

УДК 541.64:547.47

## МИКРОСФЕРЫ ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА ДЛЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ<sup>1</sup>

© 2009 г. В. А. Лившиц, А. П. Бонарцев\*, \*\*, А. Л. Иорданский \*, \*\*\*,  
Е. А. Иванов\*, Т. А. Махина\*, В. Л. Мышкина\*, Г. А. Бонарцева\*

\*Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН  
119071 Москва, Ленинский пр., 33

\*\*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова. Биологический факультет  
119992 Москва, Ленинские горы, 1

\*\*\* Учреждение Российской академии наук Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН  
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 18.03.2008 г.

Принята в печать 20.01.2009 г.

Исследована кинетика контролируемого высвобождения антипролиферативного лекарственного вещества дипиридамола из микросфер на основе биосовместимого и биоразлагаемого полимера, поли-3-гидроксibuтирата. В качестве носителей дипиридамола использовали микросферы, полученные из раствора поли-3-гидроксibuтирата методом однократного эмульгирования. В условиях *in vitro* кинетические кривые высвобождения дипиридамола для микросфер диаметра 19, 63 и 92 мкм имеют два характерных участка – быстрое выделение лекарственного вещества за относительно короткий период времени и хорошо выраженный длительный линейный участок. Для объектов с диаметром 4 мкм линейный участок не наблюдался. Анализ кинетических кривых контролируемого высвобождения лекарственного вещества в сочетании с измерением деструкции полимера показал, что их кинетический профиль зависит от сочетания диффузионного процесса и гидролитической деструкции поли-3-гидроксibuтирата. Диффузионно-кинетическое уравнение, описывающее линейную и нелинейную стадии высвобождения дипиридамола из микросфер, записано в виде суммы двух слагаемых: десорбции из сферы по диффузионному механизму и высвобождения в результате реакции нулевого порядка соответственно. Линейный участок профиля высвобождения объяснен реакцией гидролиза поли-3-гидроксibuтирата нулевого порядка. Рассчитаны коэффициенты диффузии и кинетические константы. Для микросфер большого диаметра существование на кинетических кривых длительного линейного участка позволит использовать микросистемы поли-3-гидроксibuтират-дипиридамола как новые лекарственные препараты для локальной пролонгированной доставки лекарственного вещества.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние три десятилетия проводятся интенсивные исследования полимерных систем для контролируемого высвобождения биологически активных веществ [1–3]. Пролонгированное введение биологически активных веществ в организм в требуемых дозах позволяет устранить многие ограничения перорального, инъекционного, аэрозольного и других способов использования традиционных лекарственных форм. Среди подобных ограничений чаще всего встречаются

повышенная токсичность и нестабильность веществ, неравномерная скорость их подачи, неэффективный расход действующего начала и т.п.. Применение полимерных систем для контролируемого высвобождения в качестве макроимплантатов и микрочастиц позволяет дозировать и целенаправленно вводить в организм препарат, что особенно важно при терапии хронических заболеваний. Используя полимерную форму лекарственного препарата, можно варьировать время контролируемого высвобождения от нескольких минут (наночастицы) до нескольких месяцев (матрицы и резервуары), что повышает эффективность биологически активного вещества. Несмотря на ряд достоинств полимерных систем для контролируемого высвобождения, нельзя не учитывать их возможные ограничения. К этим ограничениям следует отнести токсичность полимерной матрицы, биологическую не-

<sup>1</sup>Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (коды проектов 06-04-49339 и 08-03-00929-а), Федерального агентства по науке и инновациям (код проекта 02.512.12.2004).

E-mail: liverlin@gmail.com (Лившиц Владимир Александрович); aljordan08@gmail.com (Иорданский Алексей Леонидович).

совместимость, нежелательные побочные продукты биодegradации, необходимость в имплантации и последующем извлечении полимерных систем (справедливо для стабильных полимеров), а также более высокую стоимость полимерных систем для контролируемого высвобождения по сравнению с традиционными лекарственными формами [4].

Одним из перспективных классов препаратов при лечении сердечно-сосудистых [5] и онкологических заболеваний [6] является класс ингибиторов пролиферации клеток (ИПК). Однако при введении ряда ИПК возникают негативные побочные эффекты, характерные для токсичных соединений, снижающие возможности широкого применения данных ингибиторов. Ранее было показано, что антитромбогенный препарат дипиридамол (ДПД) эффективно ингибирует пролиферацию клеток [7], но в отличие от большинства других ИПК обладает меньшим числом негативных эффектов [8]. Благодаря сочетанию эффективности и низкой токсичности, ДПД был выбран нами веществом для разработки и изучения полимерной терапевтической системы пролонгированного действия.

Используя ДПД в качестве действующего лекарственного вещества, W. Zhu с коллегами [9] одни из первых создали систему пролонгированного локального действия ДПД на основе микросфер из сополимера полилактида с полигликолидом, которая функционировала в течение 35 суток. Ими было показано, что высвобождение данного биологически активного вещества происходит в два этапа: вначале по механизму диффузии из полимера, а на втором этапе – при участии ферментативной деструкции полимера.

Однако использование полилактидов, полигликолидов и их сополимеров сопряжено с рядом осложнений, связанных с развитием хронической воспалительной тканевой реакции в ответ на имплантацию этих полимеров [10, 11]. Некоторые исследователи применяли биосовместимые покрытия [12] или биологически активные вещества [13–17] для уменьшения воспалительной реакции окружающих тканей.

