

*Р. Ю. Косенко¹, А. Л. Иорданский^{1, 2}, В. С. Маркин¹, А. П. Банарцев²,
Г. А. Бонарцева²*

КОНТРОЛИРУЕМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ АНТИСЕПТИКА ИЗ МЕМБРАН НА ОСНОВЕ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА): СОЧЕТАНИЕ ДИФфуЗНОГО И КИНЕТИЧЕСКОГО МЕХАНИЗМОВ

¹ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова, РАН (Москва), Jordan@voxnet.ru;

² Институт биохимии им. А. Н. Баха, РАН (Москва)

С целью достижения контроля высвобождения антисептика (фурацилина) предложена полимерная система на основе биосовместимого и биodeградируемого поли(3-гидроксибутирата) [ПГБ]. Кинетика высвобождения фурацилина из мембран ПГБ, содержащих от 0,5 до 5,0 % лекарственного вещества, в водный раствор исследовалась методом УФ-спектрометрии при 25 °С. Кинетические кривые высвобождения представляют комбинацию диффузионного и кинетического процессов. Проанализирована диффузионная составляющая процесса, измерены коэффициенты диффузии и определена их концентрационная зависимость. Кинетическая константа высвобождения также зависит от содержания фурацилина и связана с гидролитической деструкцией ПГБ, которая наиболее наглядно наблюдается при длительных временах высвобождения (после 1-й недели эксплуатации системы). Изложенные результаты необходимы при дальнейшей разработке систем для высвобождения нескольких лекарственных веществ одновременно с целью достижения комбинированного физиологического эффекта воздействия на ткани и органы биологических систем.

Ферментативный биосинтез поли(3-гидроксибутирата) (ПГБ) и его аналогов (сополимеров и полимеров гомологического ряда поли(3-гидроксиалканоатов)) основан на использовании субстратов, возобновляемых в природной среде. Для бактериального ПГБ главным “строительным материалом” являются отходы углеводов (сахара, меласса, крахмал) пищевой и винодельческой промышленности. Утилизация этих веществ в процессе биосинтеза ПГБ способствует улучшению экологической ситуации.

В последнее десятилетие ПГБ и его сополимеры начинают эффективно использоваться в медицине. Так, например, композиты, включающие ПГБ и его сополимеры, обладают высокой совместимостью с костной тканью, что позволяет использовать их в качестве рассасывающихся остеопротезов [1]. Модифицированный ПГБ представляет высокоэффективный носитель клеток, способствуя их пролиферации, адгезии и продуцированию [2, 3]. Смесевые композиции ПГБ-ПЭГ [4] обладают высокой гемосовместимостью. По мнению авторов [5], поверхности ПГБ и его сополимера с 3-гидроксивалериатом при контакте с кровью не активируют гемостатические изменения на клеточном уровне. Значительный прогресс в кардиоимплантации наблюдается для поли(4-гидроксибутирата) [6]. Искусственные клапаны сердца, изготовленные из поли(4-гидроксибутирата) методом стереолитографии [7] с использованием рентгеновской томографии показали наличие необходимого сочетания механических и гемосовместимых свойств [8]. В [9] описывается случай изготовления стента на основе ПГБ.

Таким образом, ПГБ и его аналоги рассматриваются как новые перспективные медицинские материалы для клеточной инженерии [10], при конструировании

остеопротезов с постепенным замещением биodeградируемого материала прорастающей костной тканью [11] и инженерными материалами для сердечно-сосудистой хирургии [12]. В рамках данной работы особенно следует отметить еще одну область применения ПГБ — конструирование матриц, резервуаров и микрочастиц для контролируемой доставки лекарственных веществ [13 – 15]. В этом случае необходима информация о биосовместимости, скорости резорбции и транспортных характеристиках полимерной системы. Учитывая все вышеизложенное, целью настоящей работы является разработка и изучение терапевтических полимерных систем, включающих ПГБ и антибактериальное средство (фурацилин), предназначенных для контролируемого высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) в биологические водные среды.

