УДК 541.64:547.461

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ РЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИЭФИРОВ ОКИСАЛКАНОВЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ И ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ¹

© 2012 г. А. В. Горева*,**, Е. И. Шишацкая*, **, Т. Г. Волова*, **, Э. Дж. Сински***

 Учреждение Российской академии наук Институт биофизики Сибирского отделения РАН 660036 Красноярск, Академгородок, 50
 **Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский федеральный университет"
 Институт фундаментальной биологии и биотехнологии 660041 Красноярск, Свободный пр., 79
 *** Массачусетский технологический институт МА 02139 Кембридж, Эймс, 31, США Поступила в редакцию 09.05.2011 г. Принята в печать 14.09.2011 г.

Исследовано влияние техники изготовления (химический состав полимера, тип, способ перемешивания эмульсии, молекулярная масса лекарственного препарата) на выход, структуру и размер микрочастиц, получаемых из резорбируемых полиэфиров микробиологического происхождения полигидроксиалканоатов. Установлено, что наиболее значимыми факторами, влияющими на размеры микрочастиц из полигидроксиалканоатов, являются концентрация раствора полимера и способ перемешивания эмульсии; структура поверхности частиц в бо́льшей степени зависит от химического состава полимера. Получено семейство микрочастиц диаметром от 100-200 нм до 50-70 мкм. Показано, что выход препаратов в среду из материала микрочастиц in vitro происходит активнее из сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом по сравнению с гомополимером первого и возрастает с увеличением содержания звеньев 3-гидроксивалерата в сополимере, пористости, массовой доли препарата в частицах при уменьшении их размеров. В системах in vitro с фосфатным буфером варьированием параметров процесса изготовления возможно выявление микрочастиц с различными характеристиками, пригодными для депонирования лекарственных препаратов. На примере микрочастиц, полученных из полигидроксиалканоатов и различающихся по диаметру, найдено математическое описание кинетики выхода препарата из полимерной матрицы.

введение

Конструирование пролонгированных лекарственных систем с контролируемым выходом лекарственных препаратов (в англоязычной литературе – "drug delivery control systems", DDS) – актуальное и активно развиваемое направление в биотехнологии и экспериментальной фармакологии. В настоящее время около 25% мирового объема продаж лекарственных средств составляют препараты, снабженные системами транспорта-доставки [1]. Связано это с тем, что такие системы способны продлевать действие, увеличивать адресность и биодоступность лекарственного вещества, а также понижать возможные побочные эффекты токсичных препаратов [2]. Наиболее перспективными считают пролонгированные лекарственные формы в виде микро- и наночастиц, которые могут быть введены в кровоток, подкожно или внутримышечно, а также адаптированы для орального применения или ингаляций [2, 3].

Ключевым моментом при разработке пролонгированных лекарственных систем является поиск адекватного материала, используемого в качестве носителя. Такие материалы должны быть абсолютно безвредны для организма и обладать комплексом специальных физико-механических

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке гранта государственной поддержки Ведущих научных школ (проект № 11.G34.31.0013.2010 "Биотехнологии новых биоматериалов") и Программы интеграционных исследований Президиума Сибирского отделения РАН (проект № 93).

E-mail: goreva_a@mail.ru (Горева Анастасия Владимировна).

и медико-биологических свойств. Особо актуальным сегодня представляется использование биосовместимых полимерных материалов, способных к биорезорбции in vivo без образования токсичных продуктов разрушения полимерной матрицы.

Среди многообразия разрабатываемых полимерных материалов безусловного внимания заслуживают полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры микробиологического происхождения. Это биосовместимые, биорезорбируемые и термопластичные линейные полиэфиры, которые в отличие от широко изучаемых полилактидов и полигликолидов характеризуются медленной кинетикой биорезорбции, и их разрушение в биологических средах не сопровождается резким изменением активной реакции среды [4, 5].

Разработка пролонгированных систем с контролируемым выходом лекарственных препаратов особенно актуальна при лечении длительнотекущих заболеваний. Для повышения эффекта лекарственных препаратов часто возникает необходимость в стабилизации заданной концентрации препарата в крови и(или) тканях пациента. К таким лекарственным препаратам относят нестероидные противовоспалительные средства, антибиотики и цитостатические препараты [6–10].

К настоящему моменту на основе ПГА получены пролонгированные лекарственные формы в виде микрочастиц, нагруженные анальгетиками [11] и противовоспалительными средствами, и исследована кинетика выхода лекарственных препаратов [12–15]. Показана возможность создания на основе ПГА пролонгированных форм антибиотиков в форме микрочастиц, пленок и объемных конструкций [16–19]. Известны единичные примеры включения белковых соединений в композитные микрочастицы из ПГА с полиэтиленгликолем, полилактидами [20].

Исследования, проводимые в Институте биофизики Сибирского отделения РАН, показали высокую биосовместимость высокоочищенных образцов ПГА на клеточном, тканевом уровне, включая контакт с кровью и пригодность применения для конструирования эндопротезов различных типов, а также матриц функционирующих клеток и для депонирования лекарственных препаратов [21, 22]. Показана принципиальная возможность депонирования лекарственных препаратов в полимерные носители из ПГА в виде таблетированных форм, пленок и микрочастиц и введения последних внутримышечно, подкожно и внутривенно [23-25]. Лекарственная эффективность микрочастиц, нагруженных цитостатическим препаратом, продемонстрирована на лабораторных животных с привитой асцитной карциномой Эрлиха [26].

