

УДК 678.7

3D-ПЕЧАТЬ ТЕТРАФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОЛИЛАКТИДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В КАЧЕСТВЕ ФОТОИНИЦИАТОРОВ

© 2020 г. Е. О. Епифанов¹, П. С. Тимашев^{1,2}, Я. В. Фалетров^{3,4}, Ю. А. Пискун³, С. В. Костюк^{2,3,4}, Н. В. Минаев¹, К. Н. Бардакова^{1,2,*}

¹Федеральное государственное учреждение “Федеральный научно-исследовательский центр “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук, Институт фотонных технологий Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Институт регенеративной медицины, Москва, Россия

³Белорусский государственный университет, Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Минск, Беларусь

⁴Белорусский государственный университет, химический факультет, Минск, Беларусь

*E-mail: arie5@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Синтезированы гидрофобные производные антибактериального препарата ципрофлоксацина, которые были использованы в качестве фотоинициаторов двухфотонной полимеризации. Для фоточувствительных композиций на основе тетрафункционального поли(Д,Л-лактида) и производных ципрофлоксацина продемонстрирована методика подбора параметров 3D-печати, влияние параметров 3D-печати на топографию матриц.

DOI: 10.31857/S0367676520110095

ВВЕДЕНИЕ

Среди способов формирования трехмерных матриц особо стоит выделить технологии 3D-печати, когда трехмерный матрикс формируется послойно, исходя из цифровой модели желаемого объекта. Одним из наиболее перспективных методов структурирования является метод двухфотонной микростереолитографии – уникальная технология 3D-печати микро- и нанообъектов с использованием фемтосекундного лазерного излучения и жидкого фотополимеризуемого композиционного материала [1–4]. Метод двухфотонной микростереолитографии позволяет формировать матрицы непосредственно в объеме фоточувствительного материала. Благодаря нелинейному характеру поглощения лазерного излучения, процесс структурирования происходит без нагрева материала, что дает возможность вводить различные биоактивные компоненты (факторы роста, цитокины) в материал матрикса непосредственно перед 3D-печатью. С помощью метода двухфотонной микростереолитографии уже получены трехмерные матрицы из фоточув-

ствительных композиций на основе желатина [5], гиалуроновой кислоты [6, 7], фибрина [8], хитозана [9].

Данная работа является продолжением наших исследований по формированию трехмерных микроструктур из композиций на основе фоточувствительных разветвленных поли(Д,Л-лактидов). Ранее было показано, что такие матрицы обеспечивают остеогенную дифференцировку стволовых клеток жировой ткани, увеличивают скорость минерализации новообразованной костной ткани [10]. Были синтезированы гидрофобные производные антибактериального препарата ципрофлоксацина, которые дополнительно обладали абсорбцией в области двухфотонного поглощения. Это позволило использовать их в качестве фотоинициаторов 3D-печати, а также реализовать ковалентную фиксацию производных ципрофлоксацина в структуре трехмерных матриц. В дальнейшем такой подход может обеспечить пролонгированное действие антибактериальных препаратов при хирургических операциях с использованием трехмерных матриц из тетра-

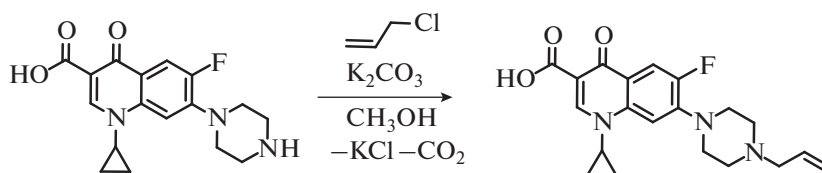


Рис. 1. Структура и схема синтеза аллил-ципрофлоксацина (CPF-Allyl).

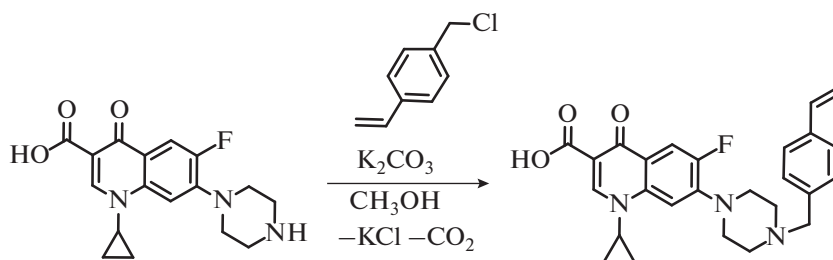


Рис. 2. Структура и схема синтеза винилбензил-ципрофлоксацина (CPF-VBC).