Ранее [16] нами было показано, что процесс диффузии воды для пленок толщиной 40 – 60 мкм завершается в течение нескольких десятков минут, после чего мембрана сорбирует предельное равновесное количество воды (~ 1 вес. %). Структурная релаксация матрицы ПГБ при воздействии молекул воды завершается за более длительный период времени (близкий к 1000 мин). Нами исследовалась кинетика высвобождения в течение нескольких десятков суток, поэтому, в первом приближении, транспортные процессы воды в ПГБ не имеют такого решающего значения, как это наблюдается для гидрофильных полимеров типа ПВС и целлюлозы. Вместе с тем, при длительных временах кинетика высвобождения ЛВ из мембран на основе ПГБ имеет сложный характер и требует специального рассмотрения, как с точки зрения диффузионного моделирования процессов высвобождения, так и с точки зрения разработки новых лекарственных форм.

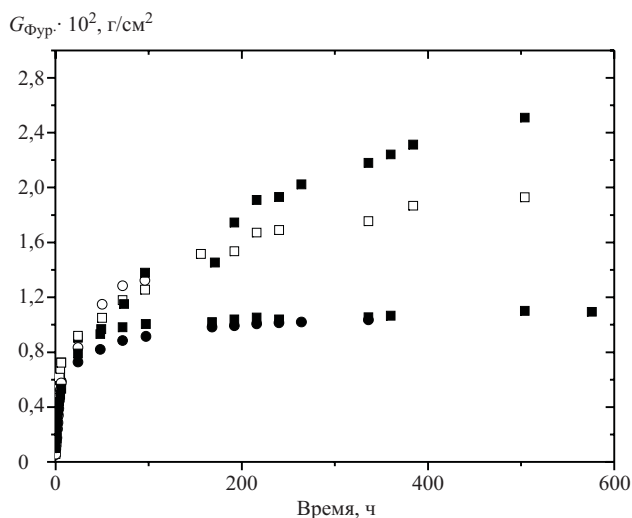


Рис. 1. Зависимости концентраций высвободившегося фурацилина от времени. Цифрами представлены начальные концентрации антисептика, введенного в мембраны ПГБ.

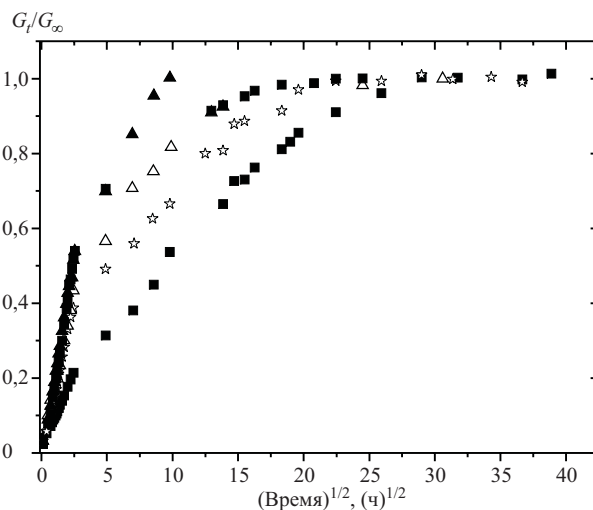


Рис. 2. Вклад диффузии в общую кинетику высвобождения фурацилина из мембран ПГБ толщиной 180 мкм. Цифры на кривых соответствуют исходной концентрации антисептика в пленке: 1 – 1,75 %; 2 – 2,5 %; 3 – 3 %; 5 – 5 %.