Цель настоящей работы — сравнительное исследование полимерных микрочастиц, полученных из ПГА различными методами, и выявление факторов, определяющих основные характеристики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения микрочастиц использовали образцы ПГА двух типов: гомополимер 3-гидроксибутирата (ПГБ), и сополимер 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата (ПГБ-ПГВ), с различным содержанием звеньев гидроксивалериата (10.5, 20.0 и 37.0 мол. %) (табл. 1). Состав ПГА определяли после предварительного метанолиза проб хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра "GCD plus" ("Hewelett Packard", США). M_w , M_n и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии "Waters Breeze System" ("Waters", США) относительно полистирольных стандартов фирмы "Sigma" (США).

Микрочастицы получали методом испарения растворителя из двух- (вода-масло) и трехкомпонентных (вода-масло-вода) эмульсий. Двухкомпонентная эмульсия содержала 4%-ный раствор полимера и 0.5%-ный раствор ПВС. Для получения трехкомпонентной эмульсии к раствору полимера добавляли водный раствор желатина.

Перемешивание полимерных эмульсий осуществляли с применением верхнеприводной трехлопастной мешалки "Heipolph RZR1" (Германия) при различной скорости перемешивания (300–1000 об/мин), высокоскоростным гомогенизатором ЭІКА Ultra-Turrax T25 digital" (Германия) (20000 об/мин) и обработкой ультразвуковым генератором "Sonicator S3000" (США) (мощность воздействия варьировалась от 12 до 20 Вт, длительность от 60 до 300 с). Для стабилизации эмульсий использовали различные типы ПАВ: ПВС, полиоксиэтилен – 20-сорбит моноолеат (Tween[®] 80), натрий додецил сульфат (ДСН).

Эмульсии оставляли на сутки при постоянном механическом перемешивании до полного испарения растворителя. Сформированные микрочастицы собирали центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин), промывали 6 раз дистиллированной водой и высушивали с использованием установки лиофилизации ЛС-500 (Россия).

Вещество	Формула	ММ	Производитель
ПГБ	$\begin{pmatrix} CH_3 & H & 0 \\ H_3 & H & H \\ C & C & CH_2 \end{pmatrix}_x$	780 000***, 487 000****	ИБФ СО РАН Патент РФ № 2051967)
ПГБ-ПГВ (10.5)*	$\begin{pmatrix} CH_3 & H & 0 \\ & H & H \\ & & & \\ & & & \\ O & C & CH_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_2H_5 & H & 0 \\ & & & \\ & & & \\ O & C & CH_2 \end{pmatrix}_{y}$	840000***, 193000****	ИБФ СО РАН Патент РФ № 2051968)
ПГБ-ПГВ (20.0)*	$\begin{pmatrix} CH_3 & H & 0 \\ H_3 & H & H \\ C & C & CH_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_2H_5 & H & 0 \\ H_3 & H & H \\ C & C & CH_2 \end{pmatrix}_{x} \begin{pmatrix} C_2H_5 & H & 0 \\ C & CH_2 \end{pmatrix}_{y}$	663000***, 292000****	
ПГБ-ПГВ (37.0)*	$\begin{pmatrix} CH_3 & H & 0 \\ H_3 & H & H \\ C & C & CH_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_2H_5 & H & 0 \\ C_2H_5 & H & H \\ C & C & CH_2 \end{pmatrix}_{y}$	1026000***, 530000****	
Рубомицин (даунорубимин, рубомицина гид- рохлорид) (0.04)**	$\begin{array}{c} O & OH \\ \hline & & \\ OCH_3O & OH \\ & & \\ OCH_3O & OH \\ & & \\ H \\ HO \\ & H \\ HO \\ & \\ HH \\ HH$	564	Фармацевтическое акционерное общество "Фарейн", Россия
Ванкомицин (>100)**	$ \begin{array}{c} & & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\ & $	1440	"Лек Фарма", Россия

Таблица 1. Материалы и лекарственные препараты, используемые в работе

Таблица 1. Окончание

Вещество	Формула	MM	Производитель
Рифампицин (1.4)**	$HO_{H_{A_{in}}}$	823	Фармацевтическое акционерное общество "Фарейн", Россия
Тиенам (имипи- нем) (10)**	OH HH HN NH HN S O OH	658	"Merck Sharp and Dohme", Нидерланды

* Содержание звеньев ГВ в сополимере (мол. %).

** Растворимость в воде (мг/мл).

*** *М*_w ПГА.

**** $M_n^{"}\Pi\Gamma\Lambda$.

Выход микрочастиц *а* рассчитывали в процентах от массы использованного для их изготовления полимера:

$$a = \frac{m_{\rm M}}{m_{\rm H}} \times 100\%,$$

где $m_{\rm M}$ — масса полученных микрочастиц, мг; $m_{\rm n}$ — масса использованного полимера, мг.

Морфологию частиц анализировали на растровом электронном микроскопе ("FEI Company Quanta 20", США). Размеры и размерное распределение микрочастиц диаметром менее 3 мкм анализировали с применением электронной микроскопии; частицы диаметром от 3 мкм и более — на автоматизированной системе счета частиц "Casy[®] Scharle System GmbH" (Германия).

Для отработки техники депонирования препаратов в полимерные микрочастицы были взяты краситель фиолетовый Гофмана (триэтилрозанилин гидрохлорид, M = 338), антибиотики, различающиеся величиной ММ и степенью растворимости в водной среде: рубомицина гидрохлорид (M = 564, растворимость в воде 0.04 мг/мл), рифампицин (M = 823, растворимость в воде 1.4 мг/мл), ванкомицин (M = 1440, растворимость в воде 100 мг/мл) и тиенам (M = 320, растворимость в воде 100 мг/мл) (табл. 1). Выбор лекарственных препаратов обусловлен востребованностью в клинической практике при лечении длительно текущих заболеваний, стабильностью

в растворах и возможностью смешения лекарственных препаратов с неполярными растворителями без изменения свойств лекарственных препаратов.