В качестве альтернативы полилактидам, полигликолидам и их сополимерам при создании полимерных систем для контролируемого высвобождения мы использовали бактериальный поли-3-гидроксibuтират (ПГБ) [18, 19]. В последнее время ПГБ и его сополимеры, полученные биотехнологическим способом, привлекают большое внимание как биодegradируемые и биосовместимые полимеры для применения в медицине. Физико-химические и биологические свойства ПГБ позволяют широко использовать этот полимер для создания различных имплантируемых медицинских изделий: сосудистых протезов, пародонтологических мембран, протезов для остеосинте-

за и регенерации хрящевой ткани, а также для нанесения биосовместимых покрытий на другие медицинские изделия (сетчатые эндопротезы, стенты, сосудистые протезы) и т.п. [20]. Кроме того, способность ПГБ к инкапсуляции и дальнейшему пролонгированному высвобождению различных химических веществ, в том числе обладающих фармакологической активностью, позволяет использовать его для создания лекарственных полимерных систем для контролируемого высвобождения [21].

К настоящему времени накоплена значительная экспериментальная база, демонстрирующая высокую биосовместимость ПГБ. В экспериментах *in vitro* при выращивании клеток на подложках из ПГБ регистрировали хорошую выживаемость и пролиферацию клеток различных типов, а также установили низкую воспалительную реакцию ткани на имплантированный материал [22–30].

Высокая биосовместимость ПГБ обусловлена следующими обстоятельствами: бактериальный ПГБ обладает стереоспецифичностью [31]; ПГБ в виде олигомеров (до 150 остатков 3-гидроксимасляной кислоты) присутствует в тканях и крови млекопитающих [31–35]; промежуточным продуктом биодеструкции ПГБ является 3-оксимасляная кислота, которая в норме присутствует в крови и межклеточной жидкости [36, 37]; ферментативная биодеструкция ПГБ идет гораздо медленнее ферментативной деструкции полилактидов, что понижает локальную концентрацию продуктов разложения полимера [28].

Цель настоящей работы – создание и исследование систем контролируемого высвобождения на основе микросфер из ПГБ, что должно способствовать получению новых полимерных лекарственных систем. Использование ДПД в качестве биологически активного вещества в создаваемых системах контролируемого высвобождения в перспективе позволит разработать новую инъекционную лекарственную систему, отличающуюся от традиционной локальным долговременным антипролиферативным действием.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штамм-продуцент ПГБ *Azotobacter chroococcum* 7Б, способный синтезировать до 80% ПГБ от сухой массы клеток. Для достижения сверхсинтеза ПГБ культуру *Azotobacter* выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.4;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.01;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 0.006; цитрат Na – 0.5;  $CaCl_2$  – 0.1;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 1.05;  $KH_2PO_4$  – 0.2; сахароза – 40; процесс вели в течение 48 ч в аэробных условиях при 28°C. Выход сухой биомассы со-

**Таблица 1.** Условия получения микросфер различного диаметра на основе ПГБ, загруженных определенным количеством ДПД

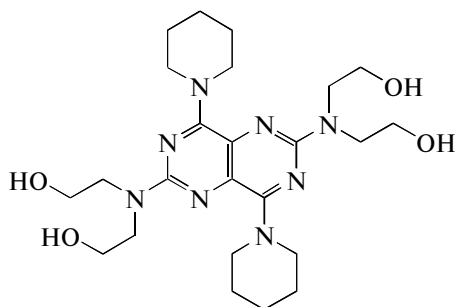
Масса компонентов в растворе, мг		Объем растворителя, мл	Концентрация ПВС, мас. %	Скорость перемешивания, об/мин	Диаметр микросфер, мкм	Содержание ДПД в микросферах из ПГБ, мас. %
ДПД	ПГБ					
24	96	8	1.2	2000	3.6 ± 2.4	4.8 ± 0.4
24	96	9	0.6	1000	18.7 ± 2.9	5.2 ± 0.4
24	96	5	0.4	600	62.7 ± 6.6	4.9 ± 0.4
47	100	4	0.6	500	91.7 ± 15.4	11.0 ± 0.5

ставлял 10 г/л среды. Содержание полимера в клетках *Azotobacter* – 76% от сухой массы клеток. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы *Azotobacter chroococcum* включал растворение ПГБ в хлороформе путем встряхивания на качалке при 37°C в течение 12 ч, отделение раствора ПГБ от клеточных остатков фильтрованием, выделение ПГБ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом. После трехкратного растворения ПГБ в хлороформе и осаждения изопропанолом очистку завершали высушиванием полимера на воздухе при 60°C.

ММ полимера определяли методом вискозиметрии: вязкость раствора ПГБ в хлороформе измеряли при 30°C в вискозиметре “RT RHEOTEC” (“RheoTec”, Германия) и вычисляли ММ по уравнению Марка–Куна–Хаувинка, используя значение характеристической вязкости раствора полимера в хлороформе  $[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} M^{0.82}$  [38]; она составляла  $485 \times 10^3$ .

Химическая структура, тип кристаллической решетки и степень кристалличности (0.74) используемого в работе полимера были определены ранее методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-Фурье спектроскопии и РСА [39].

В работе были получены микросферы, загруженные ДПД, с использованием метода одинарного эмульгирования [9]. Химическая структура молекулы ДПД представлена ниже.