Экспериментальная часть

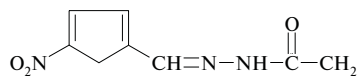
В работе использовался ПГБ марки “Biomer” Lot16F. Растворимость исходного порошка полимера в хлороформе после длительного кипячения составляла примерно 0,01 г/мл. Горячий раствор фильтровали с помощью стеклянного фильтра Шотта и молекулярную массу фильтрата определяли методом вискозиметрии, используя метод и уравнение, предложенные в [17]:

$$[\eta] = 7,7 \times 10^{-5} MW^{0,82},$$

где $[\eta]$ — характеристическая вязкость раствора полимера в хлороформе.

Средневязкостная молекулярная масса полимера MW оказалась равной $183,5 \times 10^3$ г/моль; по приведенной в [17] таблице полидисперсностей полимера среднечисловая молекулярная масса равна $75,5 \times 10^3$ г/моль.

В качестве лекарственного соединения было использовано бактерицидное средство: фурацилин с молекулярной массой 198 и формулой



Основные характеристики данной партии: плотность = 1,25 г/см³; Т. пл. = 178°C; Т_{ст} = 9° С; степень кристалличности = 70 % (определена методом рентгеновской дифракции). Мембраны, содержащие фурацилин, готовили следующим образом:

I стадия — 1 г порошка заливали 50 мл диоксана и кипятили с обратным холодильником до получения однородной массы. Полученный раствор выливали в чашку Петри и сушили при комнатной температуре до постоянного веса. II стадия — навеску полученной массы полимера растворяли в хлороформе, куда добавляли насыщенный раствор фурацилина и далее по

известной методике получали мембраны толщиной 180 ± 10 мкм. Содержание фурацилина в ПГБ составляло: 0,5; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0 и 5,0 % вес. В процессе фильтрования и приготовления пленок исходная загрузочная концентрация ЛВ изменялась особенно заметно для пленок с низким его содержанием. Поэтому для каждой приготовленной мембраны было проведено аналитическое измерение содержания фурацилина. Для этого фурацилин экстрагировали диоксаном и его концентрацию в диоксане определяли методом УФ-спектрометрии.

Для изучения кинетики высвобождения фурацилина образец погружали в ячейку с дистиллированной водой и следили за кинетикой высвобождения фурацилина. Концентрацию фурацилина регистрировали спектрофотометрически на УФ-спектрофотометре фирмы Beckman DU-65.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведены типичные кинетические кривые высвобождения фурацилина из мембран ПГБ, а также зависимость выхода фурацилина (в г/см³) от времени. Как видно из рисунка, для полимерных систем с начальной концентрацией фурацилина, превышающей 1 %, отсутствуют постоянные предельные значения концентраций, которые должны были бы наблюдаться, если высвобождение происходило по диффузионному механизму. Эти кинетические кривые характеризуются начальным, нелинейным от времени отрезком и завершающим отрезком, где концентрация высвободившегося вещества возрастает линейно. Анализ представленных на рис. 1 зависимостей показывает, что сложный характер кинетических кривых обусловлен суперпозицией двух процессов: собственно десорбцией ЛВ по диффузионному механизму и процесса высвобождения с постоянной скоростью нулевого порядка по концентрации. Наиболее отчетливо ли-

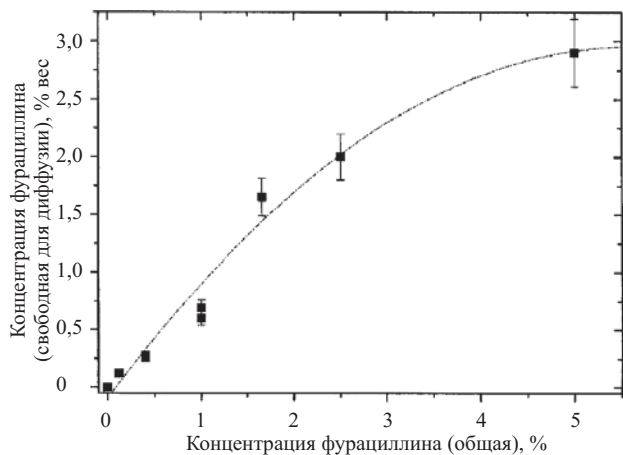


Рис. 3. Зависимость между суммарной (общей) концентрацией фурацилина и его концентрацией, способной к диффузионному высвобождению (свободной), в пленках ПГБ.