При использовании двухкомпонентной эмульсии лекарственные препараты предварительно растворяли в дихлорметане, после этого в раствор вносили навеску полимера. Для создания трехкомпонентной эмульсии полимер растворяли в дихлорметане, затем в полученный раствор вносили водный раствор антибиотика; систему перемешивали до получения эмульсии, и далее постепенно вносили в раствор ПВС.

Для нагружения микрочастиц рубомицином использовали трехкомпонентную эмульсию, состоящую из раствора ПГБ в дихлорметане и полиэтиленгликоля с $M_w = 4 \times 10^4$ (ПЭГ-40) в соотношении ПГБ : ПЭГ = 80 : 20 (по массе). К полученному раствору добавляли 1 мл водного раствора рубомицина (из расчета 1% от массы полимерного носителя) и гомогенизировали с помощью ультразвука при мощности 12 Вт в течение 1 мин. В полученную эмульсию постепенно вливали в 0.5%-ный раствор ПВС; полимерную систему перемешивали при 30°С трехлопастной мешалкой ("Heidolph RZR1", Германия) до полного испарения растворителя.

Величину включения препарата в полимерную матрицу определяли спектрофотометрированием его исходной и остаточной концентрации в

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ Серия А том 54 № 2 2012

эмульсии (спектрофотометр "Uvicon 943", Италия).

Эффективность инкапсулирования *е* препарата в полимерной матрице рассчитывали по формуле

$$e = \frac{m_{\rm MHK}}{m_{\rm MCX}} \times 100\%$$

где $m_{\rm инк}$ — масса инкапсулированного препарата в полимерной матрице, мг; $m_{\rm исx}$ — исходная масса препарата, мг.

Полученные из ПГА микрочастицы, нагруженные лекарственными препаратами, стерилизовали УФ-излучением в течение 20 мин и помещали в стерильные центрифужные пробирки с крышкой в 5 мл сбалансированного фосфатного буфера; пробирки экспонировали в термостате при 37°С. Для определения количества препарата, вышедшего в среду, анализировали пробы, предварительно осадив микрочастицы центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин) на спектрофотометре ("Uvicon 943", Италия).

Выход препарата $b_{\rm n}$ в фосфатном буфере определяли по формуле

$$b_{\pi} = \frac{B}{b} \times 100\%$$

здесь b — величина включения препарата в полимерной матрице, мг/мг; B — выход препарата, мг/мг.

Теоретический анализ полученных экспериментальных данных по выходу лекарственного препарата в среду и количественного определения значений коэффициента диффузии в полимерной фазе выполнен графическим решением уравнений в координатах $(m_t/m_{\infty}) - t^{0.5}$ и в полулогарифмических координатах $\ln(1 - m_t/m_{\infty})$ – время *t*.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel и программы StatPlus. Для получения данных рассчитывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение, ошибку средней арифметической. Достоверность отличия средних значений проверяли по *U*-критерию Манна–Уитни (уровень значимости 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства микрочастиц, полученных из ПГА

Наиболее значимыми параметрами, определяющими свойства микрочастиц и кинетику выхода из них препаратов, являются размер и степень развитости поверхности. Микрочастицы, полученные из трехкомпонентной эмульсии, были правильной сферической формы в отличие от частиц, сформированных из двухкомпонентной эмульсии, которые были рыхлыми и имели небольшие деформации поверхности в виде углублений. Диаметр формируемых микрочастиц в обоих вариантах изменялся от 0.5 до 70 мкм (табл. 2). Средний диаметр микрочастиц, полученных из двухкомпонентной эмульсии, составил 14.31 ± 1.4 мкм, что близко к размеру частиц, полученных из трехкомпонентной эмульсии (12.53 ± 1.1 мкм).

Сравнительный анализ характеристик полученных микрочастиц показал, что наиболее значимым фактором, ответственным за размеры микрочастиц, является концентрация раствора полимера и способ перемешивания эмульсии. Так, с увеличением концентрации полимера в растворе в результате повышения вязкости возрастал диаметр формируемых микрочастиц. При плотности раствора 10 г/л средний диаметр микрочастиц составил 7.5 \pm 0.6 мкм; при 40 г/л возрос до 16.0 \pm 0.9 мкм. Плотность раствора влияла также на выход микрочастиц; при понижении концентрации полимера до 10–20 г/л зарегистрировано достоверное увеличение данного показателя до 73% (табл. 2).

Наибольшее влияние на размеры микрочастиц оказывала скорость перемешивания полимерной эмульсии. С увеличением скорости перемешивания эмульсии мешалкой от 300 до 1000 об/мин средний диаметр микрочастиц уменьшился практически в 3 раза и составил 5.57 ± 0.8 мкм (рис. 1а и 1б). Варьируя условия перемешивания полимерной эмульсии, можно получить микрочастицы диаметром менее 1 мкм. При высокой скорости перемешивания или мощности воздействия УЗ частицы были более однородными по размеру; их средний диаметр составил порядка 0.36-0.39 мкм. Следует отметить, что микрочастицы, полученные с применением ультразвука, имели незначительные деформации поверхности, а их общий выход в 1.5 раза ниже по сравнению с выходом частиц из эмульсии при механическом перемешивании (табл. 2). Ухудшение качества микрочастиц в этом случае, возможно, связано с нагреванием эмульсии, более быстрым испарением растворителя, в отличии от механического перемешивания, при котором форма частиц формируется и стабилизируется постепенно [27].