функционального поли(D,L-лактида), также избежать традиционную бактериальную терапию после имплантации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез гидрофобных производных цiproфлoксацина

Для получения производных цiproфлoксацина в работе использовали фармацевтическую субстанцию цiproфлoксацина (CPF) гидрохлорида, аллил-хлорид, 4-винилбензилхлорид, триэтиламин, метанол, K_2CO_3 . Для подтверждения получения целевых соединений использовали масс-спектрометрический (ESI-MS) анализ с системой LCMS-2020, оснащенной масс-спектрометром.

Синтез производного CPF с аллил хлоридом (CPF-Allyl) осуществляли согласно схеме на рис. 1: цiproфлoксацина гидрохлорид (200 мг, 545 мкмоль, 1 эквивалент) растворяли в 10 мл метанола, добавляли аллилхлорид (50 мкл, 695 мкмоль, избыток 1.3 раза) и карбонат калия (115 мг, 0.833 мкмоль, избыток 3.0 раза). Полученную смесь кипятили в течение 2 ч в круглодонной колбе с обратным холодильником. По окончании реакции полученный раствор охлаждали, отфильтровывали от соли на целлюлозном фильтре, упаривали на ротационном испарителе при пониженном давлении. Получили белое твердое вещество, растворы которого в метаноле обладают характерной синей флуоресценцией при облучении УФ излучением на длине волны 365 нм. ESI-MS: m/z 372.15 $[M+H]^+$ для $C_{20}H_{23}FN_3O_3^+$ (теор. 372.17).

Синтез производного CPF с винилбензил хлоридом (CPF-VBC) осуществляли согласно схеме

на рис. 2: цiproфлoксацина гидрохлорид (200 мг, 545 мкмоль, 1 эквивалент) растворяли в 10 мл метанола, добавляли винилбензил хлорид 90% (153 мкл, 1000 мкмоль, избыток 1.8) и карбонат калия (115 мг, 0.833 мкмоль, избыток 3.0 раза). Полученную смесь кипятили в течение 2 ч в круглодонной колбе с обратным холодильником. По окончании реакции полученный раствор охлаждали, отфильтровывали от соли на целлюлозном фильтре, хроматографировали на силикагеле с использованием этанола в качестве элюента, упаривали на ротационном испарителе при пониженном давлении. Получили белое твердое вещество, растворы которого в метаноле обладают характерной синей флуоресценцией при облучении УФ излучением на длине волны 365 нм. ESI-MS: m/z 448.2 $[M+H]^+$ для $C_{26}H_{27}FN_3O_3^+$ (теор. 448.20).

Для регистрации спектров поглощения растворов производных цiproфлoксацина использовали спектрофотометр Cary-50 (Varian Optical Spectroscopy Instruments).

Оценка липофильности производных цiproфлoксацина

Липофильность веществ оценивалась по значению LogP теоретически рассчитываемому проводилась с помощью программы HyperChem 7.01. Конформация молекул предварительно находилась в приближении полуэмпирического метода модели Аустина AM1 по алгоритму Полака–Райбера (значение градиента – не более 0.05).

Теоретические расчеты взаимодействия полученных производных цiproфлoксацина осуществляли с помощью программ MGL Tools 1.5.6

Таблица 1. Теоретически-рассчитанные величины липофильности ($\log P$) для ципрофлоксацина и его полученных производных

Вещество	CPF	CPF-Allyl	CPF-VBC
$\log P$	-1.85	-0.74	+1.19

и Autodock Vina 1.1.2 (область докирования $4 \times 4 \times 4$ нм с центром по центру белка, параметры exhaustiveness и число моделей были 12 и 5, соответственно). Структуры ДНК гиразы *E. coli* были из базы Protein Data Bank. Эффективность взаимодействия оценивали по величине расчетной энергии связывания (E_{cb}), которая табулировалась вместе с данными об аминокислотном окружении структур полученных соединений в рассчитанных комплексах.