нейный характер кривых проявляется после завершения диффузионного этапа и наблюдается в течение 8–10 суток. С учетом вышеизложенного, кинетика высвобождения ЛВ описывается диффузионно-кинетическим уравнением вида

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + k, \quad (1)$$

здесь D — эффективный коэффициент диффузии ЛВ, $\text{см}^2/\text{сек}$; k — кинетическая константа гидролитической деструкции полимера, с^{-1} ; C — концентрация ЛВ, %; x , t — соответственно, координата (см) и время (с) диффузии.

После вычитания линейной части кинетической кривой (kc_t) из экспериментальных значений ординаты ($Ct - dc_t = G_t$) уравнение для условий $G_t/G_\infty > 0,5$ имеет классический вид

$$G_t/G_\infty = 1 - (8\pi^2 \exp(-\pi^2 Dt/L^2)), \quad (2)$$

где L — толщина мембраны ПГБ, см; а остальные значения определены в уравнении (1). Логарифмирование этого уравнения позволяет определить коэффициенты диффузии путем решения графического уравнения в координатах $\lg(1 - G_t/G_\infty) - t$:

$$\lg(1 - G_t/G_\infty) = \lg(8/\pi^2) - \pi^2 Dt/L^2. \quad (3)$$

Компьютерное вычитание линейного вклада в общие значения концентраций ЛВ, соотношенные с осью ординат на рис. 1, было проведено для разделения их диффузионной и кинетической составляющих. Полученный результат обработки результатов, относящийся к собственно диффузионному процессу, приведен на рис. 2. На рис. 2 результаты представлены в классических координатах диффузии, $G_t/G_\infty - t^{1/2}$. Здесь следует отметить два обстоятельства: 1) линейный вид кинетических кривых свидетельствует о справедливости наших предположений о диффузионном характере начального этапа высвобождения (десорбции); 2) угол наклона диффузионных кривых зависит от исходной

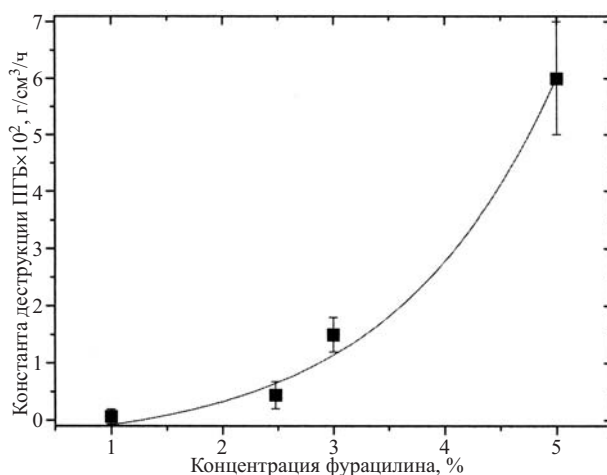


Рис. 4. Зависимость константы высвобождения фурацилина по механизму деструкции ПГБ от концентрации лекарства.

концентрации ЛВ, что показывает существование концентрационной зависимости коэффициентов диффузии фурацилина.

Предельные (равновесные) значения ЛВ (G_∞), сорбированного в мембранах ПГБ, необходимы при построении кинетических кривых, принадлежащих рис. 2. Вместе с тем, эти величины показывают долю ЛВ, участвующего в молекулярной диффузии. На рис. 3 представлена изотерма сорбции фурацилина, соответствующая зависимости его концентрации в свободном состоянии от общей концентрации введенного ЛВ. Из рисунка видно, что обе концентрации линейно соотносятся друг с другом почти во всем исследуемом интервале их значений (до 3%). Отклонение от линейной зависимости наблюдается при максимальной загрузке ЛВ (5%). В этой области фурацилин образует самостоятельную фазу в виде кристаллитов желтого цвета, хотя и в этом случае кинетическая кривая высвобождения по диффузионному механизму не имеет заметных аномалий (см. рис. 2).