Обнаружено, что в процессе растворения ПГА и формирования эмульсии молекулярная масса падала. Независимо от способа перемешивания эмульсии величина ММ полимера сформированных микрочастиц была на 30–35% ниже по сравнению с этой величиной у исходных образцов полимера. С применением хроматографа для гельпроникающей хроматографии зарегистрировано, что ММ полимерной матрицы частиц, получен-

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ

	Способ диспергирования				
ΠΓΑ	ультразвук, Вт (продолжительность диспергирования)	механическое перемешивание, об/мин	Средний диаметр, мкм	Выход микрочастиц, %	
ПГБ*	-	300	7.5 ± 0.6	74.3 ± 2.4	
ПГБ**	_	300	12.2 ± 0.9	72.7 ± 1.5	
ПГБ	_	300	16.0 ± 0.86	68.3 ± 1.8	
ПГБ	_	500	9.61 ± 0.9	73.5±3.8	
ПГБ	_	1000	5.57 ± 0.8	78.6 ± 6.2	
ПГБ	_	1000	4.25 ± 0.27	67.7 ± 3.3	
ПГБ***	_	1000	13.3 ± 0.7	58.0 ± 3.4	
ПГБ	_	1000	7.09 ± 0.4	75.4 ± 4.5	
ПГБ*	_	20000	0.39 ± 0.08	84.6 ± 6.5	
ПГБ	12 (1 мин)	_	2.5 ± 0.14	57.0 ± 4.5	
ПГБ	16 (1 мин)	_	1.74 ± 0.13	62.0 ± 5.1	
ПГБ	20 (1 мин)	—	1.2 ± 0.08	61.0 ± 5.4	
ПГБ*	20 (5 мин)	_	0.36 ± 0.07	64.0 ± 4.8	
ПГБ-ПГВ (10.5)	_	1000	4.39 ± 0.2	78.0 ± 2.2	
ПГБ-ПГВ (20.0)	_	1000	4.45 ± 0.3	76.4 ± 3.2	
ПГБ-ПГВ (37.0)	_	1000	4.1 ± 0.2	74.4 ± 4.7	
ПГБ-ПЭГ-40	_	1000	4.73 ± 0.6	69.8 ± 4.6	
ПГБ-ПГВ-ПЭГ-40 (10.5)	_	1000	4.1 ± 0.6	73.7 ± 4.5	
ПГБ-ПГВ-ПЭГ-40 (20.0)	_	1000	3.54 ± 0.5	75.2 ± 4.7	
ПГБ-ПГВ-ПЭГ-40 (37.0)	-	1000	3.6 ± 0.6	64.0 ± 5.1	

Таблица 2. Условия изготовления и характеристики микрочастиц (концентрация раствора 4%, ПВС 0.5%)

Примечание. В первой колонке в скобках указано содержание звеньев ПГВ, мол. %.

* 1%-ный раствор ПГБ.

** 2%-ный раствор ПГБ.

*** $\Pi AB - 0.5\%$ Tween[®]80.

ных при использовании механического перемешивания, понизилась до 54.6×10^4 (относительно 78.0×10^4 у исходного полимера). Обработка полимерной эмульсии УЗ влияла на изменение величины MM полимера аналогичным образом.

С учетом известных данных о позитивном влиянии полимерных стабилизаторов на свойства микрочастиц [28] исследованы различные ПАВ и показано их существенное влияние на качество и выход микрочастиц (табл. 2). При добавлении в полимерную эмульсию ПВС и ДСН микрочастицы были правильной сферической формы со средним диаметром 5.5–7.0 мкм. В случае применения Tween[®] 80 наблюдалось образование крупных конгломератов, при этом общий выход частиц был ниже (~60%). Следует отметить, что увеличение концентрации ПВС с 5 до 10 г/л повышало стабильность водно-масляной эмульсии и сопровождалось понижением среднего диаметра частиц до 4 мкм (табл. 2).

Следующим параметром, который оказывал влияние на выход и размер микрочастиц, был химический состав полимера. Проведено сравнительное исследование частиц, полученных из высококристалличного полимера 3-гидроксимасляной кислоты и серии ее сополимеров с различным содержанием звеньев 3-гидроксивалериановой кислоты. Микрочастицы из сополимера ПГБ–ПГВ были правильной сферической формы с шероховатой и пористой поверхностью, рельеф которой проявлялся по мере увеличения содержания 3-гидркосивалерата в сополимере (рис. 1в и 1г). При этом содержание звеньев 3-гидроксивалерата в сополимере, влияя на



Рис. 1. РЭМ-снимки микрочастиц ПГА: а, б – ПГБ при скорости перемешивания эмульсии 300 (а) и 20000 об/мин (б); в – ПГБ, г – ПГБ–ПГВ (37 мол. % звеньев ГВ) при скорости перемешивания эмульсии 1000 об/мин; д, е – микрочастицы получены механическим перемешиванием двухкомпонентной эмульсии с добавлением 20% ПЭГ–40 (д – ПГБ–ПГВ (20 мол. % звеньев ГВ); е – ПГБ–ПГВ (37 мол. %. звеньев ГВ)).

структуру поверхности микрочастиц, не оказывало влияния на их размеры. Средний диаметр микрочастиц, полученных из сополимера ПГБ–ПГВ, независимо от соотношения в нем мономеров, составил 4.10–4.45 мкм, что соответствует размерам микрочастиц, полученных из гомогенного ПГБ (5.57 \pm 0.8 мкм) (табл. 2).

