

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» Институт  
фундаментальной биологии и биотехнологии Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Функциональные характеристики микросферических носителей биологически  
активных веществ для реконструктивных технологий мягких тканей

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель \_\_\_\_\_ д.б.н., профессор Е. И. Шишацкая

Выпускник \_\_\_\_\_ А. В. Владимирова

Рецензент \_\_\_\_\_ д.м.н., профессор Ю. Ю. Винник

Красноярск, 2018

## АННОТАЦИЯ

Микросферы из ПГА с инкапсулированными антисептиками «Бриллиантовый зеленый», «Фурацилин» и «Мирамистин» были получены с помощью эмульсионного метода. Размер частиц варьировался в диапазоне от  $5,64 \pm 0,17$  до  $94,81 \pm 2,40$   $\mu\text{m}$ . Эффективность инкапсулирования составила около 90,9 %, а выход микрочастиц около 84 %. Профиль высвобождения антисептиков *in vitro* показал, что около 35 % (масс.) «Бриллиантового зеленого» и 26 % «Фурацилина» (масс.) от включенного было высвобождено из полимерных микросфер в течение месяца. Минимальная концентрация антисептиков, которая проявляет антибактериальный эффект составила 20 мг/л для «Бриллиантового зеленого» и «Фурацилина».

Теоретическое исследование проводилось методом анализа литературы и профильных баз данных. Практическое исследование – методами световой микроскопии, РЭМ, спектрофотометрии.

Практическая ценность магистерской диссертации заключается в том, что полученные микрочастицы могут быть использованы в качестве антисептических средств, обладающих пролонгированным эффектом.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПГА, П(ЗГБ), П(ЗГБ)-со-П(ЗГВ), АНТИСЕПТИКИ, БРИЛЛИАНТОВЫЙ ЗЕЛЕНЫЙ, ФУРАЦИЛИН, МИРАМИСТИН, СИСТЕМЫ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ, ПРОЛОНГИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ, РАНОЗАЖИВЛЕНИЕ.

## АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Функциональные характеристики микросферических носителей биологически активных веществ для реконструктивных технологий мягких тканей» содержит 85 страниц текстового документа, 11 иллюстраций, 6 таблиц, 3 графика, 136 использованных источников.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПГА, П(ЗГБ), П(ЗГБ)-со-П(ЗГВ), АНТИСЕПТИКИ, БРИЛЛИАНТОВЫЙ ЗЕЛЕНый, ФУРАЦИЛИН, МИРАМИСТИН, СИСТЕМЫ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ, ПРОЛОНГИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ, РАНОЗАЖИВЛЕНИЕ.

**Цель диссертационной работы:** создание микросферических носителей биологически активных веществ (БАВ) в виде микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов, и изучение их функциональных характеристик, с оценкой эффективности действия.

### **Задачи исследования:**

1. Освоение способа получения микрочастиц на основе ПГА эмульсионным методом.
2. Исследование характеристик полученных микрочастиц - среднего диаметра, электрокинетического потенциала (дзета-потенциала) и морфологии поверхности.
3. Изучение влияния включения различных антисептических препаратов на характеристики микросферических носителей.
4. Исследование динамики высвобождения антисептиков из сконструированных полимерных микросфер.

5. Оценка эффективности действия микрочастиц с различными антисептическими препаратами в культуре патогенных и условно патогенных микроорганизмов, а также в культуре клеток *in vitro*.

**Актуальность диссертационной работы** состоит в том, что получены и охарактеризованы микрочастицы из П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ). Результаты свидетельствуют о том, что частицы обоих составов пригодны для нагружения антисептическими препаратами. С помощью проведенных исследований доказана возможность включения в состав микрочастиц антисептических препаратов с удовлетворительными показателями эффективности инкапсулирования, высвобождения препаратов и стабильности в модельной среде *in vitro*. Показано, что «Бриллиантовый зеленый» и «Фурацилин» демонстрируют высокую эффективность включения в полимерные матрицы, тогда как антисептический препарат «Мирамистин» включается хуже. Проведена оценка эффективности действия микрочастиц с различными антисептическими препаратами в культуре патогенных и условно патогенных микроорганизмов, а также в культуре клеток *in vitro*. Доказана эффективность полученной системы контролируемой доставки антисептиков по сравнению с доступными формами препаратов.

## ABSTRACT

Master's thesis on the topic "Functional specifications microspherical carriers of biologically active substances for the reconstruction of soft tissue techniques" contains 80 pages of text, 11 illustrations, 6 tables, 3 charts, 136 sources used.

POLYHYDROXYALKANOATES, PHAS, P(3HB), P(3HB)-CO-P(3HV), ANTISEPTICS, BRILLIANT GREEN, FURACILINUM, MIRAMISTIN, CONTROLLED DELIVERY SYSTEMS, PROLONGED EFFECT, WOUND HEALING.

**The purpose of the thesis:** the creation of microspherical carriers of biologically active substances (BAS) in the form of microparticles based on polyhydroxyalkanoates, and the study of their functional characteristics, with an assessment of the effectiveness of the action.

### **Objectives of the study:**

1. Development of a method for the preparation of microparticles on the basis of PHA by the emulsion method.
2. Study of the characteristics of the resulting microparticles – diameter, electrokinetic potential (zeta potential) and surface morphology.
3. Study the effect of inclusion of various antiseptic preparations on the characteristics of microspherical carriers.
4. Investigation dynamics of the release of antiseptics from the constructed polymer microspheres.
5. Evaluation of the effectiveness of the action of microparticles with various antiseptic preparations in the culture of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms, as well as in cell culture in vitro.

The relevance of the thesis is that the microparticles are prepared and characterized from P(3HB) and P(3HB-co-3HV). The results indicate that the particles of both

formulations are suitable for loading with antiseptic preparations. With the help of the conducted researches the possibility of inclusion in the composition of microparticles of antiseptic preparations with satisfactory indices of encapsulation efficiency, drug release and stability in the model environment in vitro has been proved. It is shown that "Brilliant Green" and "Furacilinum" demonstrate high efficiency inclusion in the polymer matrix, while the antiseptic preparation "Miramistin" turns worse. Evaluation of the efficacy of the microparticles with a variety of antiseptic agents in the culture of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms and culture cells in vitro. The effectiveness of the obtained system of controlled delivery of antiseptics is proved in comparison with available forms of preparations.

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1 Современные системы контролируемой доставки биологически активных веществ .....	10
1.1.1 Микросферические носители биологически активных веществ .....	14
1.1.2 Материалы и технологии создания микросферических носителей биологически активных веществ .....	18
1.1.3 Применение полигидроксиалканоатов .....	25
1.1.4 Использование полигидроксиалканоатов для создания сферических систем доставки .....	27
1.1.5 Основные параметры систем доставки .....	30
1.2 Использование систем доставки антисептиков для обработки раневых поверхностей .....	35
1.2.1 Использование антисептиков в качестве инкапсулируемых веществ.....	38
1.2.2 Бриллиантовый зеленый .....	40
1.2.3 Фурацилин .....	41
1.2.4 Мирамистин .....	43
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	46
2.1 Объекты и методы .....	46
2.1.1 Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов .....	46
2.1.2 Вспомогательные вещества .....	46
2.2 Конструирование микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов .....	47
2.3 Конструирование микрочастиц, нагруженных антисептическими препаратами .....	48
2.4 Характеристики полученных микрочастиц .....	49
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	66
ВЫВОДЫ .....	67
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	68
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	70

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых материалов для медицинских целей является задачей высокой сложности. Особенно востребованы специализированные биосовместимые материалы для сформированных в последние годы новых направлений медицинской науки о материалах - клеточной и тканевой инженерии, связанных с реконструктивной хирургией, а также систем контролируемой доставки лекарственных средств.

Производство и использование биополимеров непрерывно растет с очень высокой скоростью, поэтому вся информация об этих материалах очень важна. Биополимеры и их смеси успешно применяются в различных областях: от сельского хозяйства до потребительских товаров, упаковки и автомобильной промышленности. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области биотехнологии на сегодняшний день, такие материалы по-прежнему востребованы и все еще не удалось создать вещество, полностью совместимое с живым организмом[1].

Интерес к полигидроксиалканоатам (ПГА, PHAs) растет с конца 80-х годов. Этот новый класс биосовместимых и биоразлагаемых полиэфигов, комплекс физико-химических свойств которых, в зависимости от состава, может значительно варьироваться. Применение в медицине ПГА потенциально весьма широко и может включать производство медицинских инструментов и вспомогательных средств (нетканых и одноразовых изделий, швов и перевязочных материалов), фармакологию (контролируемые системы доставки лекарств), восстановительную хирургию и трансплантологию [2].

Цель работы – создание микросферических носителей биологически активных веществ (БАВ) в виде микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов, и изучение их функциональных характеристик, с оценкой эффективности действия.



Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Освоение способа получения микрочастиц на основе ПГА эмульсионным методом.
2. Исследование характеристик полученных микрочастиц - среднего диаметра, электрокинетического потенциала (дзета-потенциала) и морфологии поверхности.
3. Изучение влияния степени включения различных антисептических препаратов на характеристики микросферических носителей.
4. Исследование динамики высвобождения антисептиков из сконструированных полимерных микросфер.
5. Оценка эффективности действия микрочастиц с различными антисептическими препаратами в культуре патогенных и условно патогенных микроорганизмов, а также в культуре клеток *in vitro*.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Современные системы контролируемой доставки биологически активных веществ

Одним из приоритетов в развитии современной медицины и фармакологии является создание новых высокоэффективных лекарственных систем. На сегодняшний день препараты в традиционных лекарственных формах для лечения онкологических, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний, с одной стороны, не в полной мере проявляют терапевтический потенциал биологически активных лекарственных веществ, которые они содержат, с другой стороны, не устраняют их неблагоприятные побочные эффекты. Например, большинство химиопрепаратов, используемых в онкологии, обладают высокой токсичностью, что вызывает серьезные осложнения и снижает качество жизни пациента. Среди побочных эффектов могут быть повреждения печени, почек, кроветворных стволовых клеток, нарушение свертываемости крови, анорексия. Одной из основных причин побочных эффектов является системное введение лекарственного препарата в организм с использованием традиционных лекарственных форм, при которых вещество воздействует не только на патологически измененные ткани и органы, но и на нормальные клетки здоровых тканей и органов, что приводит к ухудшению функционирования последних. Однако часто токсичность представляет сама лекарственная форма, в которую включен активный лекарственный компонент. В связи с этим чрезвычайно перспективно разрабатывать как новые лекарственные формы с использованием новых носителей лекарственных веществ, так и новые лекарственные вещества, включая биомакромолекулы и бионаносистемы [3].