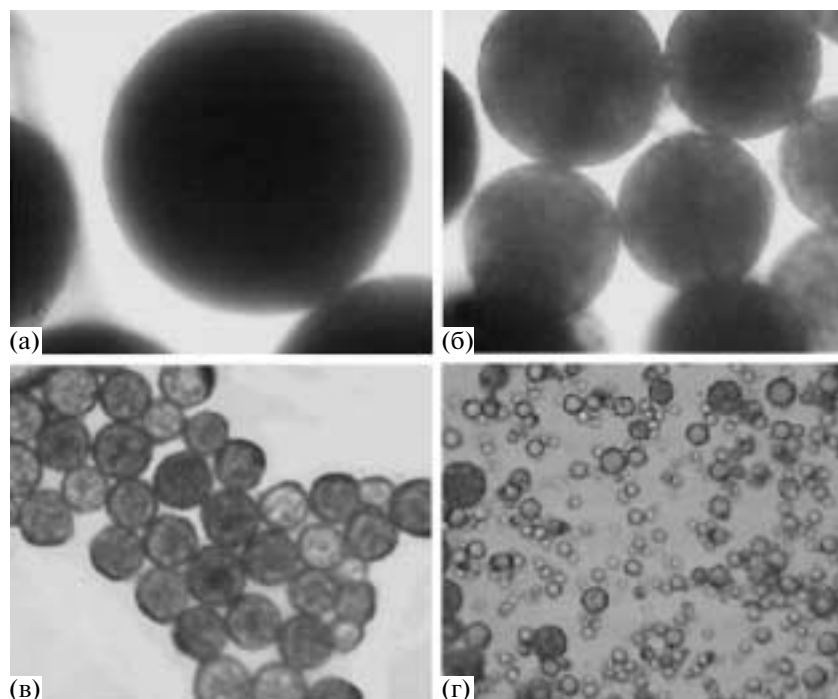
ДПД и ПГБ в соотношении 1 : 4 растворяли в хлороформе (4–9 мл) и постепенно добавляли к 300 мл водного раствора ПВС различной концентрации (0.4–1.2 мас. %) при перемешивании. Пе-

ремешивание проводили в течение 2 ч, используя механическую верхнеприводную мешалку RZR 2021 (“Heidolph”, Германия) при 600–2000 об/мин или гомогенизатора “SilentCruiser M” (“Heidolph”, Германия) при 20000 об/мин. После полного испарения органического растворителя при нагревании до 45°C более однородные по размеру фракции микросфер получали фильтрованием через стеклянные фильтры с различным диаметром пор (16 и 40 мкм). Разделенные таким образом микросферы отделяли повторно центрифугированием (6 мин при 4400 об/мин) с использованием центрифуги 5702 R (“Eppendorf”, Германия), а затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора и ДПД на поверхности сфер. Затем микросферы сушили в термостате при 60°C, и полученный порошок аккуратно растирали в ступке.

Содержание ДПД в микросферах определяли после их растворения в хлороформе измерением светопоглощения на спектрофотометре DU-650 (“Beckman Coulter”, США), максимумы поглощения при длине волны 293 и 415 нм, при сравнении с контрольным раствором ПГБ и ДПД в хлороформе.

Как видно из результатов табл. 1, наиболее значимым фактором, ответственным за размеры микросфер, является скорость перемешивания.

Контролируемое выделение ДПД из микросфер проводили при 37°C в термостате ТС-1/20 (Россия) в фосфатном буфере (pH 7.4) с небольшим добавлением эмульгатора (0.05% “Triton X-10” по объему): четыре партии микросфер по 5 мг микросфер в 4 мл буфера перемешивали в бюксах при 50 об/мин на магнитной мешалке MS-01 (“Elmi”, Латвия). При исследовании кинетики выделения ДПД через заданные интервалы времени микросферы отделяли от буфера центрифугированием при 14000 об/мин на центрифуге 5702 R (“Eppendorf”, Германия) и добавляли 4 мл свежего буфера. Содержание ДПД в буфере определяли спектрофотометрически при сравнении с фосфатным буфером. Коэффициенты экстинкции ДПД при длине волны 293 и 415 нм ( $\epsilon_{293} = 54245$  и  $\epsilon_{415} = 15340$  л/(моль см)) находили по



**Рис. 1.** Микрофотографии микросфер из ПГБ диаметром  $92 \pm 13$  (а),  $63 \pm 7$  (б),  $19 \pm 3$  (в) и  $4 \pm 2$  мкм (г) в исходном состоянии, помещенных в фосфатный буфер.

калибровочным графикам. Остаточное содержание ДПД в микросферах находили, растворяя их в заданном количестве растворителя, с последующим определением концентрации ДПД в растворе спектрофотометрически путем сравнения с контрольными растворами известной концентрации.

Средний диаметр и стандартное отклонение полученных партий микросфер рассчитывали по микрофотографиям, полученным при помощи микроскопа “Биомед 1 Вариант 2” (“Биомед”, Россия) с цифровым окуляром “MUScore 300M” (“Webbers”, Тайвань).