Усложнение состава полимерной системы введением второго химического соединения (использован ПЭГ-40 в концентрации 20% от массы полимерного носителя) влияло на структуру поверхности микрочастиц, но практически не влияло на их размеры (табл. 2). Так, при добавлении ПЭГ-40 к раствору сополимера ПГБ–ПГВ (содержание звеньев 3-гидроксивалерата 10.5, 20.0 и 37.0 мол. %) поверхность микрочастиц приобретала неоднородную пористую структуру с диаметром пор от 1 до 3 мкм (рис. 1д и 1е). Поверхность микрочастиц, полученных из ПГБ с добавлением ПЭГ-40, была менее шероховатой с небольшими углублениями и единичными порами. На усиление пористости микрочастиц положительно вли-

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ

Состав микрочастиц	Состав эмульсии	Концентрация препарата, %	e, %	Средний диаметр микрочастиц, мкм
ПГБ-краситель	Вода-масло	1	78.3 ± 4.4	5.8 ± 0.8
		5	65.6 ± 5.08	7.21 ± 0.7
		10	56.3 ± 3.5	8.34 ± 1.1
ПГБ-ПЭГ-40-краситель	Вода-масло	1	64.0 ± 3.6	5.5 ± 0.8
ПГБ-ПГВ (10 мол. %)	Вода-масло	1	73.5 ± 5.2	4.3 ± 0.6
ПГБ-ПГВ (37 мол. %)	Вода-масло	1	69.3 ± 4.5	4.1 ± 0.9
ПГБ–Рубомицин	Вода-масло	1	82.3 ± 6.4	5.67 ± 0.7
ПГБ–Рубомицин	Вода-масло-вода	1	65.2 ± 3.6	5.45 ± 0.4
		1	52.8 ± 3.2	8.9 ± 0.7
		5	57.5 ± 4.6	6.73 ± 0.9
ПГБ–Рифампицин	Вода-масло-вода	5	65.5 ± 5.1	7.86 ± 0.9
ПГБ–Ванкомицин	Вода-масло-вода	5	70.1 ± 3.5	8.91 ± 1.3
ПГБ–Тиенам	Вода-масло-вода	5	53.0 ± 4.5	6.43 ± 0.8

Таблица 3. Характеристика микрочастиц из ПГА с депонированными препаратами

яло повышение температуры эмульсии. При нагревании эмульсии ПГБ с добавлением ПЭГ-40 до 30°С получены пористые частицы с диаметром пор 3.5–4.0 мкм.

При введении в полимерную матрицу микрочастиц препаратов, различающихся химической структурой и свойствами, не обнаружено изменений в поверхностной структуре частиц. Так, микрочастицы, нагруженные различными препаратами, имели складчатую поверхность с небольшими углублениями и порами.

Эффективность инкапсулирования препаратов в матрицу микрочастиц *е* зависела от техники изготовления и массовой доли препарата в полимерном растворе—эмульсии (табл. 3). При использовании красителя фиолетового Гофмана с увеличением его количества в полимерной матрице микрочастиц от 1 до 10% от массы полимерной матрицы средний диаметр микрочастиц увеличивался от 5.8 ± 0.8 до 8.3 ± 1.1 мкм, при этом *е* понижалась от 78.0 ± 4.4 до $56.0 \pm 3.5\%$.

На примере рубомицина гидрохлорида показано, что *е* зависит от способа изготовления микрочастиц. При использовании трехкомпонентной эмульсии *е* этого препарата была практически в 1.5 раза ниже по сравнению с микрочастицами, полученными с использованием двухкомпонентой эмульсии (табл. 3). Нагревание трехкомпонентой эмульсии при депонировании рубомицина приводило к понижению *е* до $53.0 \pm 3.2\%$. На величину *е*, как оказалось, влиял химический состава препарата. При инкапсулировании антибиотиков с высокими значениями

молекулярной массы (ванкомицин M = 1440, рифампицин M = 823) *е* составила 70 и 65.5% соответственно, что в среднем в 1.3 раза выше по сравнению с *е* низкомолекулярных антибиотиков (рубомицин с M = 564, тиенам с M = 320) (табл. 3).

Показано, что выход микрочастиц, нагруженных различными лекарственными препаратами, был в целом ниже (~65%) по сравнению с выходом из эмульсии ненагруженных частиц (85%) (табл. 2 и 3). Уменьшение выхода микрочастиц в этом случае, вероятно, может быть связано с понижением поверхностно-активных свойств водного раствора ПВС при добавлении лекарственных препаратов в полимерную систему и, возможно, уменьшением стабильности водномасляной эмульсии и возрастанием вероятности слияния мелких микрочастиц в более крупные конгломераты [28].

Динамика выхода препаратов из полимерных микрочастиц

Для оценки динамики выхода препаратов из полимерной матрицы исследованы частицы различного диаметра, полученные из ПГБ и сополимеров ПГБ–ПГВ и в разной степени нагруженные препаратами разных типов.

Из анализа литературных данных известно, что выход лекарственных препаратов из полимерных систем пролонгированного действия может быть реализован с помощью диффузии, при котором препараты перемещаются к краю полимерного изделия и затем переходит во внешнюю сре-



Рис. 2. Динамика выхода красителя фиолетового Гофмана из ПГА микрочастиц ПГБ (*3*) и сополимеров ПГБ–ПГВ с содержанием звеньев ГВ 10 (*2*) и 37 мол. % (*1*). Содержание красителя 1% от массы полимерной матрицы.