Контролируемая технология доставки лекарств представляет собой одну из пограничных областей науки, которая включает междисциплинарный научный подход, способствующий улучшению здравоохранения. Эти системы доставки

обладают многочисленными преимуществами по сравнению с обычными лекарственными формами, которые включают в себя улучшенную эффективность, уменьшенную токсичность, улучшенную совместимость с пациентом и удобство использования. Такие системы часто используют макромолекулы в качестве носителей для лекарственных средств. В последние годы эта область фармацевтических технологий быстро увеличивалась и диверсифицировалась. На сегодняшний день ведется разработка различных лекарственных систем: липосомы, дендримеры, мицеллы, гидрогели, а также наносферы, микросферы и имплантаты из биоразлагаемых и биосовместимых полимеров с инкапсулированными лекарственными веществами (ЛВ) различного спектра действия (противоопухолевые препараты, антибиотики, противовоспалительные препараты, способствующие регенерации ткани, гормональные препараты, антисептики) [4].

Среди различных целевых систем носителей лекарств липосомальная наука и технология - одна из самых быстроразвивающихся научных областей. Липосомы представляют собой микроскопические везикулы, состоящие из двухслойных фосфолипидов или любых аналогичных амфипатических липидов. Они могут инкапсулировать и эффективно доставлять как гидрофильные, так и липофильные вещества, и могут использоваться в качестве нетоксичного средства для нерастворимых лекарств. Липосомы широко используются в качестве транспортных средств для нацеливания определенной молекулы на конкретный орган [5]. На сегодняшний день основными направлениями применения липосом являются лечение злокачественных опухолей [6-8], офтальмологических [9] и нейродегенеративных заболеваний [10].

Дендримеры представляют собой сильно разветвленные полимеры с легко изменяемыми поверхностями. Это делает их перспективными структурами для сопряжения с лекарствами и нуклеиновыми кислотами. Их архитектура, которую можно изменять с помощью различных условий синтеза, позволяет

контролировать такие характеристики, как форма, размер, заряд и растворимость. Дендримеры обладают способностью повышать растворимость и биодоступность гидрофобных лекарств. Препараты можно помещать внутри полости дендримеров или связывать с функциональными группами на их поверхности. Наличие функциональных групп на поверхности дендримеров позволяет также добавлять другие фрагменты, которые могут активно нацеливаться на определенные места и улучшать доставку, например, с фолатом и антителами, которые в настоящее время широко используются для нацеливания на опухоли. Дендримеры широко исследовались в медицинской области, а лечение рака - одна из самых больших областей, где они наиболее часто используются [11-13].

В доставке лекарств микрогели и наногели занимают уникальную нишу. Гидрогели состоят из сшитых в сетки гидрофильных полимерных цепей, которые образуют коллоидные гели. Частицы гидрогеля изготовлены из натуральных или синтетических полимерных сетей, обладают высокой абсорбентностью и могут содержать более 90% воды. Многие гидрогели являются экологически чувствительными и способны реагировать на изменения pH, температуры или концентрация метаболитов. Они могут инкапсулировать небольшие водорастворимые молекулы, которые трудно инкапсулировать с использованием традиционных биоразлагаемых полимерных частиц. В результате эти гели особенно подходят для длительного высвобождения водорастворимых лекарств или белков. Другие преимущества частиц гидрогеля включают их способность к инкапсулированию больших концентраций препаратов, активность, биосовместимость и способность к биологическому разложению. Кроме того, для изготовления коллоидных гелей не требуются органические растворители, повышающие токсичность и потенциал для денатурации белка [14, 15].

Наночастицы приобретают все большее значение в области биомедицины. Частицы, изготовленные из полимеров, находятся в центре внимания, благодаря их биоразлагаемости, биосовместимости, универсальности.

Полимерные мицеллы, полученные из самосборки амфифильных блок-сополимеров, вероятно, являются одним из самых распространенных носителей доставки лекарств среди полимерных наночастиц. Они представляют собой агрегаты поверхностно-активных веществ в жидкой среде. В мицелле поверхностно-активное вещество ориентировано таким образом, что гидрофобные углеводородные цепи находятся внутри мицеллы, оставляя гидрофильные группы в контакте с водной средой. Современные полимерные мицеллы были разработаны как потенциальные наноплатформы для эффективной доставки лекарств и диагностики. Они находятся в центре внимания в качестве потенциальных носителей лекарственных средств из-за структуры сердцевина-оболочки, которая является хорошо растворимой в воде, сохраняя при этом гидрофобный сердечник, подходящий для жирорастворимых лекарств. Это имеет решающее значение для многих препаратов, поскольку они часто оказываются нерастворимыми в воде и загрузка на биополимерные носители может увеличить их растворимость на несколько порядков. Они используются для комбинированной противоопухолевой терапии, лечения заболеваний дыхательных путей, кровеносной системы и многих других [16-20].

Пролонгированный эффект подобных носителей биологически активных веществ достигается благодаря контролируемому замедленному высвобождению инкапсулированного лекарства. Связывание фармакологически активного компонента с биополимерной матрицей и постепенное выведение из нее позволяет обеспечить длительное поддержание требуемой концентрации активного лекарственного средства в организме. Доставка ЛВ, осуществляемая с помощью биополимерных систем, обеспечивает контролируемое лекарственное действие. Такой механизм

устраняет необходимость в дополнительном повторном введении препарата, повышает его эффективность, снижает токсичность и побочные эффекты лекарств, представляет возможности для локализованного действия лекарственного средства, стоимость лечения снижается. Разрабатываемые лекарственные системы предназначены для лечения различных социально значимых заболеваний: онкологических заболеваний, хронических воспалительных и инфекционных заболеваний, гормональных нарушений [21].

Использование новых форм доставки ЛВ на основе биомакромолекул и бионаносистем позволит значительно снизить импорт дорогих медикаментов и получить как социальные, так и экономические выгоды путем замены дорогих импортных лекарств более дешевыми отечественными аналогами. Таким образом, создание, исследование и тестирование систем контролируемой доставки лекарственных препаратов представляется перспективным и экономически выгодным направлением для терапии различных заболеваний.

### 1.1.1 Микросферические носители биологически активных веществ

За последнее десятилетие на мировом рынке микросфер наблюдался устойчивый рост интереса [22]. Они были признаны в качестве новых технологий для устройств с модулированным высвобождением и получили значительное внимание от клинических сообществ. [23, 24]. Интересны примеры новых фармацевтических препаратов на основе биополимерных микрочастиц полилактида-ко-гликолида: противоопухолевого препарата – леупролида Lupron Depot®, гормона роста Nutropin Depot®, антипсихотического препарата – рисперидона Risperidal®, наркоблокатора – налтрексона Vivitrol® и гипогликемического препарата – эксенатида Bydureon® [25]. Также для лечения алкогольной и опиоидной зависимостей компанией ЗАО «ИФТ» разработан инъекционный препарат

пролонгированного действия на основе налтрексона, инкапсулированного в биodeградируемый сополимер молочной и гликолевой кислот [26, 27].

Термин «микрочастица» относится к частицам с диаметром 1-1000 мкм, независимо от их внутренней или внешней структуры [28-30]. Твердые сферические полимерные структуры, содержащие биологически активное вещество, диспергированное по всей полимерной матрице, известны как микросферы. Они являются сыпучими порошками, обеспечивают и контролируют высвобождение лекарственного средства на целевой точке [31]. Обычно предполагается, что состав, описанный как микросфера, состоит из гомогенной смеси полимера и активного агента, тогда как микрокапсулы имеют по меньшей мере один дискретный домен активного агента и иногда больше. Препарат растворяют, захватывают, инкапсулируют или присоединяют к матрице микрочастицы [32, 33].

Микрочастицы обладают существенными преимуществами в качестве систем доставки биологически активных веществ, включая:

1. эффективную защиту инкапсулированного активного агента от деградации (например, ферментативной), что также приводит к увеличению сроков хранения;
2. возможность точного контроля скорости высвобождения введенного лекарственного средства в течение определенных периодов времени (до нескольких месяцев);
3. легкое введение (по сравнению с альтернативными формами для парентерального контролируемого высвобождения, такими как имплантаты с макроразмерами);
4. высокие отношения поверхности к объему;

5. возможность предусмотреть желаемые запрограммированные профили высвобождения лекарственного средства, которые соответствуют терапевтическим потребностям пациента.

Они могут использоваться для формирования порошков, пленок, волокон, гелей или могут быть непосредственно нанесены на рану [34].

В статье Kristin M. Poole et al. новая система доставки на основе микрочастиц была синтезирована из поли(пропиленсульфида) (ППС).

Поли(пропиленсульфид) является гидрофобным, но подвергается фазовому переходу, становясь гидрофильным при окислении. Таким образом, полимер является пригодной платформой для высвобождения лекарственного средства, вызванного активными формами кислорода. Эта платформа была протестирована для доставки перспективной противовоспалительной и антиоксидантной терапевтической молекулы куркумина, которая в настоящее время ограничена в использовании в свободной форме из-за плохих фармакокинетических свойств. ППС-микросферы эффективно инкапсулировали куркумин через эмульсию масло-в-воде и обеспечивали устойчивое выделение, которое модулировалось *in vitro* концентрацией перекиси водорода. Функционально местная доставка микросфер куркумина-ППС ускоряла восстановление от ишемии задней конечности у диабетических мышей [35].

Pichayakorn and Boonme оптимизировали препарат, содержащий микрочастицы хитозана с метронидазолом (МТЗ-МП), путем эмульсионного сшивания. Они также разработали гидрогели и пленки, содержащие лекарственное средство в виде МТЗ-МП и простых порошков, и сравнили высвобождение. Длительное высвобождение проявлялось в составах, содержащих МТЗ-МП, по сравнению с препаратами в виде порошков. Гидрогели показали более предпочтительный профиль высвобождения лекарств, чем пленки [36].



В ряде работ были исследованы микрочастицы на основе полилактид-ко-гликолида (ПЛГА, PLGA). Эффективность пролонгированного высвобождения инсулина из микрочастиц ПЛГА, встроенных в альгинатные гели, оценивалась для лечения ожоговых ран. Подготовленные микросферы способны продлевать выделение биоактивного инсулина до 25 дней [37]. Стероидный лекарственный клобетазол пропионат также был представлен в виде микросфер ПЛГА в геле. Эмульгель, содержащий ПЛГА-микросферы, показал более высокий и продолжительный выброс лекарственного средства, чем продаваемый продукт [38-40]. Shi et al. показали, что наночастицы ПЛГА с 5-аминелевулиновой кислотой увеличили эффект от фотодинамической терапии, применяемой для уничтожения злокачественной карциномы кожи [41].