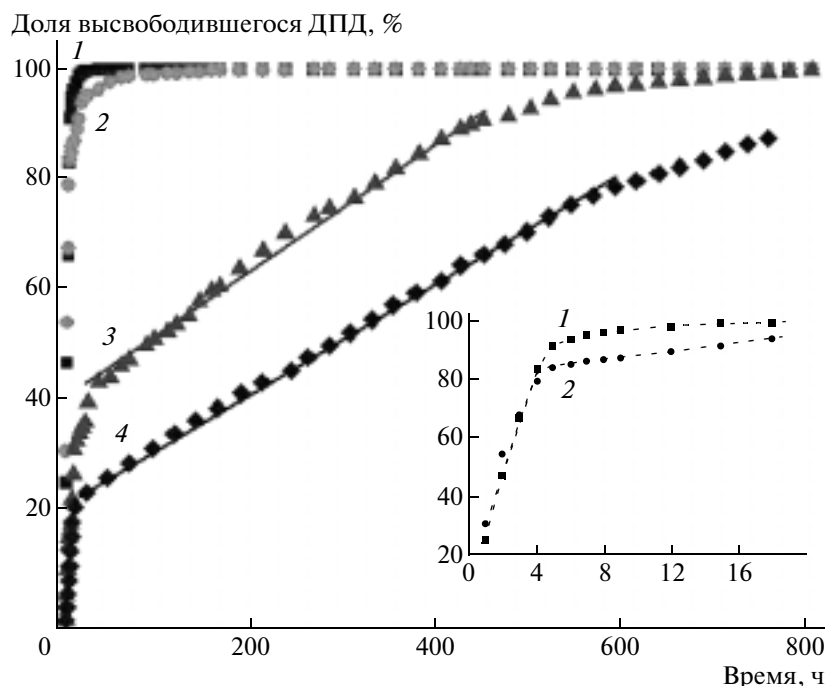
Условия эксперимента (скорость перемешивания, объем и концентрация исходных растворов) для получения микросфер различного диаметра с инкапсулированным в полимер ДПД с определенной массовой долей приведены в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микрофотографии сферических микрочастиц ПГБ различного диаметра с инкапсулированным ДПД представлены на рис. 1. Видно, что эти микрочастицы имеют правильную сферическую форму без видимых дефектов. Они прокрашены по всему объему, не имеют видимых включений (уплотнений) или пустот; это позволяет предположить, что ДПД достаточно равномерно распределен по всему пространству микросфер.

Кинетические профили высвобождения ДПД в фосфатный буфер из микросфер ПГБ различного диаметра представлены на рис. 2. Кинетические кривые 3 и 4 на этом рисунке, принадлежащие микросферам большего диаметра 63 и 92 мкм соответственно, имеют два характерных участка: быстрая десорбция лекарственного вещества (**ЛВ**) при относительно малых временах и хорошо выраженный и протяженный линейный участок, соответствующий кинетике высвобождения нулевого порядка. При завершении высвобождения из микросфер диаметром 63 мкм при длительных временах наблюдается небольшое изменение угла наклона кинетической кривой. Для микросфер относительно меньшего диаметра – 19 мкм (кривая 2) также можно отметить небольшой линейный участок в интервале 6–21 ч, а для самых маленьких 4-микронных объектов такой участок трудно выделить (кривая 1).

Аналогичная по виду кинетика высвобождения наблюдалась и хорошо была описана для микросфер на основе сополимеров полилактида и полигликолида и 5-фторурацила [40]. Отличие состояло в том, что наряду с приведенными выше двумя стадиями высвобождения (линейной и неллинейной) в системе имеется третий временной участок, где на завершающей стадии кинетики высвобождения наблюдался резкий выброс ЛВ. Совсем недавно в нашей работе, описывающей кинетические профили высвобождения ДПД из пленок ПГБ, также было обнаружено наличие



**Рис. 2.** Кинетический профиль высвобождения ДПД из микросфер на основе ПГБ диаметром 4 (1), 19 (2), 63 (3) и 92 мкм (4), помещенных в фосфатный буфер при 37 (на вставке – начальный участок кривых 1 и 2). Прямыми линиями отмечены линейные участки кинетических кривых 3 и 4.

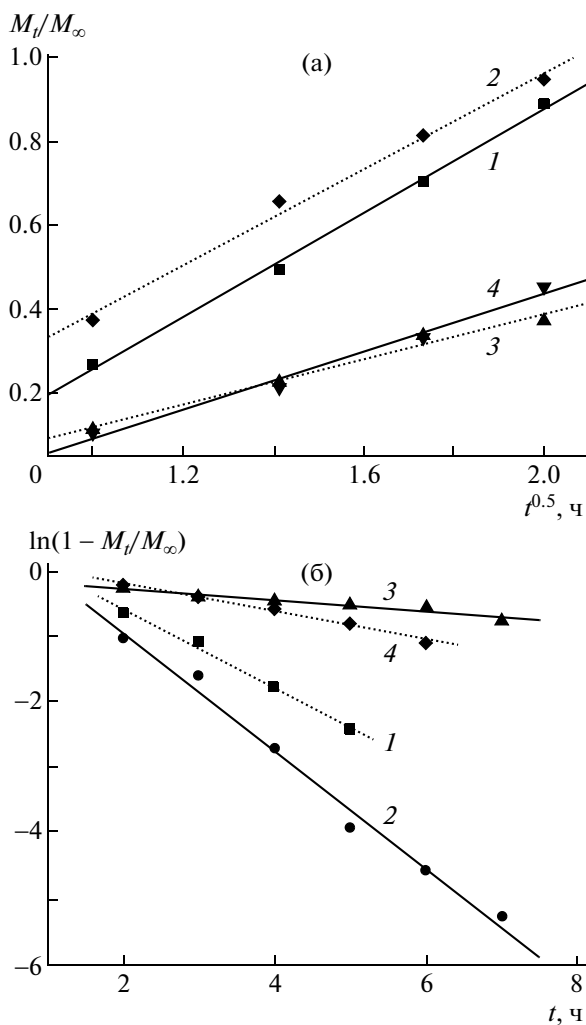
двух аналогичных стадий высвобождения ЛВ без завершающей стадии его выброса [21]. Толщина пленок ПГБ (10, 20 и 40 мкм) близка к диаметру исследуемых в настоящей работе микрочастиц.