Рис. 3. Динамика выхода рубомицина из микрочастиц ПГБ, в разной степени нагруженных антибиотиком (а), микрочастиц различного размера (б), а также микрочастиц, полученных с добавлением 20% ПЭГ–40 (в). а – содержание антибиотика 1 (3), 5 (2) и 10% (1) от массы полимерной матрицы; б – размер частиц 3.6 (1), 10.2 (2) и 15.6 мкм (3); в – ПГБ–ПЭГ-40 (1) и ПГБ (2).



Рис. 4. Динамика выхода антибиотиков из микрочастиц ПГБ: *1* – тиенам, *2* – рубомицин, *3* – рифампицин, *4* – ван-комицин.

ду [29]. Относительно исследованных полимеров из группы ПГА нельзя не отметить, что ПГБ и сополимер ПГБ–ПГВ в условиях in vitro при отсутствии биологических факторов (ферменты, клетки) не деградирует [30], поэтому выход препаратов из носителей ПГА реализуется по законам химических реакций и не зависит от состояния материала носителя.

Полученные экспериментальные кривые выхода препаратов из микрочастиц в среду представлены на рис. 2–4. Как видно, все кривые имеют двухступенчатый характер, при котором на первом этапе (5–8 сутки) концентрация препарата в среде нарастала, а начиная с 6–9 суток изменялась незначительно.

На примере красителя фиолетового Гофмана обнаружено, что на выход препарата оказывал влияние состав полимера, использованного для получения микрочастиц и влияющий на характеристики последних. Так, при исследовании выхода красителя из микрочастиц, полученных из ПГБ, ПГБ-ПГВ (10 мол. %) и ПГБ-ПГВ (37 мол. %) в течение первых суток в среде зарегистрировано соответственно 1.98 ± 0.29 , 3.9 ± 0.18 , $5.17 \pm 0.57\%$ препарата от включенного. Далее (последующие 6 суток) эти различия были менее выраженными 7.85 ± 0.6 , 10.0 ± 0.9 и $10.9 \pm 0.6\%$ соответственно. К концу эксперимента суммарный выход красителя из микрочастиц, полученных из сополимера, был практически в 1.5 раза выше по сравнению с микрочастицами на основе ПГБ (рис. 2).

На кинетику выхода лекарственных препаратов оказывала влияние степень нагруженности матриц. Как показано на рис. 3, выход рубомицина из ПГБ микрочастиц был тем выше, чем больше была величина включения препарата в матрицу. При максимальной и минимальной нагруженпервые ности матрицы в сутки выхол антибиотика составил 1.5 ± 0.3 и $3.6 \pm 0.4\%$, (от включенного) соответственно. Однако, начиная с 5-х суток, кривые вышли на плато. Далее концентрация рубомицина в модельной среде практически не изменялась. К концу эксперимента в среде было зарегистрировано следующее содержание антибиотика 9.5 ± 0.9, 13.6 ± 0.98 и 17.3 ± 0.8% соответственно, при исходном нагружении микрочастиц на 1, 5 и 10% (от массы полимерного носителя).

Кинетика выхода рубомицина из микрочастиц различного диаметра, но с одинаковым содержанием антибиотика, представлена на рис. 36. Зарегистрирован постепенный выход препарата в первый период (1-4 сутки от начала эксперимента), далее наступал период, в течение которого выход антибиотика практически не изменялся (6-22 сутки). Выход рубомицина в среду зависел от размера микрочастиц и был тем выше, чем мельче были частицы; он составил из микрочастиц диаметром 3.6 мкм $18.3 \pm 1.1\%$, а из частиц диаметром 10.2 и 15.6 мкм соответственно 14.5 \pm ± 0.9 и 10.3 $\pm 0.6\%$ от включенного. Выход рубомицина в среду также зависел от структуры поверхности микрочастиц и был тем выше, чем более пористыми были частицы. Как показано на рис. Зв, в первые сутки выход рубомицина из пористых частиц (частицы с диаметром пор 3.5-4 мкм) составил $28.4 \pm 3.04\%$, тогда как во втором варианте (частицы, имеющие складчатую структуру с небольшими углублениями) не превысил $1.8 \pm 0.06\%$. За 14 суток наблюдения выход рубомицина из пористых частиц составил 49.03 ± 1.1%, из непористых не превысил $8.5 \pm 0.26\%$ от включенного.

На динамику выхода препарата из микрочастиц оказывала влияние молекулярная масса препарата; чем она выше, тем медленнее и равномернее высвобождался препарат (рис. 4). Антибиотики, имеющие более высокую молекулярную массу (рифампицин, ванкомицин) имели сходные кривые. Спустя сутки выход этих препаратов составил соответственно 1.02 ± 0.08 и $0.57 \pm 0.06\%$; а к концу эксперимента (22-е сутки) 8.15 ± 0.7 и $6.8 \pm 0.5\%$. Для тиенама и рубомицина, имеющих меньшие значения MM, в первые сутки выход составил 1.28 ± 0.1 и $1.20 \pm 0.08\%$ от включенного в матрикс; а к концу эксперимента 15.81 ± 1.1 и $13.06 \pm 0.80\%$.

Следует отметить, что скорость выхода антибиотиков также может зависеть от химической природы лекарственного препарата. Так, для антибиотиков, имеющих большую растворимость в воде (тиенам), выход был выше по сравнению с рифампицином, у которого данный показатель был практически в 7 раз ниже. Иная картина наблюдалась для ванкомицина и рубомицина, что, по всей видимости, может быть связано с наличием функциональных групп в их структуре, способных образовывать водородные связи с гидроксильными группами полимера. Аналогичные результаты получены при использовании в качестве лекарственных препаратов диклофенака и гентамицина при депонировании их в полимерную матрицу из ПГА [31, 32].