В статье J. Vile, M-A. Bolzinger и других описано изготовление пленок, покрытых микрочастицами с инкапсулированным антимикробным агентом. Полиэтиленовые поверхности были модифицированы микрочастицами полиметилметакрилата (ПММА), заполненными фенилэтиловым спиртом в качестве антимикробного агента. Выделение спирта в воду из покрытых полиэтиленовых поверхностей и из микрочастиц ПММА было исследовано для оценки пролонгированного высвобождения и его механизмы. Высвобождение фенилэтилового спирта возрастало по мере увеличения площади контакта выступающих микрочастиц с внешней средой и уменьшения толщины пленки [42].

Утверждается, что системы на основе частиц равномерно распределяются, что должно приводить к снижению локальных концентраций и, следовательно, снижению токсичности и раздражающего эффекта, увеличения стабильности во времени и снижения скорости высвобождения биологически активного вещества [41, 42].

### 1.1.2 Материалы и технологии создания микросферических носителей биологически активных веществ

В последние годы акцент в разработке биоматериалов перешел от материалов, которые остаются стабильными в биологической среде к материалам, которые могут безопасно разрушаться в организме человека. Благодаря развитию химии полимеров на сегодняшний день существует большой ассортимент материалов, используемых для создания систем доставки БАВ в виде микрочастиц. Основными параметрами для выбора полимера являются его структурные характеристики, физико-химические свойства, а также био- и иммуносовместимость. В связи с этим, основными веществами для создания микросферических носителей являются биополимеры. Для этих целей интересны биополимеры полученные из возобновляемого сырья. Полигидроксиалканоаты, полимолочная кислота, полибутиленсукцинат, полиэтилен, политриметилентерефталат, полипропилен, полиэтилентерефталат и полипропиленкарбонат являются биodeградируемыми или биоподобными полимерами, содержащими по меньшей мере один мономер, полученный путем микробных превращений или микробной промышленной биотехнологии [43,44].

В то же время из-за проблем с окружающей средой естественные полимеры, полученные из возобновляемых ресурсов, привлекают все большее внимание в последние годы [45-47]. Эти полимеры формируются в природе во время циклов роста всех организмов, и есть три основных возобновляемых источника: полисахариды, белки и липиды.

Полисахариды могут быть гомо- или гетерополимерами [48, 49] и могут быть получены из морских и растительных источников. Общими примерами из морских источников являются хитин и хитозан; в то время как распространенными примерами из растительных источников являются крахмал, целлюлоза и альгиновая кислота (альгинат). Полисахариды, такие как

гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат, имеют биологическое происхождение.

Белки представляют собой гетерополимеры, состоящие из разных полярных и неполярных  $\alpha$ -аминокислот [50-52]. Они имеют широкий спектр функциональных свойств и всегда используются в их естественной форме из-за того, что большинство белков не являются ни растворимыми, ни легкоплавкими. Биодegradация белков обычно достигается путем гидролиза с использованием ферментов, таких как протеазы. Белки могут быть получены из животных или растительных источников. Общими примерами белков из животных источников для биомедицинских применений являются шелк, желатин, коллаген, эластин, альбумин и фибрин. Примерами белков из растительных источников являются пшеничная клейковина, соевый белок и сывороточный белок.

Липиды можно считать типом гомополимера, содержащим  $-CH_2$ -звенья. Они представляют собой очень широкий класс органических макромолекул из-за разнообразия типов и источников, таких как нейтральные жиры, масла и воски [53-55]. Было показано, что липиды (например, растительные масла, жирные кислоты, глицериды и сложные эфиры жирных кислот) являются высокоэффективными материалами для фармацевтических применений, в частности местных препаратов, включая липосомы, твердые липидные наночастицы, микро- и наноэмульсии [56-59].

Например, наноэмульсии, полученные из липидов, привлекают все больший интерес к оральной и местной доставке противовоспалительных и противораковых соединений. Это объясняется уникальным спектром свойств, включающим небольшой размер капель ( $<100$  нм), физическую стабильность, способность уменьшать цитотоксичность лекарств и способность солюбилизировать большое количество гидрофобных активностей. Обычные липиды, которые были широко исследованы для получения эмульсий, включают соевое масло, изопропилмиристат, масло куркумы, масло гвоздики,

жидкое масло мигликол 812, изопропилмиристат, масло корицы и кокосовое масло. Однако максимальная растворимость, легкость эмульгирования и кинетика высвобождения лекарственного средства признана проблематичной в единичной масляной системе, что делает комбинацию масляных фаз необходимой для достижения оптимальной эмульсионной композиции с требуемым диапазоном свойств [60].

Природные полимеры, такие как альгинат, пектин, агароза, коллаген и гиалуроновая кислота были использованы для инкапсулирования в мягких условиях [61]. В микрочастицы из смеси альгината с кальцием инкапсулировали кофеин в качестве модельного гидрофильного вещества и покрывали их низко- и высокомолекулярным хитозаном. Электростатическое взаимодействие между альгинатом и хитозаном (особенно в присутствии 1% низкомолекулярного хитозана) обеспечивало эффективный барьер против высвобождения кофеина и значительно уменьшало набухание частиц по сравнению с контрольными образцами [62].

Экстракты кукурузы и черники инкапсулировали в альгинат-пектиновые частицы гидрогеля для защиты антоцианинов от деградации. Более высокое количество антоцианинов сохранялось в частицах гидрогеля при использовании сферических частиц. Инкапсуляция в частицы гидрогеля значительно уменьшала фотодегградации антоцианина при воздействии флуоресцентного света [63].

Еще одним исследованием занимались Rossi S., Mori M. et al. Их целью была разработка лекарства, позволяющего осуществить комбинированную доставку лизата тромбоцитов и антиинфекционного модельного препарата, гидрохлорида ванкомицина, к хроническим кожным язвам. Был разработан простой способ получения частиц гиалуроновой кислоты, нагруженных лизатом тромбоцитов и покрытых альгинатом кальция, который был встроен в матрицу альгината, содержащую ванкомицин. Результаты тестов показали достаточную механическую прочность и способность поглощать большое

количество раневого экссудата с образованием защитного геля на участке поражения [64].

Несмотря на многочисленные достоинства, природные полимеры имеют недостатки, такие как слабая консистенция, высокая абсорбция влаги, низкая устойчивость к ультрафиолетовому излучению, химическая и микробная активность. Также качество и характеристики этих полимеров могут зависеть от процессов синтеза и партий. Синтетические полимеры такие как поли(этиленгликоль), 2-гидроксиэтилметакрилат, поли(молочно-ко-гликолевая кислота), а также биополимеры полигидроксиалканоаты имеют стабильные химические составы и молекулярные массы [65-68]. Это делает их наиболее удобными и популярными полимерами для создания систем доставки биологически активных веществ.

В настоящее время существует множество различных способов получения полимерных микроносителей биологически активных веществ: ионное гелеобразование; технология сверхкритических жидкостей; метод атомизации; полимеризация мономеров; метод преципитации; эмульгирование раствора полимера (двух- и трехкомпонентные эмульсии с испарением или диффузией растворителя); распылительное высушивание [69].

Способ, используемый для инкапсулирования лекарственного средства в полимерную матрицу, должен удовлетворять следующим требованиям:

1. на стабильность и биологическую активность лекарственного средства не должны влиять параметры обработки, используемые при изготовлении загруженных лекарственными средствами микрочастиц;
2. выход микрочастиц должен иметь желаемый диапазон размеров, эффективность инкапсуляции лекарственного средства должна быть высокой;

3. качество частиц и профиль высвобождения лекарственного средства должны быть воспроизводимыми.

Наиболее популярными методами получения микросферических носителей на основе биополимеров являются эмульсионный метод (испарение растворителя), а также распылительное высушивание.

#### 1. Эмульсионный метод.

В основе метода однокомпонентной эмульсии лежит упаковка цепей полимера в водной среде в сферические частицы, в которых лекарство может быть включено во внутреннюю полость данных частиц, либо адсорбировано на их поверхности [69]. Эмульсионная система состоит из органической фазы (летучего растворителя с растворенным полимером) и инкапсулированного лекарственного средства, эмульгированного в водной фазе, содержащей растворенное поверхностно-активное вещество. Раствор полимера и растворителя смешивают при соответствующих условиях перемешивания и температуры с помощью магнитной мешалки. Поверхностно-активные вещества используются для стабилизации дисперсных фаз, образующихся во время эмульгирования, и ингибирования коалесценции.

Одним из недостатков процесса эмульгирования м/в (o/w) является низкая эффективность инкапсулирования с умеренно водорастворимыми лекарственными средствами. Препарат диффундирует из диспергированной масляной фазы в водную фазу, фрагменты гидрофильных лекарств попадают на поверхность микросферы [70] и диспергируются в полимерной матрице. Результатом является плохое улавливание гидрофильного лекарственного средства и первоначальное быстрое высвобождение («взрывной эффект»). Таким образом, процесс эмульгирования масло/вода широко используется для инкапсулирования липидорастворимых лекарств. Для повышения эффективности включения водорастворимых лекарственных средств был разработан способ эмульсии масло-в-масле [71]. В этом способе лекарственное

средство может быть растворено или суспендировано в масляной фазе перед диспергированием в другой масляной фазе. Процесс двойной эмульсии обычно используют для лекарств, не растворимых в органическом растворителе. Для инкапсулирования лекарственного средства можно использовать эмульсию типа «твердое в масле-в-воде» (s/o/w), при условии, что ее форма имеет небольшие размеры.

## 2. Фазовое разделение

Процесс состоит в уменьшении растворимости инкапсулирующего полимера путем добавления третьего компонента к полимерному раствору [72, 73]. Процесс дает две жидкие фазы: полимер, содержащий коацерватную фазу, и супернатант, обедненный полимером. Затем препарат, который диспергирован в растворе полимера, покрывают коацерватом. Таким образом, процесс коацервации состоит из следующих трех этапов:

1. фазовое разделение раствора полимерного покрытия;
2. адсорбция коацервата вокруг частиц лекарственного средства;
3. затвердевание микросферы

Этот способ подходит для инкапсулирования водорастворимых, а также нерастворимых в воде лекарств, однако в основном используется для инкапсулирования водорастворимых лекарств, таких как пептиды, белки и вакцины.