В настоящее время общепринятым является установленный факт, что при контролируемом высвобождении ЛВ из полимерных систем доминируют диффузионные процессы. Они протекают прежде всего потому, что в многокомпонентной системе (а именно такой является микрочастица, содержащая ЛВ, воду, низкомолекулярные компоненты фосфатного буфера – *in vitro* или компоненты биологических сред – *in vivo*) возникают градиенты химических потенциалов указанных выше компонентов. При этом потоки диффундирующих веществ могут быть противоположно направленными. Так, например, поток ЛВ направлен из микросферы в окружающую среду, тогда как поток воды имеет встречное направление. Если учесть, что диффузионные явления могут быть осложнены структурной релаксацией, химическими (каталитическими) реакциями макромолекул, порообразованием в полимерной матрице и рядом других процессов, то становится понятным, почему для предсказания профиля скорости контролируемого высвобождения требуется изучение совокупности нескольких химических и физических процессов.

При высвобождении 5-фторурацила из микрочастиц на основе статистических сополимеров

полилактида и полигликолида в условиях *in vitro* Шипман и сотрудники наблюдали три стадии, характеризующиеся различными механизмами высвобождения [40–42]: на раннем этапе высвобождения доминирует диффузионный процесс, когда скорость выхода ЛВ нелинейная и весьма высокая (в литературе ее часто называют “burst effects” – “взрывной” эффект); центральная часть кинетического профиля высвобождения, по мнению Шипмана и сотрудников, представляет комбинацию диффузии ЛВ и деструкции макромолекул, что отражает линейный характер этого участка; на завершающем этапе разрушение полимерной сетки вызывает резкий выброс ЛВ (см. рис. 12 в работе [40]).

В наших последних работах по высвобождению 5-нитрофурфуриленсемикарбазона (как модельного антисептика) [43], ДПД или индометацина [21] из пленок ПГБ в условиях *in vitro* было показано, что кинетический профиль для всех трех систем имеет начальную диффузионную стадию, плавно переходящую в линейную стадию, где отсутствует третий этап, отражающий разрушение сетки полимера. Таким образом, кинетические профили высвобождения ЛВ из ПГБ как в виде пленок, так и в виде микросфер качественно похожи друг на друга. Принимая в целом предложенную трехстадийную схему высвобождения, отметим, что для ПГБ, имеющего большую гидролитическую устойчивость по сравнению с по-



**Рис. 3.** Начальный (а) и конечный (б) участки кинетических кривых, описывающих диффузионную стадию высвобождения ДПД из микросфер на основе ПГБ диаметром 4 (1), 19 (2), 63 (3) и 92 мкм (4). Данные представлены в координатах уравнения (3) и в полулогарифмических координатах уравнения (6).

лигликолидами, полилактидами и их сополимерами, завершающий этап разрушения сетки отсутствует и, следовательно, резкий выброс ДПД из пленок и микросфер не наблюдается (рис. 2). Более того, нам представляется, что существование линейных участков кинетических кривых высвобождения, характерных для пленок [21, 43] и для микросфер, может быть объяснен не столько комбинацией диффузии и гидролитической деструкции, а скорее доминирующей реакцией нулевого порядка, отражающей начало развития гидролитической деструкции молекул ПГБ в условиях *in vitro*.

Диффузионно-кинетическое уравнение, описывающее линейную и нелинейную стадии высвобождения ДПД из сферических объектов, как и в работах [21, 43], может быть записано в виде

суммы двух вкладов: десорбции из сферы по диффузионному механизму (первое слагаемое в уравнении (1)) и высвобождения по реакции нулевого порядка (второе слагаемое)

$$\partial G_t / \partial t = D[\partial^2 G_t / \partial z^2 + (2/z)(\partial G_t / \partial z)] + k \quad (1)$$

Здесь  $D$  – постоянный (или интегральный) коэффициент диффузии ЛВ в полимерной микросфере ( $\text{см}^2/\text{с}$ );  $G_t(z, t)$ ,  $\partial G_t / \partial z$  и  $\partial^2 G_t / \partial z^2$  – текущая концентрация ЛВ (%), ее первая и вторая производные по координате диффузии ( $z$ ) соответственно;  $\partial G_t / \partial t$  – первая производная концентрации ЛВ по времени диффузии ( $t$ ) и  $k$  – константа гидролитического процесса деструкции ПГБ ( $\text{с}^{-1}$ ). Переход от уравнения (1) к традиционному диффузионному уравнению, справедливому для сферического объекта и, следовательно, для микросфер, проводили путем введения новых переменных  $C_t \equiv G_t - kt$  и  $u = C_t z$ :

$$\partial u / \partial t = D[\partial^2 u / \partial z^2] \quad (2)$$

Граничные и начальные условия для решения уравнения (2) записывали стандартным образом, справедливым для процесса десорбции из сферических объектов [44]: при  $t = 0 \rightarrow C_0 = \text{const}$  в интервале  $0 < z < R$ , при  $t > 0$  и  $z = R \rightarrow C_0 = 0$ , при  $t > 0$  и  $z = 0 \rightarrow u = C_t z = 0$ .