Подготовка фотополимеризующихся композиций

Для приготовления фотополимеризующихся композиций (ФПК) на первом этапе к навеске производного ципрофлоксацина (4–5.5 мг) добавляли 1 мл трихлорметана. Растворы оставляли перемешиваться на 24 ч, после чего фильтровали через фильтрующую насадку с размером пор 0.45 мкм. На втором этапе в фильтр вводили тетрафункциональный поли(D,L-лактид) (20 мас. %), модифицированный метакрилоил хлоридом согласно [10] (M_n (ГПХ) = 2340 г/моль; $M_w/M_n = 1.2$, содержание концевых метакрилатных групп (F_n) 91%). ФПК оставляли перемешиваться на 24 ч, после использовали для трехмерной печати.

3D-печать

Подбор параметров 3D-печати производили на комплексе лазерного фемтосекундного микроструктурирования, созданном в ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Использовали излучение второй гармоники фемтосекундного лазера “ТЕМА-100” длиной волны 525 нм (длительность импульса ~200 фс, частота следования импульсов 80 МГц, средняя мощность до 100 мВт) и $20\times$ планарный микрообъектив с числовой апертурой $NA = 0.4$. Излучение перемещалось в рабочем поле микроскопического объектива с помощью гальваносканирующей системы со скоростями до 50 мм/с. Смещение по вертикальной оси осуществлялось с помощью прецизионных подвижек с субмикронной точностью позиционирования. Такой подход позволял проводить высокопроизводительное лазерное воздействие на фоточувствительную полимерную композицию и сформировать тестовые микроструктуры за время порядка 10 мин.

Для анализа возможности формирования трехмерных микроструктур использовался матричный подбор параметров воздействия лазерным излучением. Для этого формировались двухмерные матрицы с единичными элементами в виде цилиндров (внешний диаметр 250 мкм, внутренний диаметр 180 мкм, высота 80 мкм), расположенных на предварительно сформированной из ФПК подложке. В двухмерной матрице цилиндров по одной из осей варьировалась средняя мощность лазерного излучения (от 25 мВт, шаг 5 мВт – 4 точки) и плотность заливки отдельными треками лазерного излучения – расстояния между отдельными проходами лазерного луча (от 1 мкм, шаг 1 мкм, 6 точек). Скорость перемещения лазерного луча составляла 25 мм/с.

Для оценки геометрических размеров элементов матрицы после 3D-печати использовали флуоресцентный микроскоп KOZO XJF900. Далее сформированные матрицы отмывали от несшитых компонентов ФПК трихлорметаном в течение 2 ч. Топографию матриц оценивали с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Phenom ProX.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате УФ-спектроскопии было подтверждено, что полученные производные ципрофлоксацина сохраняют характерную для исходного соединения оптические свойства, а именно способность к синей флуоресценции (максимум при 420–450 нм) при облучении светом светодиода с максимумом излучения при 365 нм. Следовательно, синтезированные производные ципрофлоксацина прозрачны в области работы фемтосекундного лазера, при этом имеют интенсивную полосу поглощения при 282 нм и более слабый максимум при 320 нм. Способность ципрофлоксацина претерпевать фотоиндуцированные радикальные превращения описана в литературе [11], однако новизна этой работы состоит в том, что это его свойство использовали для лазер-иницируемой контролируемой фотополимеризации функционализированного акрилатом полилактида. Введение аллиловой и винилбензиловой групп в структуру ципрофлоксацина дало производные с повышенной гидрофобностью. Это важно для лучшей растворимости соединения в полилактиде, а также сайты ковалентного присоединения к обсуждаемой полимерной матрице через механизмы радикальной полимеризации [12, 13]. Таким образом, введение двойной $-C=C-$ связи в структуру ципрофлоксацина позволяет расширить возможности применения данного антибактериального препарата за счет использования его в качестве фотоинициатора и мономера материалов для двухфотонной полимеризации.

Результаты, представленные в табл. 1, количественно характеризуют увеличение липофильности

Таблица 2. Теоретически-рассчитанные параметры взаимодействия полученных соединений с ДНК-гиразой бактерий *E. coli*

ДНК гиразы В <i>E. coli</i> (код структуры 3g7e)			
Соединение	CPF	CPF-Allyl	CPF-VBC
$E_{св}$, ккал/моль	–8.5	–6.8	–9.4
Аминокислотное окружение в радиусе 0.4 нм от фторхинолонового ядра	ALA47; GLY77; ILE78; ILE94; PHE104	PHE104; ASN46; ILE78; ILE94	ARG76; ALA53; PHE104; LYS103; GLU50
ДНК гиразы В <i>E. coli</i> (код структуры 5l3j)			
Соединение	CPF	CPF-Allyl	CPF-VBC
$E_{св}$, ккал/моль	–6.7	–7.5	–8.8
Аминокислотное окружение в радиусе 0.4 нм от фторхинолонового ядра	ARG190; LYS189; PRO274	ARG276; CYS268; GLU193; HIS37; LYS189; PRO274	ASP49; ASP73; GLU42; GLU50

аллильного и винилбензильного производных по сравнению с исходным ципрофлоксацином.