Анализ зависимостей, представленных на рис. 2–4, показывал, что выход депонированных препаратов из ПГА микрочастиц происходит по диффузионному механизму. В первый период выход лекарственных препаратов реализуется из поверхностных структур носителя и продолжается от 5 до 8 суток в зависимости от свойств полимерной матрицы. Второй участок кривой (начиная с 6-9-х суток и до конца эксперимента) связан с выделением препарата из внутренних структур матрицы, в том числе в результате медленного и незначительного изменения ММ полимера. Так, показано, что за исследуемый период величина M_w полимера, использованного для получения микрочастиц, снизилась от 54.6×10^4 до $(49.0-46.7) \times 10^4$. Падение ММ микрочастиц в среднем не превысило 10-15% от исходной молекулярной массы микрочастиц.

Двустадийный характер выхода лекарственных препаратов из ПГА микрочастиц можно описать диффузионно-кинетическими уравнениями, предложенными ранее в работе [33]. Первая стадия характеризуется диффузионным механизмом



Рис. 5. Начальные (а) и конечные участки (б) кинетической кривой выхода рубомицина из микрочастиц ПГБ. Диаметр микрочастиц 15.6 (1), 3.6 (2) и 10.2 мкм (3).

выхода препарата с поверхности полимерной матрицы. Вторая стадия связана с выходом препарата из внутренних структур матрицы и началом гидролитических процессов в микропористой среде и характеризуется реакцией нулевого порядка:

$$\frac{\partial c_s}{\partial_t} = D_s \left(\frac{\partial^2 c_s}{\partial x^2} \right) + K, \tag{1}$$

где D_s — эффективный коэффициент диффузии, см²/с; *K* — кинетическая константа гидролитической деструкции полимера, с⁻¹; c_s — концентрация антибиотика, %.

Чтобы исключить влияние линейного вклада, обусловленного незначительным понижением ММ полимера, из суммарной концентрации вышедшего антибиотика, введена переменная

$$G_t = c_s - Kt, \tag{2}$$

здесь G_t — количество антибиотика (%), вышедшего по диффузионному механизму за время t.

Таблица 4. Коэффициенты диффузии рубомицина в микрочастицах из ПГБ, определяющие начальную и конечную фазу диффузионного процесса

Размер частиц,	Коэффициенты диффузии <i>D</i> × 10 ⁻⁴ , см/с		
$d \times 10^{-4}$, см	на начальной стадии	на конечной стадии	
3.6	9.90	0.0260	
10.2	0.64	0.0610	
15.6	0.02	0.0067	

Тогда диффузионно-кинетическое уравнение приобретает традиционный вид:

$$\frac{\partial c_s}{d_t} = D_s \left(\frac{\partial^2 c_s}{dx^2} \right). \tag{3}$$

При отсутствии концентрационной разницы на границе раздела твердая частица—жидкая фаза, последнее уравнение характеризует механизм десорбции препарата из микрочастицы.

В случае малого времени десорбции антибиотика на начальном уровне $m_t/m_{\infty} \leq 0.5$ выход препарата можно описать уравнением Фика:

$$\frac{m_t}{m_{\infty}} = 4 \sqrt{\frac{D_t}{\pi h^2}}.$$
 (4)

Учитывая, что частицы имеют сферическую форму, толщина матрицы *h* может быть заменена на диаметр частицы *d*, тогда

$$\frac{m_t}{m_{\infty}} = 4 \sqrt{\frac{D_t}{\pi d^2}},\tag{5}$$

где D_t – коэффициент диффузии; $\frac{m_t}{m_{\infty}}$ – суммар-

ный выход препарата в момент времени $t(m_t)$ и при бесконечном времени $t \to \infty(m_{\infty}), d$ – диаметр матрицы (микрочастицы), t – время.

Коэффициент диффузии на начальном этапе кривой выхода лекарственного препарата составит

$$D_{\beta} = \frac{\pi d^2 (\operatorname{tg} \beta)^2}{16}, \qquad (6)$$

здесь tg β – тангенс угла наклона прямолинейного участка кинетической кривой в координатах $(m_t/m_{\infty})-t^{0.5}$.

Линейные участки кинетических кривых, отображенные в полулогарифмических координатах, позволяют рассчитать тангенс угла наклона tg α , а затем и собственно коэффициент диффузии:

$$D_{\alpha} = \frac{d^2(\operatorname{tg}\alpha)^2}{\pi^2},\tag{7}$$

где tg α — тангенс угла наклона кинетической кривой в полулогарифмических координатах $\ln(1 - m_t/m_{\infty})$.

Графическое решение уравнений в координатах $(m_t/m_{\infty})-(t)^{0.5}$ и в полулогарифмических координатах $\ln(1 - m_t/m_{\infty})$ позволяло количественно определить значение коэффициента диффузии препарата в полимерной фазе (рис. 5).

В табл. 4 представлены полученные коэффициенты диффузии рубомицина в микрочастицах из ПГБ. Из приведенных данных видна четкая зависимость коэффициентов диффузии от размера микрочастиц. Так, коэффициент диффузии на первом этапе для микрочастиц диаметром 3.6 мкм на порядок выше по сравнению с микрочастицами с большим диаметром (табл. 4, уравнение (6)). На втором этапе (соответствует выходу кривой на плато) коэффициент диффузии падает на порядок независимо от размера микрочастиц.