Инкапсулирование лекарств в твердые биологически разлагаемые полимерные микросферы с помощью технологии испарения растворителя остается сложным процессом, особенно с теми веществами, которые имеют низкую молекулярную массу и высокую гидрофильность. Метод может быть выполнен с помощью различных протоколов, и выбор наилучшего варианта зависит от свойства соединений, которые должны быть инкапсулированы [74].

В частности, для водорастворимых соединений наиболее часто применяемым методом является тип двойной эмульсии. В системе доставки лекарств различные виды гидрофильных лекарств были успешно инкапсулированы в биоразлагаемые полимеры, такие как поли (лактико-гликолевая кислота) (PLGA) с использованием этого метода [75, 76]. Несмотря на то, что рабочая концепция инкапсулирования методом испарения с использованием двойной эмульсии кажется простой, ее практичность в реальности часто оказывается неоднозначной. Это объясняется тем, что метод включает в себя множество влияющих параметров (материалов, количества используемых синтетических стадий и условий эксплуатации), которые могут изменять свойства микросфер, такие как эффективность инкапсулирования и его высвобождающий профиль[77].

### 3. Распылительное высушивание

Другим не менее используемым методом получения микрочастиц с включенными биологически активными веществами является распылительное высушивание. Этот способ широко применяется в фармацевтической промышленности для получения биоразлагаемых микрочастиц [78-81]. В методе обычно используют лекарство, растворенное или суспендированное в растворе полимера (органический или водный растворитель, в зависимости от используемого полимера). Раствор/суспензия затем подают в камеру, где распыляется. Распыление раствора полимера/лекарственного средства происходит в сопле [79], и полученные капельки очень быстро высушиваются путем выпаривания (под воздухом или под высоким давлением) перед сборкой.

Значительные преимущества использования этого метода включают высокую эффективность инкапсулирования и отсутствие остаточного поверхностно-активного вещества на поверхности микрочастиц. А также отсутствие внешней водной фазы, которая может действовать как приемник для лекарственного средства, и отсутствие поверхностно-активного вещества, присутствующего где-либо в композиции. Параметры, которые влияют на размер и морфологию



микрочастиц: температура, давление воздуха, используемого для сушки, диаметр сопла, объемные соотношения воздуха/раствора и концентрации полимера/лекарственного средства [82].

### 1.1.3 Применение полигидроксиалканоатов

Одним из наиболее перспективных биополимеров является класс полигидроксиалканоатов (ПГА, polyhydroxyalkanoates, PHAs), который может быть синтезирован многими микроорганизмами в качестве материала для запаса энергии, когда существенное питательное вещество, такое как азот или фосфор, доступно только в ограниченных концентрациях в присутствии избыточного источника углерода [83]. *Ralstonia eutropha* является наиболее часто используемым штаммом дикого типа для промышленного производства полигидроксибутирата [84, 85] и полигидроксибутирата-ко-валерата [86]. Также используют *Cupriavidus eutrophus B10646* [87-99], аэробную СО-окислительную карбоксибактерию *Seliberia carboxydohydrogena Z-1062* [90].

Полигидроксиалканоаты представляют собой семейство биополиэфиров. Они используются для медицинских применений, таких как регенерация тканей, доставка биологически активных веществ и лекарств, а также в качестве шовных материалов. Для улучшения прочности и биологической активности композитов изучают и используют различные композиции ПГА и биологически активные неорганические фазы, такие как гидроксиапатит (ГА) и биостекло. На сегодняшний день более 150 различных мономерных единиц были определены как составные части ПГА. ПГА можно разделить на 3 группы в зависимости от количества атомов углерода в их повторяющихся единицах; короткую цепь ПГА (scl-PHA), ПГА средней длины цепи (mcl-PHA) и с длинной цепью (lcl-PHA). Scl-PHA, mcl-PHA и lcl-PHA содержат 4-5 атомов углерода, 6-14 атомов углерода и более 14 атомов углерода в их повторяющихся единицах

соответственно. Однако scl-PHA и mcl-PHA демонстрируют более широкий спектр свойств, которые привели к широкому использованию в различных приложениях [91].

Члены семейства ПГА могут существовать как гомополимеры гидроксиалкановых кислот, а также сополимеры двух или более гидроксиалкановых кислот. Было разработано несколько полимеров, принадлежащих к этому семейству, включая поли (3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) [92], сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата (П(ЗГБ-со-ЗГВ)) [93], сополимеров 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата (П(ЗГБ-со-ЗГГ)) [94] и поли (3-гидроксиоктаноат) (П(ЗГО)) [95].

Эти полимеры биоразлагаемы и термопластичны, что делает их привлекательными материалами для применения в обычных медицинских целях, в виде одноразовых неснимаемых раневых покрытий, зондов, катетеров, в тканевой инженерии – для получения имплантируемых биоразрушаемых изделий. За последние годы ПГА были использованы для разработки таких изделий, как сердечно-сосудистые матриксы, ортопедические штыри, стенты, материалы для регенерации суставных хрящей, нервных волокон, сухожилий, а также в качестве перевязочных материалов. Изменение состава ПГА также обеспечивает благоприятные механические свойства, биосовместимость и время разложения в пределах желательных временных рамок, в конкретных физиологических условиях, для конкретной ткани [96-98].

Среди полигидроксиалканоатов П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ) являются наиболее широко исследованными полимерами в качестве биоматериалов.

#### 1.1.4 Использование полигидроксиалканоатов для создания сферических систем доставки

Поли [(R)-3-гидроксибутират] (П(ЗГБ), Р(ЗНВ)) представляет собой природный линейный сложный полиэфир, который могут продуцировать многие микроорганизмы. Впервые обнаруженный в 1926 году, он с тех пор вызвал большой интерес из-за его биоразлагаемости и производства из возобновляемых источников. Физические свойства П(ЗГБ), такие как температура плавления, температура стеклования, кристалличность и предел прочности при растяжении, сопоставимы с физическими свойствами синтетических полимеров. Однако П(ЗГБ) нестабилен при температурах обработки выше температуры плавления, и серьезной проблемой является термическая деструкция путем разрыва цепи с последующим снижением молекулярной массы. Кроме того, полимер проявляет хрупкое поведение при комнатной температуре и имеет низкую деформацию при разрыве около 3% [99].

Способность полигидроксибутирата деградировать и рассасываться в человеческом организме делает его подходящим кандидатом в качестве носителей для биологически активных веществ и биоразлагаемых композитных имплантатов, которые будут направлять рост ткани и будут заменены в конечном итоге на собственную ткань организма. Однако его полезность ограничена хрупкостью [100]. Добавление полигидроксиалерата (П(ЗГВ)) к полимерным цепям П(ЗГБ) может улучшить пластичность и технологичность полимера [101]. Сополимеризация гомополимера П(ЗГБ) с 3-гидроксиалератом при помощи бактериальной ферментации в поли-(3-гидроксибутират-со-3-гидроксиалерат) (П(ЗГБ-со-ЗГВ)) приводит к более низким температурами затвердевания и плавления (в диапазоне 140-170 °С) по сравнению с «чистым» П(ЗГБ). Увеличение количества гидроксиалерата в сополимере приводит к более аморфной структуре, это приводит к

уменьшению кристалличности цепи и дает более эластичный полимер [102]. В связи с этим считается, что сополимеры П(ЗГБ-со-ЗГВ) более удобны для систем высвобождения лекарств по сравнению с «чистым» П(ЗГБ), поскольку диффузия лекарственного средства происходит в аморфных зонах микросфер. Благодаря улучшенным физическим свойствам, добавленным к его биосовместимости и биоразлагаемости, сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) становится привлекательным для биомедицинских систем и устройств [103,104].

Хотя химическая структура П(ЗГБ-со-ЗГВ) очень похожа на некоторые известные синтетические биodeградируемые полимеры, такие как ПЛА и ПЛГА, она обычно деградирует гораздо медленнее. В статье Routon and Akhtar сообщено, что высвобождение низкомолекулярных препаратов из матриц П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ) имеет тенденцию действовать путем проникновения воды и порообразования. Матрицы П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ) теряют массу очень медленно по сравнению с быстро деформируемым по массе полилактидгликолидом. Также деградация этих полимеров не приводит к повышению кислотности в тканях. Поэтому пористость, скорость эрозии носителя и, в связи с этим, скорость высвобождения лекарственного средства, вероятно, будут зависеть от состава смесей с другими биосовместимыми полимерами. Эти выводы позволяют заключить, что новый биоразлагаемый носитель для лекарственных препаратов различного действия представляется перспективным кандидатом для применения в медицине. [105].

Еще одним преимуществом является то, что П(ЗГБ) не просто инертный полимер, используемый для хранения и переноса лекарственных препаратов, но и биополимер, участвующий в важных физиологических функциях. Williams et al. [106] указывают, что в терапии могут быть использованы олигомеры П(4ГБ) и его мономеры, например, при лечении пациентов с нарколепсией, хронической шизофренией, атипичными психозами, неврозами, алкоголизмом, наркоманией, болезнью Паркинсона, гипертонией, ишемией и другими заболеваниями. По-видимому, мономеры и олигомеры ПГА не только

нетоксичны, но и могут даже оказывать терапевтическое действие. Шишацкая и др. имплантировали внутримышечно П(ЗГБ), П(ЗГБ-со-ЗГВ) нити, шелк и кетгут для тестирования на животных. Протестированные моноволоконные нити, выполненные из П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ), продемонстрировали эффект, необходимый для заживления мышечно-фасциальной раны. Реакция тканей на полимерные имплантаты была схожа с их реакцией на шелковые нити и была менее выражена, чем реакция на кетгут. Нити из П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ), имплантированные внутримышечно на длительный период (до 1 года), не вызвали острой сосудистой реакции в месте имплантации, а также любых других неблагоприятных реакций, таких как гнойное воспаление, некроз, кальцификация волокнистой капсулы или злокачественное опухолеобразование. Статистически значимые различия не были выявлены в реакции ткани на полимерные швы двух типов. Капсулы вокруг шелка и кетгутовые швы не стали значительно тоньше. Испытанные биополимерные нити показали необходимую прочность во время периода заживления порезов мышц. Реакция тканей на имплантацию волокон П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ), установленных по обычной схеме, была характерной реакцией для раневого процесса и для процесса внесения инородного тела [107].

Также в ряде работ была исследована эффективность противовоспалительных препаратов – диклофенак и дексаметазон [108], а также цитостатических и противоопухолевых - паклитаксел [109] и 5-фторурацил [110], доксорубицин [111], депонированных в полимерные микрочастицы из полигидроксиалканоатов. Восстановление кожных покровов при применении инкапсулированных форм противовоспалительных препаратов в виде аппликаций микрочастиц в гелевом микроокружении протекало активнее, чем при обыкновенном лечении [108, 109]. А цитостатический препарат, инкапсулированный в микрочастицы П(ЗГБ-со-ЗГВ), показал свою эффективность против опухолевых клеток HeLa [111]. Результаты позволяют сделать вывод о перспективности разработанных форм препаратов,

депонированных в полимерные микрочастицы, для лечения дефектов кожных покровов, а также противоопухолевой терапии.