Из полученных данных по докингу следует, что данные соединения способны связываться с ДНК гиразой бактерии *E. coli* с различной аффинностью, однако различия в нюансах их связывания (аминокислотное окружение фторхинолонового фрагмента) могут вносить существенный вклад в возможность ингибирования активности этого фермента полученными соединениями (табл. 2).

Подбор параметров 3D-печати проводили в несколько этапов. Вначале, подбирались минимальная мощность лазерного воздействия, при которой происходило формирование матрицы параметров с четкими контурами. Также оценивалась сохранность матрицы после процедуры отмывки. Затем, при фиксированной мощности лазера формировали матрицу параметров, меняя расстояние между отдельными слоями и расстояние между отдельными проходами луча. Результаты подбора параметров приведены на рис. 3 и 4.

Для матрицы параметров из ФПК и CPF-Allyl в качестве фотоинициатора (рис. 3) мощность структурирования составила 60 мВт, при этом единичные элементы матрицы сохранялись после отмывки только в случае “плотной” заливки линиями с шагом 1 мкм.

Минимальная мощность лазерного излучения при структурировании ФПК с CPF-VBC в качестве фотоинициатора составила 35 мВт. Для ФПК с CPF-VBC (рис. 4) наблюдалась большая стабильность матрицы после отмывки в сравнении с CPF-Allyl: единичные элементы матрицы сохранялись при расстоянии между проходами луча с шагом 4 мкм, при этом поверхность элементов представляла собой решетчатую структуру (рис. 4з).

Таким образом, методом 3D-печати с использованием фемтосекундного лазерного излучения впервые были сформированы трехмерные матрицы на основе тетрафункционального поли(D,L-лактида) и производных ципрофлоксацина, модифицированных аллил хлоридом и винилбензил хлоридом. Синтезированные производные ципрофлоксацина ха-

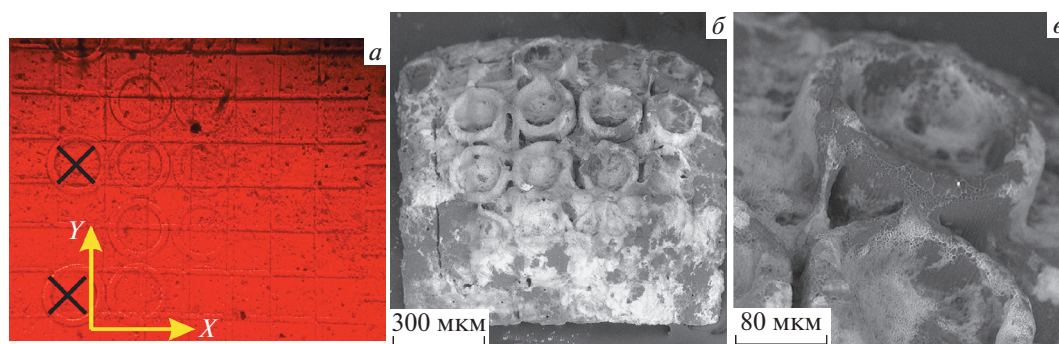


Рис. 3. Микрофотография (а) и СЭМ (б, в) матрицы подбора параметров для ФПК с CPF-Allyl в качестве фотоинициатора. (в) – элемент матрицы параметров, структурированный при мощности 60 мВт, расстояние между отдельными слоями – 5 мкм, расстояние между проходами луча – 1 мкм.