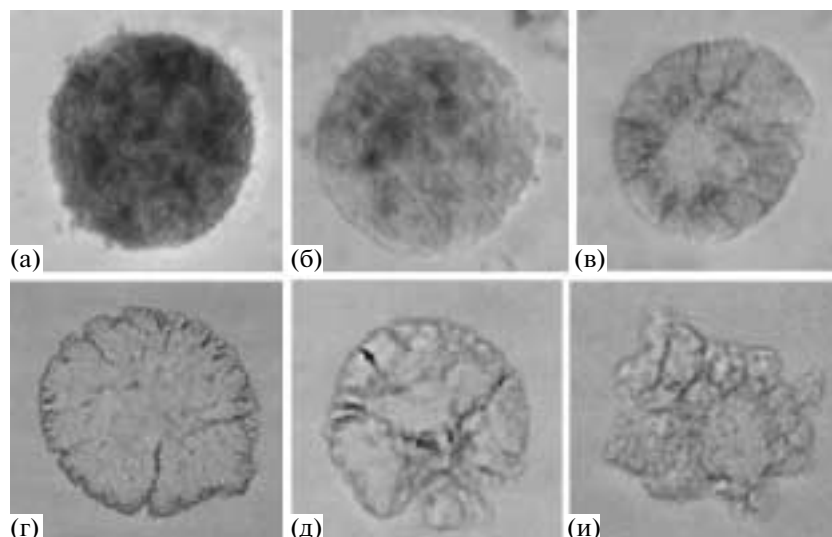
При отсутствии осложнений, возникающих на границе микросфера–водная среда (в данном случае это фосфатный буфер), в частности при отсутствии концентрационной поляризации, высвобождение ЛВ из сферических объектов подчиняется уравнению (2), описывающему диффузионный механизм десорбции низкомолекулярных веществ [44].

При относительно малых временах на начальном участке кинетической кривой десорбции, т.е. при условии  $M_t/M_\infty \leq 0.5-0.6$ , в качестве решения уравнения (2) справедлива аппроксимация

$$M_t/M_\infty = 6[(Dt/\pi^2 R^2)^{0.5}], \quad (3)$$

$M_t$ ,  $M_\infty$  – оммулятивная масса ЛВ, десорбированного из микросфер в момент времени  $t$  и при бесконечном времени ( $t \rightarrow \infty$ );  $R$  – средний радиус микросферы; остальные обозначения аналогичны обозначениям уравнения (1).

Графическое решение уравнения (3) в координатах  $(M_t/M_\infty) - t^{0.5}$  позволяет использовать его как критерий диффузионного механизма высвобождения ЛВ и одновременно количественно определить значение его коэффициента диффузии в полимерной фазе. На рис. 3 показаны начальные отрезки кинетических кривых высвобождения ДПД из микросфер ПГБ различного диаметра. Эти кривые представлены в координатах: относительная масса ЛВ, вышедшего из микросфер ДПД ( $M_t/M_\infty$ ) – корень квадратный из времени. Из уравнения (3) следует, что коэффи-



**Рис. 4.** Гидролитическая деградация микросфер из ПГБ диаметром 60 мкм с инкапсулированным ДПД на 1 (а), 5 (б), 12 (в), 17 (г), 20 (д) и 25 суток (е) инкубации в фосфатном буфере (рН 7.4) при 37.

циенты диффузии могут быть легко получены на основании соотношения

$$D_{\beta} = \pi^2 R^2 (\operatorname{tg} \beta)^2 / 36 \quad (4)$$

Здесь  $\operatorname{tg} \beta$  – тангенс угла наклона прямолинейного участка кинетической кривой в координатах  $(M_t/M_{\infty}) - (t)^{0.5}$ . Значения коэффициентов диффузии ДПД, рассчитанные по уравнению (4) для микросфер различного диаметра, представлены в табл. 2. Как и в работе [45], для исследуемой системы ПГБ–ДПД наблюдается резкая зависимость коэффициентов диффузии от радиуса микрочастиц.

Продолжая анализ кинетических кривых в рамках диффузионного уравнения (2), отметим, что для относительно больших времен экспозиции микросфер в фосфатном буфере, а точнее при выполнении условия  $M_t/M_{\infty} \geq 0.5$ , решение этого уравнения имеет совершенно другой вид:

$$M_t/M_{\infty} = 1 - (6/\pi^2) \exp[-D_{\alpha} \pi^2 t / R^2] \quad (5)$$

Коэффициент диффузии в этом случае также определяется путем графического решения уравнения (5) в полулогарифмических координатах  $\ln(M_t/M_{\infty}) - t$ , а именно

$$\ln[1 - (M_t/M_{\infty})] = \ln(6/\pi^2) - D_{\alpha} \pi^2 t / R^2 \quad (6)$$

Примеры такого решения для микросфер различного диаметра представлены на рис. 3. Линейные участки кинетических кривых, отображенные в полулогарифмических координатах, позволяют рассчитать тангенс угла наклона  $\operatorname{tg} \alpha$ , а затем и собственно интегральный коэффициент диффузии

$$D_{\alpha} = \operatorname{tg} \alpha R^2 / \pi^2 \quad (7)$$

Отметим, что в случае молекулярной диффузии, подчиняющейся классическому уравнению Фика, следует ожидать равенства коэффициентов диффузии  $D_{\alpha} = D_{\beta}$ , рассчитанных двумя независимыми методами на начальном и завершающем участке кинетической кривой десорбции ЛВ по уравнениям (4) и (7). Действительно, из табл. 2 следует близость значений коэффициентов диффузии, рассчитанных для разных участков диффузионных кривых, что свидетельствует о классическом диффузионном механизме, определяющим кинетику первой стадии профиля высвобождения.