### 1.1.5 Основные параметры систем доставки

Физико-химические характеристики нано- и микрочастиц (размер, дзета-потенциал) являются важными параметрами для применения в качестве систем доставки, поскольку именно они определяют поведение системы *in vivo*, оказывая влияние на её биораспределение и выведение, физическую стабильность и биологические характеристики микрочастиц.

Размер частиц и размерное распределение являются наиболее важными характеристиками микрочастиц. Размер определяет способ проникновения носителя в клетку. Также от размера зависит выделение лекарств из частиц. Более мелкие частицы имеют большую площадь поверхности, поэтому большая часть связанного с ним лекарственного средства будет находиться на поверхности частиц или вблизи нее, что приведет к быстрому высвобождению лекарственного средства. В то время как более крупные частицы имеют большие сердечники, которые позволяют заключать в капсулу большее количество лекарственного средства и медленно диффундировать ему. Мелкие частицы также имеют больший риск агрегации при хранении и транспортировке.

Размер частиц также зависит от деградации полимера. Например, было обнаружено, что скорость разложения полимера увеличивается с увеличением размера частиц *in vitro* [112]. Считалось, что в более мелких частицах продукты разложения инкапсулированного вещества могут легко диффундировать. В больших частицах продукты разложения остаются в полимерной матрице в течение более длительного периода, чтобы вызвать автокаталитическое разложение полимерного материала. Поэтому было высказано предположение,

что более крупные частицы будут способствовать более быстрой деградации полимера, а также высвобождению лекарственного средства. Однако Panyam и другие получали частицы с различными размерами и обнаружили, что скорости разложения полимера *in vitro* существенно не различаются для частиц разных размеров [113].

Помимо размера микрочастиц степень их поверхностной гидрофобности или гидрофильности играет важную роль в биораспределении. Она определяет количество адсорбированных компонентов крови, в основном белков (опсонинов). Это, в свою очередь, влияет на судьбу микрочастиц *in vivo*. Связь лекарственного средства с обычными носителями приводит к модификации профиля биораспределения лекарственного средства, поскольку он в основном передается в систему мононуклеарных фагоцитов (МНФ), таких как печень, селезенка, легкие и костный мозг. Действительно, в потоке крови поверхностно не модифицированные микрочастицы быстро опсонизируются и очищаются макрофагами из МНФ-богатых органов [114]. Следовательно, для увеличения вероятности успеха в нацеливании лекарственных средств микрочастицами необходимо минимизировать опсонизацию и продлить циркуляцию микрочастиц *in vivo*. Это может быть достигнуто путем поверхностного покрытия микрочастиц гидрофильными полимерами/поверхностно-активными веществами или формирования микрочастиц с биodeградируемыми сополимерами с гидрофильными сегментами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленоксид, полиоксамер, поллоксамин и полисорбат 80 (Твин 80). Исследования показывают, что конформация ПЭГ на поверхности микрочастиц имеет первостепенное значение для функции отражения опсонинового слоя.

Дзета-потенциал, который определяет поверхностный заряд частиц, является важным и широко используемым методом характеристики объектов нано- и микрометрового размера в жидкостях, таких как фармацевтические препараты, краски, пены, липосомы и экзосомы. Он показывает разность между

потенциалами, которая возникает при движении частиц или жидкости при наложении электрического поля или механических сил.

Показано, что микрочастицы с дзета-потенциалом выше (+/-) 30 мВ стабильны в суспензии, так как поверхностный заряд предотвращает агрегацию частиц. Электрокинетический потенциал также может быть использован для определения того, инкапсулирован ли заряженный активный материал в центр микрокапсулы или адсорбирован на поверхности [115].

Другим важным параметром систем доставки в виде микрочастиц при депонировании активного соединения является эффективность инкапсулирования (ЭИ). Данная величина указывает на процентное количество активного соединения, которое включается в состав частиц во время инкапсулирования.

В идеальном случае успешная система микрочастиц должна обладать высокой способностью к инкапсулированию лекарственного средства, тем самым уменьшая количество матричных материалов для введения. Загрузка лекарственного средства может быть осуществлена двумя способами:

1. включение во время производства микрочастиц (метод введения);
2. абсорбция препарата после образования микрочастиц путем инкубации носителя с концентрированным лекарственным раствором (метод адсорбции / абсорбции).

Эффективность инкапсулирования и захвата лекарственного средства очень сильно зависит от растворимости твердого вещества в матричном материале или полимере (твердое растворение или дисперсия), которое связано с полимерной композицией, молекулярной массой, взаимодействием с лекарственным веществом и наличием концевых функциональных групп (сложноэфирных или карбоксильных). ПЭГ-фрагмент не оказывает или мало влияет на загрузку биологически активных веществ [116]. Макромолекула или



белок проявляют наибольшую эффективность при загрузке, когда она загружается на или вблизи ее изоэлектрической точки, когда она имеет минимальную растворимость и максимальную адсорбцию. Для малых молекул исследования показывают, что использование ионного взаимодействия между лекарственным и матричным материалами может быть очень эффективным способом увеличения нагрузки.

В общем случае скорость высвобождения лекарства зависит от:

1. растворимости лекарственного средства;
2. десорбции поверхностно-связанного/адсорбированного лекарственного средства;
3. диффузии лекарственного средства через матрицу микрочастиц;
4. эрозии/деградации полимерных матриц микрочастиц;
5. сочетания процесса эрозии/диффузии.

Таким образом, растворимость, диффузия и биodeградация матричных материалов определяют процесс высвобождения. В случае микросфер, где лекарство равномерно распределено, высвобождение происходит путем диффузии или эрозии матрицы в условиях погружения. Если диффузия препарата происходит быстрее, чем разрушение матрицы, механизм высвобождения в значительной степени контролируется диффузионным процессом. Быстрое начальное высвобождение или «всплеск» в основном связывают со слабосвязанным или адсорбированным лекарственным средством и большой поверхностью микрочастиц. Очевидно, что способ включения влияет на профиль высвобождения. Если лекарство загружается методом инкорпорации, система имеет относительно небольшой эффект всплеска и лучшие характеристики с замедленным высвобождением. Если микрочастица покрыта полимерным слоем, то высвобождение контролируют путем диффузии лекарственного средства из ядра через полимерную мембрану. Мембранное

покрытие действует как барьер для высвобождения, поэтому растворимость и диффузионная способность лекарственного средства в полимерной мембране становятся определяющим фактором в высвобождении. Кроме того, на скорость высвобождения может влиять ионное взаимодействие между матрицей и биологически активным веществом, а также добавление вспомогательных ингредиентов. Когда препарат участвует во взаимодействии со вспомогательными ингредиентами с образованием менее водорастворимого комплекса, то высвобождение лекарственного средства может быть очень медленным. Тогда как добавление вспомогательных ингредиентов, например добавление блок-сополимера этиленоксид-пропиленоксида (ЭО-ПО) в хитозан, уменьшает взаимодействие модельного лекарственного бычьего сывороточного альбумина (БСА) с матричным материалом (хитозаном) из-за конкурентного электростатического взаимодействия ЭО-ПО с хитозаном. В этом случае можно наблюдать увеличение высвобождения лекарственного средства [117].

Оценка кристаллического состояния и морфологии частиц помогают в понимании полиморфных или морфологических изменений, которым может подвергнуться лекарственное средство при его микроинкапсулировании. Кроме того, при приготовлении микрочастиц могут образовываться частицы лекарственного средства в аморфном состоянии. Следовательно, важно исследовать степень аморфности лекарственного средства, образующегося при производстве микрочастиц. Изменения физического состояния частиц, а также количество аморфной фракции могут быть определены с помощью рентгеноструктурного анализа и могут быть дополнены дифференциальной сканирующей калориметрической информацией.

Определение растворимости и скорости растворения очень важно, так как эти два параметра вместе помогают предвидеть любое изменение производительности *in vivo* (профили крови, пики плазмы и биодоступность) препарата. Известно, что микрочастицы улучшают растворимость лекарственного средства. Исследование скорости растворения микрочастиц

отражает преимущества, которые могут быть достигнуты в отношении обычных составов, особенно при разработке лекарственных форм с замедленным высвобождением на основе микрочастиц.

Таким образом, изменение данных характеристик дает возможность создания наиболее качественных и эффективных систем адресной доставки лекарственных препаратов.

## 1.2 Использование систем доставки антисептиков для обработки раневых поверхностей

Кожа является основной системой внешней защиты, которая защищает системы внутренних органов от атаки микроорганизмов, загрязнений, инфекции и воздействия внешней среды. Кожа играет жизненно важную роль в регулировке температуры тела и передаче информации о внешней среде, например, боли и жара. Кожа состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и гиподермы или подкожного слоя.

Верхние слои эпидермиса или слои рогового слоя создают главный барьер для чрескожного проникновения любого внешнего вторжения. Слои дермы находятся рядом со слоем эпидермиса и состоят из матрицы соединительной ткани, которая обеспечивает эластичность и устойчивость к деформации кожи. Кроме того, слой дермы содержит кровеносные сосуды, которые питают слои полезными веществами и кислородом. Слой подкожной клетчатки представляет собой подкожную жировую ткань следующую за слоями эпидермиса и дермы, которая обеспечивает тепловую изоляцию и механическую защиту организма [118]. На рисунке 1 показаны детали диагностической структуры нормальной кожи человека и механизм работы материалов для обработки на раневом слое.

