 55. № November 2019. P. 101465.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101465>
90. *Ishwarya R., Vaseeharan B., Subbaiah S., Nazar A.K., Govindarajan M., Alharbi N.S. et al.* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2018. V. 183. P. 318–330.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.049>

91. Dufrêne Y.F., Viljoen A., Mignolet J., Mathelié-Guinlet M. // *Cell. Microbiol.* 2021. V. 23. № 7. <https://doi.org/10.1111/cmi.13324>
92. Zamani E., Johnson T.J., Chatterjee S., Immethun C., Sarella A., Saha R. et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. V. 12. № 44. P. 49346–49361. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c12038>
93. Guo R., Li K., Qin J., Niu S., Hong W. // *Nanoscale.* 2020. V. 12. № 20. P. 11251–11266. <https://doi.org/10.1039/D0NR01366H>
94. Kochan K., Peleg A.Y., Heraud P., Wood B.R. // *J. Vis. Exp.* 2020. № 163. <https://doi.org/10.3791/61728>
95. Duverger W., Tsaka G., Khodaparast L., Khodaparast L., Louros N., Rousseau F. et al. // *J. Nanobiotechnology.* 2024. V. 22. № 1. P. 406. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02674-3>
96. Gollwitzer H., Ibrahim K., Meyer H., Mittelmeier W., Busch R., Stemberger A. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2003. V. 51. № 3. P. 585–591. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg105>
97. Jeong Y. Il, Na H.S., Seo D.H., Kim D.G., Lee H.C., Jang M.K. et al. // *Int. J. Pharm.* 2008. V. 352. № 1–2. P. 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.001>
98. Baghdan E., Raschpichler M., Lutfi W., Pinnapireddy S.R., Pourasghar M., Schäfer J. et al. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019. V. 139. P. 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.03.003>
99. Скуредина А.А., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В. // *Коллоидный журнал.* 2018. V. 80. № 3. P. 330–337. <https://doi.org/10.7868/s0023291218030102>
100. Mousavian D., Mohammadi Nafchi A., Nouri L., Abedinia A. // *J. Food Meas. Charact.* 2021. V. 15. № 1. P. 883–891. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00690-z>
101. Wang H., Hao L., Wang P., Chen M., Jiang S., Jiang S. // *Food Hydrocoll.* 2017. V. 63. P. 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.028>
102. Banooee M., Seif S., Nazari Z.E., Jafari-Fesharaki P., Shahverdi H.R., Moballegh A. et al. // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2010. V. 93B. № 2. P. 557–561. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31615>
103. Chotitumnavee J., Parakaw T., Srisatjaluk R.L., Pruksaniyom C., Pisitpipattana S., Thanathipanont C. et al. // *J. Dent. Sci.* 2019. V. 14. № 1. P. 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2018.08.010>
104. Queiroz V.M., Kling I.C.S., Eltom A.E., Archanjo B.S., Prado M., Simão R.A. // *Mater. Sci. Eng. Elsevier B.V.* 2020. V. 112. P. 110852. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110852>

The Methods of Antibacterial Activity Investigation and Mechanism of Antimicrobial Action of Drug Molecules Encapsulated in Delivery Systems

A. A. Skuredina^{a,*}, N. G. Belogurova^a, and E. V. Kudryashova^a

^aDepartment of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: anna.skuredina@yandex.ru

Due to the diversity of the structure and supramolecular architecture of existing antibacterial drug delivery systems, the question of choosing methods for *in vitro* properties research of the proposed drug forms (DF) and determining the effect of the carrier on the antimicrobial properties of the drug in the research laboratory is especially relevant. The review examines the main microbiological methods of antimicrobial activity investigation that are used in the study of DF, and provides recommendations for choosing a research method in accordance with the type and chemical nature of drug carrier. In addition, instrumental methods and experimental techniques for studying the mechanism of antimicrobial action of DF, as well as *in vitro* effects, which are most often observed in the literature when the drug is encapsulated in a carrier, are discussed. This review provides the researcher with a strategy for analyzing the antimicrobial properties of the DF based on the system's physico-chemical properties that allows a more comprehensive assessment of the future prospects of drugs.

Keywords: antibacterial activity, drug delivery systems, microscopy of cells