Одновременно с диффузией наблюдается линейная кинетика выхода ДПД (рис. 2). Вклад линейного кинетического процесса становится особенно заметен после завершения диффузионной стадии. При этом постоянная скорость высвобождения слабо зависит от диаметра частиц. Более наглядно это наблюдается для самых крупных по диаметру микрочастиц, что показано на этом

**Таблица 2.** Коэффициенты диффузии ДПД, выделяющегося из микросфер на основе ПГБ, определяющие диффузионную стадию выделения (уравнениям (4) и (7))

Диаметр микросферы $d \times 10^3$ , см	Коэффициент диффузии $D \times 10^{11}$ , см <sup>2</sup> /с	
	расчет по уравнению (7)	расчет по уравнению (4)
0.4	0.1	0.08
1.9	1.5	2.0
6.3	2.8	2.6
9.2	21.1	16

же рисунке. Тангенсы наклона линейных участков близки и соответствуют константе гидролитической деструкции ПГБ, подобно тому как это было показано ранее для его пленок. Собственно скорость гидролитического процесса деструкции ПГБ по уравнению нулевого порядка не зависит от размера образца, что и наблюдается на приведенном рисунке.

Внешний вид кривых и низкая скорость высвобождения ДПД удовлетворительно согласуются с кинетикой потери массы биополимера, измеренной в тех же условиях для пленок ПГБ приблизительно той же толщины (40 мкм), что и диаметры микросфер [46]. За исключением начального отрезка времени, где наблюдается высокая скорость потери массы (так называемый "burst effect" [47]), основное падение массы пленок во времени также протекает линейно, т.е. в соответствии с кинетическим уравнением нулевого порядка. Медленная потеря массы образцов в том же временном интервале, что и линейное высвобождение ДПД, свидетельствует о развитии гидролитической деструкции макромолекул ПГБ. Достаточно наглядно существование деструкции подтверждается серией фотографий микрочастиц, полученных через различные промежутки времени их нахождения в буферном фосфатном растворе (рис. 4). Таким образом, как потеря массы ПГБ, так и наблюдаемая потеря формы и деградация микросфер с инкапсулированным ДПД свидетельствуют о существенном вкладе гидролитического процесса в процесс высвобождения ДПД.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы сообщаем о создании микросфер различного диаметра (от 4 до 92 мкм в диаметре), полученных из биodeградируемого ПГБ и биологически активного вещества ДПД. В фосфатном буфере при 37°C эти микросферы обладают пролонгирующим эффектом, который проявляется в длительном (более месяца) высвобождении ДПД с постоянной скоростью. Анализ кинетических кривых высвобождения ЛВ в сочетании с предыдущими измерениями потери массы ПГБ, а также с учетом изменения внешнего вида частиц показал, что их кинетический профиль зависит от комбинации диффузионного процесса и гидролитической деструкции биополимера. Измерены диффузионные константы, показана их связь с диаметром микрочастиц. Для микросфер большого диаметра существование на кинетических кривых длительного линейного участка позволит использовать ПГБ–ДПД микросистемы для локальной контролируемой доставки ЛВ. Введение ДПД в полученные микросферы ПГБ представляется перспективным при создании новых инъекционных лекарственных

систем локального долговременного антипролиферативного и антитромбогенного действия, например для предотвращения развития рестеноза (сужения диаметра) сосудов, часто наблюдаемого после кардиохирургических операций.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Валуев Л.И., Валуева Т.А., Валуев И.Л., Платэ Н.А.* // Успехи биол. химии. 2003. Т. 43. № 1. С. 307.
2. *Katz B., Rosenberg A., Frishman W.H.* // Am. Heart J. 1995. V. 129. P. 359.
3. *Lindsay M.A.* // Drug Discovery Today. 2005. V. 10. P. 1683.
4. *Brannon-Peppas L.* // Medical Plastics and Biomaterials. 1997. № 11. P. 46.
5. *Sarkar K., Sharma S.K., Sachdeva R., Romeo F., Garza L., Mehta J.L.* // Expert Rev Cardiovasc Ther. 2006. V. 4. P. 543.
6. *Kufe D.W., Pollock K.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C.Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei III E.* Holland Frei Cancer Medicine. Sec. 12: Chemotherapeutic Agents. Ontario: BC Decker Inc, 2003.
7. *Masaki T., Kamerath C.D., Kim S.J., Leyboldt J.K., Mohammad S.F., Cheung A.K.* // Blood Purif. 2004. V. 22. P. 307.
8. *Serebruany V.L., Malinin A.I., Eisert R.M., Sane D.C.* // Am. J. Hematol. 2004. V. 75. P. 40.
9. *Zhu W., Masaki T., Bae Y.H., Rathi R., Cheung A.K., Kern S.E.* // J. Biomed. Mater. Res. 2006. V. 77. № 4. P. 135.
10. *Solheim E., Sudmann B., Bang G., Sudmann E.* // J. Biomed. Mater. Res. 2000. V. 49. № 2. P. 257.
11. *Bostman O., Pihlajamaki H.* // Biomaterials. 2000. V. 21. № 12. P. 2615.
12. *Lickorish D., Chan J., Song J., Davies J.E.* // Eur. Cell. Mater. 2004. V. 13. № 8. P. 12.
13. *Khoun I.M., van Wachem P.B., de Leij L.F., van Luyn M.J.* // J. Biomed. Mater. Res. 1998. V. 41. P. 202.
14. *Su S.H., Nguyen K.T., Satasiya P., Greilich P.E., Tang L., Eberhart R.C.* // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 2005. V. 16. № 3. P. 353.
15. *Ignatius A.A., Claes L.E.* // Biomaterials. 1996. V. 17. № 8. P. 831.
16. *Rihova B.* // Adv. Drug. Delivery Rev. 1996. V. 21. P. 157.
17. *Ceozzo K., Gaynor A., Shaffer L., Kojima K., Vacanti C.A., Stahl G.L.* // Tissue Eng. 2006. V. 12. № 2. P. 301.
18. *Fambri L., Migliaresi C., Kesenci K., Piskin E.* // Biodegradable Polymers. In Integrated Biomaterial Science / Ed. by R. Barbucci. New York: Springer, 2007. P. 119.
19. *Hazer B., Steinbьchel A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 1.
20. *Chen G.Q., Wu Q.* // Biomaterials. 2005. V. 26. № 11. P. 6565.
21. *Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Лучинина Е.С., Лившиц В.А., Бос-*