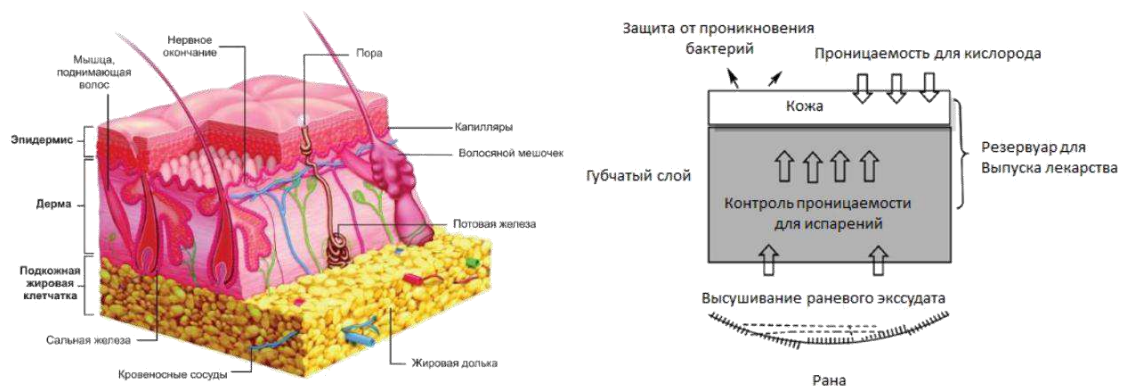


Рисунок 1 - Схематическое изображение нормальной структуры кожи и материала для обработки раневой поверхности

Рана описывается как дефект кожи, образовавшийся из-за физико-химических или термических повреждений. Раны делятся на острые и хронические раны. Острые раны представляют собой поврежденную кожу, которая нуждается в заживлении в течение 8-12 недель, примером могут быть ожоги, порезы и химические повреждения. Хронические раны нуждаются в длительном заживлении до нескольких месяцев и оставляют серьезные шрамы. Есть некоторые причины, которые задерживают заживление хронических ран, такие как диабет, сильно иссушение раны, инфекций [119].

Заживление раны проходит в течение четырех стадий: гомеостаза, воспаления, образование грануляционной ткани и ремоделирование ткани. На длительность этих фаз влияют некоторые специфические и индивидуальные факторы, например питание, возраст пациента, сопутствующие заболевания, а также размер, глубина и причина появления раны [120]. Профилактика инфекции - еще одна проблема, связанная с заживлением ран, потому что инфекция может задержать процесс заживления и вызвать другие осложнения.

Возможность доставки и контролируемого высвобождения терапевтических агентов на раневых очагах является важным аспектом развития регенеративной медицины. Быстрый и эффективный процесс заживления ран значительно снизит расходы на медицинское обслуживание, средства для ухода за ранами и госпитализацию, что значительно улучшит качество жизни пациентов. Развитие

полимерных биотехнологий может улучшить материалы и конструкции, используемые при местном лечении ран, чтобы эффективно выпускать противомикробные, противовоспалительные и регенерирующие соединения, ускоряя эндогенный процесс заживления. Структурированные полимерные повязки могут преодолеть ограничения, которые есть у использующихся покрытий, а использование микрочастиц может преодолеть недостатки существующих антибиотиков и антисептиков (главным образом цитотоксичность, устойчивость к антибиотикам и аллергии). Комбинация компонентов с антибиотическими, регенеративными или противовоспалительными свойствами вместе с полимерными материалами является многообещающим подходом для удовлетворения всех требований, необходимых для следующего поколения биоактивных заживляющих систем [121].

Однако при анализе литературы было выявлено, что современные системы доставки препаратов для заживления ран не всегда обладают необходимыми свойствами и эффективностью. Увеличения терапевтической эффективности можно достичь с помощью инкапсулирования нескольких биологически активных веществ для осуществления комбинированной терапии. Соответствующая система контролируемого высвобождения, содержащая, например, антисептики и факторы роста, может быть эффективной терапией для заживления ран. Носитель, а также кинетика высвобождения антисептика и фактора роста оказывают значительное влияние на заживление зараженной раны. Предполагается, что носитель оптимизирует кинетику высвобождения, обеспечивая последовательную доставку, состоящую из быстрого выделения антисептика для предотвращения бактериальной колонизации и устойчивое высвобождение факторов роста для улучшения заживления. Ранее наночастицы и липосомы использовались для последовательной доставки множества лекарств во внутриклеточных применениях, таких как опухоли и вирусная инфекция. Тем не менее, они не подходят для применений, которые требуют

долгосрочного внеклеточного высвобождения лекарственного средства, такого как хронические раны. Основная сложность таких систем заключается в необходимости загрузки лекарств в разные пространственные местоположения микросфер, включая оболочку и сердцевину [122].

Современные технологии инкапсулирования позволяют включать в частицы множество различных биологически активных веществ. Однако в ходе анализа литературы было выявлено, что данных об инкапсулировании антисептических средств значительно меньше, чем других БАВ.

### 1.2.1 Использование антисептиков в качестве инкапсулируемых веществ

Антисептики используются в больницах по всему миру для уменьшения, инактивации или устранения потенциально патогенных микроорганизмов. Конкуренентоспособность в отношении потенциала микробного загрязнения и рисков заражения также привела к более широкому использованию антисептиков и дезинфицирующих средств. В этих веществах найдено большое количество активных химических соединений (или «биоцидов»), многие из которых использовались в течение сотен лет для антисептики, дезинфекции и консервации. Биоциды имеют более широкий спектр активности, чем антибиотики, и могут иметь несколько целей.

«Биоцид» - это общий термин, описывающий химический агент, обычно широкого спектра действия, который инактивирует микроорганизмы. Свойства биоцидов в противомикробной активности могут быть различными: «-статическими», относящимися к агентам, которые ингибируют рост (например, бактериостатический, фунгистатический и спористатический) и «-цидными», относящийся к агентам, которые убивают целевой организм (например, спорицидный, вируцидный и бактерицидный) [123].

В качестве антисептиков применяют, как правило, химические соединения, которые характеризуются высокой активностью в отношении подавляющего большинства микроорганизмов, малым латентным периодом действия, низкой токсичностью при местном назначении (в том числе отсутствием аллергизирующего действия), сохранением активности в присутствии продуктов тканевого распада, отсутствием местнораздражающего действия и угнетающего влияния на процессы заживления раны.

Среди антисептиков различают следующие основные группы препаратов:

1. Галогены — препараты йода (раствор йода спиртовой, раствор Люголя, йодоформ, йодиол) и хлора (хлорамин Б);
2. Детергенты (декамин, хлоргексидин, этоний, церигель, дегмицид, роккал);
3. Кислоты (борная, салициловая), щелочи (раствор аммиака, натрия тетраборат), спирты (спирт этиловый), альдегиды (формальдегид, гексаметилен-тетрамин);
4. Красители (бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, этакридина лактат);
5. Окислители (раствор перекиси водорода, гидроперит, калия перманганат);
6. Производные оксихинолина (хинозол);
7. Соединения тяжелых металлов (ртути дихлорид, ртути оксицианид, ртути амидохлорид, ртути окись желтая, ртути монохлорид, серебра нитрат, колларгол, протаргол, цинка сульфат);
8. Фенолы (фенол, трикезол, резорцин, фенилсилицилат), дегти и смолы (деготь березовый, ихтиол, нефть нафталанская рафинированная, винилин).

Кроме того, в качестве антисептиков используются и некоторые другие синтетические препараты, например производные нитрофурана (фурацилин), и вещества природного происхождения (новоиманин, бализ).

Эти вещества имеют разную степень активности, неодинаковые спектры антимикробного действия, токсичность и влияние на обрабатываемые объекты и, как следствие, широкую сферу применения. Знание свойств и особенностей дезинфицирующих средств необходимо для их правильного выбора и эффективного применения в соответствии с поставленной целью. Поэтому актуальные антисептики играют ключевую роль в лечении ран в современной клинической практике. Философия локальной доставки антисептиков кожи заключается в том, чтобы повысить уровень антимикробных препаратов в тканях до уровня, на котором ингибируются чувствительные и относительно нечувствительные организмы, и избежать потенциальных системных побочных эффектов антибиотиков с высокой дозой [124]. Среди наиболее распространенных и изученных антисептических препаратов, инкапсулируемых в полимерные микрочастицы, выделяют «Хлоргексидин», «Бетадин», «Мирамистин», «Фурацилин» и др.

### 1.2.2 Бриллиантовый зеленый

Бриллиантовый зелёный (тетраэтил-4,4-диаминотрифенилметана оксалат) — синтетический анилиновый краситель трифенилметанового ряда. Разрешен в РФ к применению в качестве местного антисептика. Он является одним из самых высокоактивных и быстродействующих антисептиков (активен в отношении грамположительных бактерий), также оказывает фунгицидное действие в отношении некоторых патогенных грибов. Менее эффективен против грамотрицательных микроорганизмов и неэффективен против кислотоустойчивых бактерий и бактериальных спор [125]. В водной среде действует губительно на культуру золотистого стафилококка (*Staphylococcus*



*aureus*) в концентрации 1:10 000 000. Высокую чувствительность к бриллиантовому зелёному обнаруживает дифтерийная палочка (*Corynebacterium diphtheriae*).



Рисунок 2 – Спиртовой раствор Бриллиантового зеленого 1%

При изучении профильных литературных баз было выяснено, что в качестве инкапсулируемого антисептика бриллиантовый зеленый еще не использовался.

### 1.2.3 Фурацилин

Нитрофурал (новолат. *nitrofur*al, распространенный синоним — фурацилин, лат. *furacilinum*) — антисептическое средство местного действия, относится к группе нитрофуранов. Обладает противомикробным действием. От других препаратов группы отличается механизмом действия, основанным на восстановлении 5-нитрогруппы микробных флавопротеинов с образованием реактивных аминопроизводных, способных вызывать изменения в белках (включая рибосомальные) и других макромолекулах, приводя клетки патологических микроорганизмов к гибели.

Активен в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий: *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Shigella flexneri spp*, *Shigella dysenteria spp*, *Salmonella spp*, *Shigella sonnei spp*, *Shigella boydii spp*, *Clostridium perfringens*,

*Escherichia coli* и др. У микроорганизмов устойчивость к препарату развивается медленно и высокой степени не достигает.



Рисунок 3 – Фурацилин в таблетках

Фурацилин является одним из широко используемых антисептиков для инкапсуляции в полимерные матрицы. Одним из примеров может служить статья Е. В. Грехневой с соавторами, в которой они проводили микрокапсулирование фурацилина в водорастворимые полимеры природного (альгинат натрия и гуаровая камедь) и синтетического (поливиниловый спирт и поливинилпирролидон) происхождения [126].

Также с целью создания биоразлагаемых полимерных материалов для доставки лекарственных веществ А. А. Ольховым и его коллегами была изучена тройная система ПГБ-шунгит-фурацилин, которая оказалась весьма перспективной: с ростом содержания шунгита 0-5% происходит уменьшение значений скорости высвобождения ЛВ из композитов в 10 раз. Предполагаемое образование ассоциатов ПГБ-фурацилин-шунгит приводит к значительному увеличению прочности композиционных пленок (в 2-3 раза) по сравнению с исходными и двух - компонентными пленками [127].