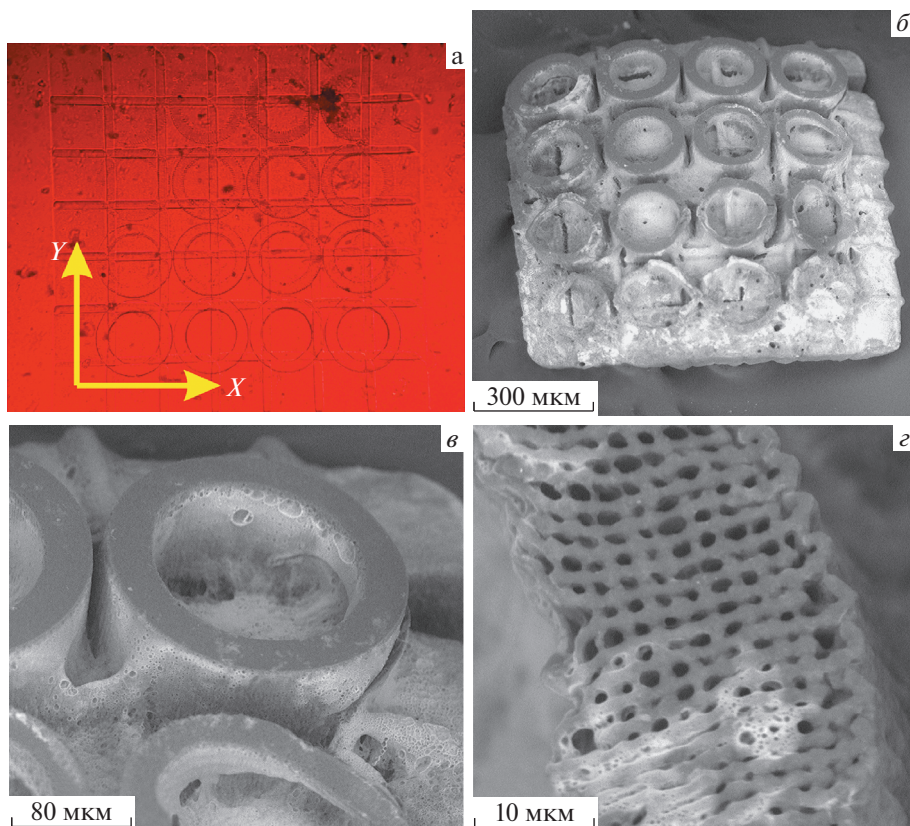


Рис. 4. Микрофотография (а) и СЭМ (б–г) матрицы подбора параметров для ФПК с CPF-VBC в качестве фотоинициатора. Элемент матрицы параметров, структурированный при мощности 35 мВт, расстояние между отдельными слоями – 5 мкм, расстояние между проходами луча – 1 мкм (б). Элемент матрицы параметров, структурированный при мощности 50 мВт, расстояние между отдельными слоями – 8 мкм, расстояние между проходами луча – 4 мкм (г).

рактируются большей липофильностью по сравнению с исходным ципрофлоксацином. В рамках продолжения работы будут изучены биосовместимость и антимикробные свойства трехмерных матриц на основе разработанных ФПК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ (проекты № 19-52-04020 и № X19PM-034), Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части развития лазерных аддитивных технологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nguyen A.K., Narayan R.J.* // *Mater. Today*. 2017. V. 20. № 6. P. 314.
2. *Guo R., Xiao S., Zhai X. et al.* // *Opt. Expr.* 2006. V. 14. № 2. P. 810.
3. *Serbin J., Ovsianikov A., Chichkov B.* // *Opt. Expr.* 2004. V. 12. № 21. P. 5221.
4. *Ovsianikov A., Chichkov B., Mente P. et al.* // *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2007. V. 4. № 1. P. 22.
5. *Koroleva A., Kufelt O., Schlie-Wolter S. et al.* // *Biomed. Tech. Eng.* 2013. V. 58. № 5. P. 399.
6. *Leach J.B., Bivens K.A., Patrick C.W. et al.* // *Biotechnol. Bioengin.* 2003. V. 82. № 5. P. 578.
7. *Leach J.B., Bivens K.A., Collins C.N.* // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2004. V. 70. № 1. P. 74.
8. *Koroleva A., Gittard S., Schlie S. et al.* // *Biofabrication*. 2012. V. 4. № 1. Art. № 015001.
9. *Timashev P.S., Bardakova K.N., Minaev N.V. et al.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. № 5. P. 508.
10. *Timashev P., Kuznetsova D., Koroleva A. et al.* // *Nanomed.* 2016. V. 11. № 9. P. 1041.
11. *Soldevila S., Cuquerella M.C., Lhiaubet-vallet V. et al.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 67. P. 417.
12. *Volodina V.I., Tarasov A.I.* // *Russ. Chem. Rev.* 1970. V. 39. № 2. P. 140.
13. *Atsumoto B.A.M., Umagai A.T.K., Ota H.A. et al.* // *Polymer J.* 2009. V. 41. № 1. P. 26.