- хонджиев А.П., Маркин В.С., Иорданский А.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 710.
22. Kunze C., Edgar Bernd H., Androsch R., Nischan C., Freier T., Kramer S., Kramp B., Schmitz K.P. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 2. P. 192.
23. Wollenweber M., Domaschke H., Hanke T., Boxberger S., Schmack G., Gliesche K., Scharnweber D., Worch H. // *Tissue Eng.* 2006. V. 12. № 2. P. 345.
24. Nebe B., Forster C., Pommerenke H., Fulda G., Behrend D., Bernewski U., Schmitz K.P., Rychly J. // *Biomaterials*. 2001. V. 22. № 9. P. 2425.
25. Deng Y., Lin X.S., Zheng Z., Deng J.G., Chen J.C., Ma H., Chen G.Q. // *Biomaterials*. 2003. V. 24. № 8. P. 4273.
26. Pompe T., Keller K., Mothes G., Nitschke M., Teese M., Zimmermann R., Werner C. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 1. P. 28.
27. Qu X.H., Wu Q., Liang J., Zou B., Chen G.Q. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 4. P. 2944.
28. Qu X.H., Wu Q., Zhang K.Y., Chen G.Q. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 7. P. 3540.
29. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Puzyr A.P., Mogilnaya O.A., Efremov S.N. // *J. Mater. Sci., Mater. Med.* 2004. V. 15. № 6. P. 719.
30. Kramp B., Bernd H.E., Schumacher W.A., Blynow M., Schmidt W., Kunze C., Behrend D., Schmitz K.P. // *Laryngorhinootologie*. 2002. V. 81. № 5. P. 351.
31. Seebach D., Brunner A., Burger H.M., Schneider J., Reusch R.N. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 224. № 2. P. 317.
32. Reusch R.N., Huang R., Kosk-Kosicka D. // *FEBS Lett.* 1997. V. 412. № 3. P. 592.
33. Reusch R.N., Bryant E.M., Henry D.N. // *Acta Diabetol.* 2003. V. 40. № 2. P. 91.
34. Norris V. // *Cell. Mol. Biol.* 2005. V. 14. № 7. P. 629.
35. Theodorou M.C., Panagiotidis C.A., Panagiotidis C.H., Pantazaki A.A., Kyriakidis D.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1760. № 6. P. 896.
36. Larsen T, Nielsen N.I. // *J. Dairy Sci.* 2005. V. 88. № 6. P. 2004.
37. Wiggam M.I., O'Kane M.J., Harper R., Atkinson A.B., Hadden D.R., Trimble E.R., Bell P.M. // *Diabetes Care.* 1997. V. 20. P. 1347.
38. Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. // *Macromolecules.* 1976. V. 9. P. 774.
39. Ребров А.В., Дубинский В.А., Некрасов Ю.П., Бонарцева Г.А., Stamm М., Антипов Е.М. // *Высокомолек. соед. Б.* 2002. Т. 44. № 2. С. 347.
40. Siepmann J., Siepmann F. // *Progr. Colloid Polym. Sci.* 2006. V. 133. P. 15.
41. Siepmann J., Faisant N., Benoit J.P. // *Pharm. Res.* 2002. V. 19. P. 1885.
42. Siepmann J., Elkharraz K., Siepmann F., Klose D. // *Biomacromolecules.* 2005. V. 6. P. 2312.
43. Kosenko R.Y., Pankova Y.N., Iordanskii A.L., Zaikov G.E. // *J. Balkan Tribological Association.* 2007. V. 13. P. 242.
44. Crank J. // *The Mathematics of Diffusion.* Oxford: Clarendon Press, 1975.
45. Witt C., Kissel T. // *Eur. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics.* 2001. V. 51. P. 171.
46. Bonartsev A.P., Livshits V.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. // *eXPRESS Polym. Lett.* 2007. V. 1. № 12. P. 797.
47. Hasan A.S., Socha M., Lamprecht A., Ghazouani F.E., Sapin A., Hoffman M., Maincent P., Ubrich N. // *Int. J. Pharmaceutics.* 2007. V. 344. P. 53.