С. Ю. Зайцевым и другими были изучены пленки с фурацилином. На основе смеси N-поливинилпирролидона и поливинилового спирта, а также сополимера N-винилпирролидона с малеиновым ангидридом получали прозрачные пленки, в которые вводили фурацилин. Многократно набухшие гелевые пленки были

протестированы в качестве перевязочных материалов для лечения ожогов и ран. Полученные пленки (со)полимера обладают антимикробными свойствами и способны поглощать раневой экссудат. Было показано, что пленка легко отделяется от раневой поверхности. Полученные препараты могут применяться в медицине человека и животных в качестве перевязочных ожоговых средств и других материалов [128].

Еще одни пленки были получены Панковой Ю. Н. Она исследовала транспортные свойства пленок на основе композиций поли(3-гидроксибутирата) и полиамида. Было установлено, что фактором, ответственным за скорость контролируемого высвобождения антисептика из композиционных пленок, является сопряжение диффузии и деструкции П(ЗГБ). Была показана принципиальная возможность использования таких композиций в качестве матричных систем для длительной (более 1 мес.) контролируемой доставки модельного лекарственного вещества (антисептика фурацилина) с постоянной и регулируемой скоростью высвобождения [129].

#### 1.2.4 Мирамистин

Мирамистин — (лат. *miramistin*, *myramistin*) лекарственный препарат, относящийся к группе катионных антисептиков, поверхностно-активных веществ (четвертичные аммониевые соединения) и обладающий противомикробным, противовоспалительным действием. Препарат активен в отношении различных патогенных микроорганизмов, в том числе вирусов, грибков, бактерий и простейших. Местное иммуностимулирующее воздействие препарата обеспечивается посредством активации функции фагоцитарных клеток (фагоцитов и макрофагов). Молекулы препарата воздействуют на наружную оболочку микробной клетки, что приводит к её разрушению и гибели. На сегодняшний день препарат применяется в различных областях

медицины, включая хирургию, стоматологию, травматологию, дерматологию, венерологию.



Рисунок 4 – Раствор Мирамистина 0,01%

В статье Камаевой С. С. была описана разработка лекарственных пленок на основе акриламида, виниловых и акриловых мономеров с мирамистином для лечения воспалительных заболеваний в гинекологии. Разработанные пленки показали выраженное антимикробное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, бледной трепонемы, патогенных грибов, некоторых вирусов и простейших [130].

Исследована антимикробная активность мирамистина и на основе полимерных гидрогелей. Чернецкой Ю. Г. была показана высокая противогрибковая активность гидрогелевых полимерных матриц, содержащих мирамистин, в отношении *Candida albicans*. Клиническое изучение показало, что аппликации лекарственных средств «Гидрогелевые пластины мирамистина 0,05%» обеспечивают местный бактериостатический эффект, что подтверждается выраженным снижением микробного числа, защищают раны от вторичного инфицирования [131]. Успешным применением этих результатов можно считать формоустойчивую повязку ГелеПран® с мирамистином, которая обеспечивает влажное заживление сухих и не препятствует воздухообменным процессам. Гидрофобный парафин, которым пропитана хлопчатобумажная основа ГелеПрана®, размягчается и постепенно выделяет лечебные вещества.

Входящие в состав молекулы мирамистина, постепенно высвобождаясь, уменьшают воспалительные процессы [132].

Еще один вид систем доставки мирамистина был получен Гриб И. В. и коллегами. Сшитые хитозановые микросферы с различным содержанием мирамистина были получены с помощью распылительной сушки. Размер частиц варьировался в диапазоне от  $2,4 \pm 0,6$  до  $3,1 \pm 1,0$  мкм. Включение лекарства и эффективность инкапсуляции составляли около 30,8 и 92,0 % соответственно. Профиль высвобождения мирамистина *in vitro* показал, что 80 % (масс.) мирамистина от включенного было освобождено из хитозановых микросфер через 2 ÷ 4 часа [133].

Также были получены микрочастицы пектината кальция методом распылительного высушивания. Куликовской В. И. была разработана методика, позволяющая включать в них до 30 масс. % мирамистина. Было показано, что в физиологическом растворе через 48 ч выход вещества составляет 2/3 от включенного количества [134].

## 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты и методы

#### 2.1.1 Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов

Объектом исследования послужили высокоочищенные образцы полигидроксиалканоатов (ПГА): гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ), 1200 кДа) и сополимеры 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (П(ЗГБ-со-ЗГВ), 1500 кДа), синтезированные в лаборатории Хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН.

Таблица 1 - Биоразрушаемые ПГА, используемые для получения микрочастиц

Состав полимера, мол. %	Структурная формула	Свойства полимера	
		M <sub>n</sub> , г/моль	M <sub>w</sub> , г/моль
П(ЗГБ) 100	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\   \quad \parallel \\ \text{-(O-CH-CH}_2\text{-C)-}_x \end{array}$	5080,6 ± 0,009	414726,7 ± 0,001
П(ЗГБ-со-ЗГВ) 89:11	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \quad \text{CH}_3 \\   \quad \parallel \quad   \quad \text{O} \\ \text{-(O-CH-CH}_2\text{-C)-}_x \text{-(O-CH-CH}_2\text{-C)-}_y \end{array}$	5542,5 ± 0,003	260986,7 ± 0,005

#### 2.1.2 Вспомогательные вещества

В работе использован поливиниловый спирт (ПВС) с M<sub>w</sub> 31–50 кДа (Sigma-Aldrich, США). Хлороформ, дихлорметан.

Сбалансированный фосфатный буфер (СФБ), содержащий 137 мМ раствор хлорида натрия, 2 мМ раствор хлорида натрия и 10 мМ раствор фосфатного буфера, pH = 7,4 ± 0,1 (Amresco, США).

Для культивирования клеток использован фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко (DPBS) без содержания хлорида кальция и хлорида магния (Gibco®, Invitrogen, Великобритания). Связующий буфер (Bindingbuffer), содержащий

100 мМ раствор Хепеса/NaOH, 1,4 М NaCl и 25 мМ CaCl<sub>2</sub>. Диметил сульфоксид (DMSO) (MP Biomedicals, LLC, Франция). Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), содержащую 1 г/л D-глюкозы, L-глутамин, 25 мМ раствор Хепеса и пируват (Gibco®, Invitrogen, Великобритания); питательную среду общего назначения Mueller-Hinton (BioRad, Франция), содержащую мясной экстракт, кислотный гидролизат казеина, крахмал, питательный бульон общего назначения Nutrient broth (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия), содержащий мясной экстракт, пептический перевар животной ткани, дрожжевой экстракт и натрия хлорид.

Также в работе были использованы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолбромидом (МТТ), 4 мМ раствор кальцеина АМ (CalceinAM), 2 мМ раствор Этидиум гомодмиера-1 (EthD-1), 50 мМ раствора аннексина 5 (Annexin VFITC Conjugate), Ethidium bromid (PBS) (Sigma-Aldrich, США). Эмбриональная бычья сыворотка (Gibco® by Life Technologies™, Великобритания), раствор антибиотиков стрептомицина и пенициллина (Antibiotic-Antimycotic) (Gibco®, Invitrogen, Великобритания), краситель Acridine Orange (BD Diagnostics).

## 2.2 Конструирование микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов

Микрочастицы получали эмульсионным методом, который заключается в диспергировании и стабилизации дисперсной фазы в нерастворимой дисперсионной среде. Для получения эмульсии полимер растворяют в органическом растворителе (дихлорметан, хлороформ, этилацетат и др.). Для успешного эмульгирования растворитель должен быть полностью или почти несмешиваемым с водой. После образования стабильной эмульсии органический растворитель выпаривается при непрерывном перемешивании[69].

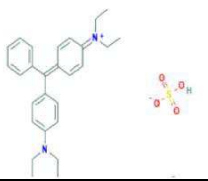
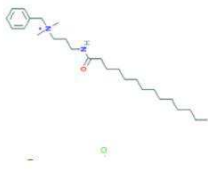
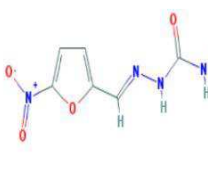
Для получения частиц 2 % раствор ПГА (200 мг в 10 мл дихлорметана) постепенно вливали в 100 мл 1 % водного раствора поливинилового спирта

(ПВС) при перемешивании на магнитной мешалке со скоростью перемешивания 750 об/мин. Полученную эмульсию оставляли на сутки при постоянном механическом перемешивании до полного испарения растворителя. Микрочастицы собирали центрифугированием в течение 5 мин (9000 об/мин), промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при 37°C.

### 2.3 Конструирование микрочастиц, нагруженных антисептическими препаратами

В качестве лекарственных препаратов для инкапсулирования в полимерные микрочастицы использовали антисептики для местного применения – «Бриллиантовый зеленый», «Мирамистин», «Фурацилин». Характеристики вышеописанных препаратов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Лекарственные препараты, инкапсулированные в полимерные микрочастицы, и механизм их действия

Препарат	Формула	Мол. масса, г/моль	Механизм действия
Бриллиантовый зеленый		475,6	Слабо изучен
Мирамистин		457,2	Взаимодействует с липидным слоем мембран микроорганизмов, вызывая их разрушение и увеличивая проницаемость, индуцирует цитолиз.
Фурацилин		198,2	Восстанавливает 5-нитрогруппы микробных флавопротеинов с образованием реактивных аминопроизводных, вызывающих изменения в белках, приводя клетки патологических микроорганизмов к гибели.



Инкапсулирование выбранных лекарственных препаратов было осуществлено с использованием метода испарения растворителя из двойной эмульсии.

К 2 % раствору полимера, растворенного в дихлорметане, добавляли водный раствор препарата, с содержанием равным 10 % от массы полимера. Растворы гомогенизировали с помощью ультразвука «Sonicator-S3000» фирмы Misonix Incor. (США) при мощности 7 Вт в течение 2 мин. Далее полученную эмульсию постепенно вливали в 100 мл 1 % водного раствора ПВС, перемешиваемого магнитной мешалкой со скоростью 750 об/мин. Полученную двойную эмульсию оставляли на сутки при постоянном механическом перемешивании до полного испарения растворителя. Микрочастицы собирали центрифугированием (9000 об/мин, 5 мин), промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 37°C.

## 2.4 Характеристики полученных микрочастиц

### 1. Морфология, выход и размер микрочастиц

Морфологию микрочастиц изучали с применением сканирующей электронной микроскопии на микроскопах S-5500 (Hitachi, Япония). Напыление образцов платиной/золотом проводили в установке K575XD Turbo (Emitech, Англия).