Совокупность результатов, представленных на рис. 1 и 2, позволяет оценить эффективные диффузионные коэффициенты для всех концентраций. Концентрационная зависимость коэффициентов диффузии (рис. 4) имеет ярко выраженный максимум в области 1,0–1,5% фурацилина. Восходящая ветвь концентрационной зависимости $D(C)$, по-видимому, обусловлена нарушением порядка структуры ПГБ, которая происходит в результате введения ЛВ. Напротив, нисходящая ветвь этой зависимости связана с образованием кристаллической фазы ЛВ. Образование кристаллической структуры фурацилина в ПГБ, определенное методом рентгено-структурного анализа, наблюдалось в [18].

Ранее мы отметили, что параллельно диффузионному механизму высвобождения наблюдается линейная кинетика высвобождения фурацилина, при этом постоянная скорость высвобождения тем выше, чем выше исходная (начальная) концентрация ЛВ. Более наглядно это следует из рис. 5, где наблюдается экспо-

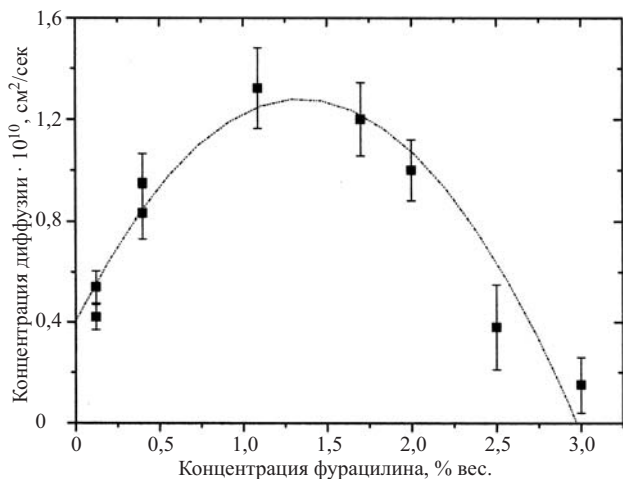


Рис. 5. Концентрационная зависимость коэффициентов диффузии антисептика по контролируемому высвобождению.

нениальная зависимость константы линейного высвобождения (k). Одновременно с измерениями концентрации десорбированного из ПГБ фурацилина были проведены измерения потери веса образца. Гравиметрические измерения показали, что образец теряет массу по аналогичному линейному закону и тем быстрее, чем больше содержание ЛВ в нем. Исходный полимер, не содержащий фурацилина сохраняет свой начальный вес в течение всего времени эксперимента. Предварительные эксперименты показывают, что в отличие от энзиматической деградации ПГБ, реализующейся, как правило, с поверхности, гидролитическая деструкция протекает по всему объему ПГБ с возрастанием хрупкости и уменьшением прочности мембран.

Таким образом, на основе ПГБ нами предложена новая полимерная, система для контролируемого высвобождения лекарственных веществ антисептического действия — фурацилин. Высвобождение реализуется одновременно по диффузионному и кинетическому механизмам в соответствии с реакцией нулевого порядка. Подробно рассмотрена диффузия фурацилина, определяющая скорость высвобождения на начальных временах контакта системы с окружающей средой (первые 6 – 8 дней). Показана зависимость коэффициентов диффузии от концентрации ЛВ. Изложенные результаты необходимы при дальнейшей разработке систем для высвобождения нескольких лекарственных веществ одновременно с целью достижения комбинированного физиологического эффекта воздействия на ткани и органы биологических систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Doyle, E. T. Tanner, and W. Bonfield, *Biomaterials*, **12**, 841 – 847 (1991).
2. S. G. Hu, C. H. Jou, and M. C. Yang, *Carbohydr. Polym.*, **58**, 173 – 179 (2004).
3. S. G. Hu, C. H. Jou, and M. C. Yang, *Biomaterials*, **24**, 2685 – 2693 (2003).