Полученные результаты свидетельствуют о классическом диффузионном механизме, определяющим кинетику выхода лекарственных препаратов из полимерной матрицы на основе ПГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований определены факторы, влияющие на свойства микрочастиц из ПГА – это химический состав полимера, тип полимерной системы и способ перемешивания. Варьируя этими параметрами, можно получать микрочастицы различного размера с разной степенью пористости поверхности, пригодные для депонирования лекарственных препаратов. Отсутствие резких выбросов препаратов в среду и невысокая скорость выхода лекарственных препаратов из микрочастиц, изготовленных из ПГБ и сополимеров ПГБ-ПГВ, позволяет признать микрочастицы пригодными для депонирования лекарственных препаратов. На примере микрочастиц, различающихся по диаметру, получено математическое описание механизма выхода ЛП из полимерной матрицы в форме микрочастиц на основе ПГА. Дальнейшие исследования по варьированию условий конструирования носителей из ПГА, а также отработка уже имеющихся методик дают возможность регулировать скорость выхода препарата из микрочастиц и начать эксперименты in vivo.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Dutta R.C. // Curr. Pharm. Des. 2007. V. 13. P. 761.
- 2. *Freiberg S., Zhu X.* // Int. J. Pharm. 2004. V. 282. № 1– 2. P. 1.
- Jain K. // Drug Delivery Systems An Overview. USA: Humana Press, 2008. P. 1.
- Amass W., Amass A., Tighe B.A. // Polym. Int. 1998.
 V. 47. № 2. P. 89.
- Sudesh K., Abe H., Doi Y. // Prog. Polym. Sci. 2000. V. 25. № 10. P. 1503.
- Sayin B., Calis S., Atilla B., Marangoz S., Atila-Hinkal A. // J. Microencapsul. 2006. V. 23. № 5. P. 553.
- Hiremath P., Saha R. // Drug. Delivery. 2008. V. 15. № 3. P. 159.
- Takenaga M., Ohta Y., Tokura Y., Hamaguchi A., Igarashi R., Disratthakit A., Doi N. // Drug. Delivery. 2008. V. 15. № 3. P. 169.
- 9. *Kim J., Kabanov A., Bronich T. //* J. Controll. Rel. 2009. V. 138. № 3. P. 197.
- 10. Zhang X., Miao J., Dai Y., Du Y., Yuan H., Hu F. // J. Pharmaceut. 2008. V. 361. № 1–2. P. 239.
- Salman M., Sahin A., Onur M., Oge K., Kassab A., Aypar U. // Acta. Anaestesiol. Scand. 2003. V. 47. P. 1006.
- 12. Lionzo M., Re M., Guterres S., Pohlmann A. // J. Microencapsul. 2007. V. 24. № 2. P. 175.
- Bazzo G., Lemous-Senna E., Goncalves M., Pires T. // J. Braz. Chem. Soc. 2008. V. 19. P. 914.
- Bidone J., Melo A., Bazzo G., Carmignan F., Soldi M., Pires A., Lemos-Senna E. // Mater. Sci. Eng. 2009. V. 29. P. 588.
- Zawidlak-Wegrzyńska B., Kawalec M., Bosek I., Łuczyk-Juzwa M., Adamus G., Rusin A., Filipczak P., Wolanska K., Krawzyk Z., Kurcok P. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 1833.
- Li H., Chang J. // J. Controll. Rel. 2005. V. 107. № 2. P. 46.
- 17. *Rossi S., Azghani A., Omri A. // J.* Antimicrob. Chemotherapy. 2004. V. 54. P. 1013.
- Duran N., Alvarenga M., Silva E., Melo P., Marcato P. // Arch. Pharm. Res. 2008. V. 31. № 11. P. 1509.
- 19. Zhang C., Zhao L., Dong Y., Zhang X., Lin J., Chen Z. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010. V. 76. P. 10.
- Li F., Tian F., Liu C., Zhao Y. // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 114. № 2. P. 818.
- 21. Shishatskaya E.I., Chlusov I.A., Volova T.G. // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 2006. V. 17. № 5. P. 481.
- 22. *Shishatskaya E.I.* // Macromol. Symp. 2008. V. 269. P. 65.
- Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Puzyr A.P. // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 2005. V. 16. № 5. P. 643.
- Shishatskaya E.I., VoinovLa O.N., Goreva A.V., Mogilnaya O.A., Volova T.G. // J. Mater Sci., Mater Med. 2008. V. 19. № 6. P. 2493.
- Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalacheva G.S., Volova T.G. // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 2011. V. 22. P. 2185.

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ Серия А том 54 № 2 2012

- 26. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Voinova O.N., Volova T.G. // J. Biotechn. 2007. V. 131. № 2. P. 50.
- 27. *Embelton J.K., Tighe B.J.* // Biomaterials. 1992. V. 9. № 1. P. 73.
- 28. *Morello A., Forbes N., Mathiowitz E.* // J. Microencapsul. 2007. V. 24. № 1. P. 40.
- 29. *Burgess D.J.* // Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance / Ed. by J. Swarbrick. LLC, 2005. Sec. 2. P. 39.
- 30. *Holland S., Yasin M., Tighe B.* // Biomaterials. 1990. V. 11. № 1. P. 206.
- 31. Poletto F., Jager E., Re M., Guterres S., Pohlmann A. // Int. J. Pharm. 2007. V. 345. P. 70.
- 32. Wang Y., Wang X., Wei K., Zhao N., Zhang S., Chen J. // Mater. Lett. 2007. V. 61. P. 1071.
- Лившиц В.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.А., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А. // Высокомолек. соед. Б. 2009. Т. 51. № 7. С. 1243.