4. G. X. Cheng, Z. J. Cai, and L. Wang, *J. Mater. Sci.*, **14**, 1073 – 1078 (2003).
5. V. I. Sevastianov, N. V. Perova, E. I. Shishatskaya, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, **14**, 1029 – 1042 (2003).
6. D. P. Martin and S. F. Williams, *Biochem Eng. J.*, **16**, 97 – 105 (2003).
7. R. Sodian, M. Loebe, A. Hein, et al., *ASAIO J.*, **48**, 12 – 16 (2002).
8. R. Sodian, S. P. Hoerstrup, J. S. Sperling, et al., *Ann. Thorac. Surg.*, **70**, 140 – 144 (2000).
9. M. Unverdorben, A. Spielberger, A. Schywalsky, et al., *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, **25**, 127 – 132 (2002).
10. G. T. Köse, S. Ber, F. Korkusuz, et al., *Biomaterials*, **24**, 4998 – 5007 (2003).
11. L. J. Chen and M. Wang, *Biomaterials*, **23**, 2631 – 2639 (2002).
12. G.-Q. Chen and Q. Wu, *Biomaterials*, **26**, 6565 – 6578 (2005).
13. D. P. Martin, F. Skraly, and S. F. Williams, US Patent 403242 2003.
14. C. W. Pouton and S. Akhtar, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **18**, 133 – 162 (1996).
15. D. Sendil, I. Gürsel, D. L. Wise, and V. Hasirci, *J. Controlled Release*, **59**, 207 – 217 (1999).
16. А. Л. Иорданский, П. П. Камаев, *Высокомолекулярное соединение*, Сер Б, **41**(1 – 2), 39 – 43 (1999).
17. R. H. Marchessault, K. Okamura, C. J. Su, *Macromolecules.*, **3**(6), 735 – 740 (1970).
18. O. V. Shatalova, A. V. Krivandin, and A. L. Iordanskii, 6th Eur. Symposium on Polymer Blends., Program and Abstracts, May 16 – 19, 1999 Max-Planck-Institut für Polymerforschung. Mainz, PC90, p. 69. Germany (1999).

Поступила 30.03.06

ANTISEPTIC CONTROLLED RELEASE FROM MEMBRANES BASED ON POLY(3-HYDROXYBUTYRATE): COMBINATION OF DIFFUSION AND KINETIC MECHANISM.

R. Yu. Kosenko¹, A. L. Iordanskii^{1, 2}, V. S. Markin¹, A. P. Bonartsev², G. A. Bonartseva²

¹ N. Semenov's Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences; Kosygin str.4; B-334, 19991 Moscow, Russian Federation. iordan@chph.ras.ru;

² A. Bach's Institute of Biochemistry. Russian Academy of Sciences. Leninskiy pr. 33, 119991 Moscow, Russian Federation

For drug controlled release of furacilline (Frc) elaborated the polymer system based on biocompatible and biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) [PHB]. Release kinetics from membranes of PHB loaded by 0,5 – 5,0 wt % Frc into aqueous has been investigated by UV spectroscopy technique at 25°. Profiles of the release comprises diffusional and kinetic impacts. Diffusional component of the release has been analyzed and diffusivity dependence on the drug concentrations has been determined. Kinetics constants of release is directly related with hydrolytic destruction of PHB and dependence on initial concentration of the drug. The destruction of PHB is clearly demonstrated at long-term experiments (after first week of release). These results are required for further elaboration of novel drug delivery systems including a combination of several drugs that will give combined action on tissues and organs of biological systems.