Выход микрочастиц рассчитывали в процентах от массы использованного для их получения полимера:

$$= \frac{W_m}{W_p} \cdot 100\%,$$

где  $W_m$  – масса полученных микрочастиц, мг;

$W_p$  – масса использованного полимера, мг.

Размер и размерное распределение полимерных микрочастиц изучали на световом микроскопе Eclipse Ti-U (Nikon, Япония) при анализе 10 полей зрения.

## 2. Электрокинетический потенциал

Электрокинетический потенциал (дзета-потенциал), который определяется электрофоретической подвижностью частиц в суспензии, измеряли с применением уравнения Генри на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS. Измерения проводили в автоматическом режиме по стандартной методике, рекомендуемой производителем.

## 3. Величина включения и эффективность инкапсулирования антисептиков

Величину включения лекарственных препаратов в полимерную матрицу определяли спектрофотометрированием по его исходной и остаточной концентрации в эмульсии при излучении на длине волны 625 нм (бриллиантовый зеленый), 260 нм (мирамистин), 367 нм (фурацилин), на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США).

Эффективность инкапсулирования (ЕЕ) препарата в полимерной матрице рассчитывали по формуле

$$E.E. = \frac{W_{total} - W_{free}}{W_{total}} \cdot 100\%$$

где  $W_{total}$  – исходная масса препарата, мг;

$W_{free}$  – масса препарата, не включенная в полимерную матрицу, мг.

## 4. Исследование оттока лекарственного препарата in vitro

Полученные из ПГА микрочастицы, нагруженные лекарственными препаратами, стерилизовали УФ-излучением в течение 3 часов и помещали в стерильные пробирки с крышкой в 40 мл СФБ (рН 7,4); пробирки экспонировали в термостате при 37 °С (n = 3). Пробы отбирались по истечении 1; 2; 3; 6; 8; 24; 48; 72; 168; 240; 528 и 648 часов. Для определения количества препарата, вышедшего в среду, анализировали пробы, предварительно осадив

микрочастицы центрифугированием (9000 об/мин, 5 мин) на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США).

Высвобождение препарата DR в фосфатном буфере определяли по формуле

$$= \frac{r}{e} \cdot 100\%$$

где  $e$  – величина включения препарата в полимерной матрице, мг/мл;

$r$  – выход препарата, мг/мл.

## 5. Исследования цитотоксичности и эффективности действия сконструированных форм *in vitro*

Изучение токсичности микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ)-со-П(ЗГВ), нагруженных различными лекарственными препаратами, было проведено в экспериментах с использованием линии мышинных фибробластов NIH 3T3, которые были посеяны на микрочастицах ( $5 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>). Готовили суспензии микрочастиц каждого типа по 10 мг в 50 мкл фосфатно-солевого буфера, которые затем помещали в 24-луночные культуральные планшеты.

Микрочастицы стерилизовали под УФ-излучением в течение 3 часов. Частицы без лекарственных препаратов, а также полистироловые планшеты использовали в качестве контроля.

Культивирование клеток (NIH 3T3) проводили в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и раствора антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл) (Sigma) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5 % атмосфере CO<sub>2</sub> при 37° С. Замену среды производили раз в три дня. Засев клеток проводили из расчета 10<sup>6</sup> клеток/мл, 50 мкл суспензии клеток наносили на поверхность матрикса и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 1 час для того, чтобы клетки прикрепились к поверхности, затем добавляли полную питательную среду до 1 мл.

Количество жизнеспособных клеток оценивали в МТТ-тесте. Для этого в лунку с каждым типом матрикса было добавлено по 50 мкл раствора МТТ (5 %) и 950 мкл полной питательной среды. Через 4 часа культивирования среду с раствором МТТ заменили ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формазана. Через 30 минут супернатант был перенесен в 96-луночный планшет и проведено измерение оптической плотности при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Количество клеток на матриксах оценивали по калибровочному графику.

Для визуализации жизнеспособности клеток на матриксе использовали флуоресцентный краситель Acridine Orange (BD Diagnostics), окрашивание проводили согласно стандартным протоколам. Матрикса с прикрепленными клетками промывали фосфатно-буферным раствором Дульбекко (DPBS) и фиксировали 1 % раствором формалина в течение 15 минут (RT), затем снова промывали буферным раствором, 70 % этанолом в течение 15 минут, добавляли 0,2 мл раствора RNAs, выдерживали при 37°C 30 минут. После этого матрикса с клетками снова промывали буферным раствором, добавляли 0,5 мл 0,1 М раствора HCl, красили Acridine Orange (30-45 сек), снова промывали буферным раствором и добавляли 100 мкг/мл Ethidium bromid (PBS), выжидали 5 минут. Затем матрикса промывали DPBS и помещали на предметное стекло. Наблюдение проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Eclipse Yi-U (Nikon, Япония).

#### 6. Оценка антибактериального действия микрочастиц с антисептиками

Антибактериальную активность микрочастиц, нагруженных антисептиками определяли с использованием диско-диффузионного метода и метода минимальной подавляющей концентрации в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Диско-диффузионный метод основан на регистрации диаметра зоны ингибиции

роста исследуемых микроорганизмов вокруг круглого носителя антибактериального препарата (бумажного диска) [135].

Для получения питательной среды разводили среду Mueller-Hinton (BioRad, Франция) в дистиллированной воде (из расчета 25 мл на чашку) и нагревали до полного растворения. Далее подготовленные чашки Петри и питательную среду стерилизовали автоклавированием при 1 А и 121 °С в течение 3 часов. После остывания чашек Петри, их заполняли расплавленной средой так, чтобы толщина слоя агара в чашке была в среднем 4 мм, и оставляли при комнатной температуре до полного застывания.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антисептическим препаратам использовали инокулят, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту McFarland и содержащий порядка  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Инокуляцию проводили стерильными ватными палочками равномерными штриховыми движениями, поворачивая чашку Петри под углом 30°. Спустя 10 минут посередине чашки Петри в агаре проделывали вертикальные лунки диаметром 1 см и вносили в них суспензию микрочастиц в физиологическом растворе, а также растворы антисептиков, в объеме 300 мкл. Затем чашки Петри оставляли в термостате при 37 °С. Спустя сутки измеряли диаметр зон задержки роста культуры.

Также был проведен метод серийных разведений. Данный метод основан на прямом определении основного показателя, характеризующего микробиологическую активность антисептика, - минимальной концентрации, подавляющей видимый рост исследуемого микроорганизма (МПК). Для определения МПК заданные концентрации антисептика вносили в питательную среду, которую затем засеивали культурой исследуемых микроорганизмов и после инкубации оценивали наличие или отсутствие роста [136].

Для получения питательного бульона разводили среду Nutrient broth (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) в дистиллированной воде (из расчета 7 мл на пробирку) до полного растворения и разливали по пробиркам. Далее

подготовленные пробирки с питательной средой стерилизовали автоклавированием при 1 А и 121 °С в течение 3 часов.

Рабочие навески антисептиков, пустых микрочастиц и микрочастиц, нагруженных антисептиками, готовили в асептических условиях, по 0,05, 0,1 и 0,2 г для частиц с «Бриллиантовым зеленым» и по 0,04, 0,08 и 0,16 г для частиц с «Фурацилином».

Для определения чувствительности микроорганизмов к антисептическим препаратам использовали инокулят, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту McFarland и содержащий порядка  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Суспензию готовили из агаровой культуры на стерильном изотоническом растворе. Затем разводили в жидкой питательной среде до концентрации  $10^6$  КОЕ/мл и вносили по 1 мл в пробирки с антисептиками. Пробирки закрывали стерильными ватно-марлевыми пробками и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 16-20 ч. По истечению времени оценивали мутность питательной среды в сравнении контрольных и экспериментальных групп.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста магистерской диссертации изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активное вещество

БЗ – «Бриллиантовый зеленый»

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГА – гидроксиапатит

ЛВ – лекарственное вещество

МНФ – мононуклеарные фагоциты

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолбромидом

МТЗ-МП – микрочастицы хитозана с метронидазолом

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПЛА – полилактид

ПЛГА – полилактид-ко-гликолид

ПММА – полиметилметакрилат

ППС – полипропиленсульфид

П(ЗГБ) – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты

(П(ЗГБ-со-ЗГВ)) - сополимеры 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот

(П(ЗГБ-со-ЗГГ)) - сополимеров 3-гидроксимасляной и 3-гидроксигексановой кислот

(П(ЗГО)) – поли (3-гидроксиоктаноат)



ПЭГ – полиэтиленгликоль

СФБ – сбалансированный фосфатный буфер

ЭИ – эффективность инкапсулирования

ЭО-ПО – блок-сополимер этиленоксид-пропиленоксид

(O/W) – двухкомпонентная эмульсия масло/вода

(S/O/W) – трехкомпонентная эмульсия твердое/масло/вода

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Imre, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends / B. Imre, V. Pukánszky // *European polymer journal*. - 2013. – Vol. 49, № 6. – P. 1215–1233.
2. Войнов, Н. А. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др. ; под науч. ред. Т. Г. Володиной. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009.
3. Бонарцев, А. П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата / А. П. Бонарцев, С. Г. Яковлев, Е. В. Филатова и др // *Биомедицинская химия*. – 2011. – Т. 57, № 2. – С. 232-240.
4. Prabakaran, M. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems / M. Prabakaran, J. F. Mano // *Drug Delivery*. – 2008. – Vol. 12, № 1. – P. 41-57.
5. Sipai Altaf Bhai, M. Liposomes: an overview / M. Sipai Altaf Bhai, Y. Vandana, Y. Mamatha, V. V. Prasanth // *Journal of Pharmaceuticals and Scientific Innovation*. – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 13-21.
6. Hatakeyama, H. Development of a Novel Liposomal DDS by Manipulating Pharmacokinetics and Intracellular Trafficking for Drug Therapy and Nucleic Acid Medicine / H. Hatakeyama // *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. – 2018. – Vol. 138, № 5. – P. 591-598.
7. Salkho, NM. Liposomes as a Promising Ultrasound-triggered Drug Delivery System in Cancer Treatment / NM. Salkho, RZ. Turki, O. Guessoum et al // *Curr. Mol. Med*. – 2017. – Vol. 17, № 10. – P. 668-688.
8. Franco, MS. Liposomes co-encapsulating anticancer drugs in synergistic ratios as an approach to promote increased efficacy and greater safety / MS. Franco, MC. Oliveira // *Anticancer Agents Med. Chem*. – 2018.

9. Altamirano-Vallejo, JC. Characterization and Pharmacokinetics of Triamcinolone Acetonide-Loaded Liposomes Topical Formulations for Vitreoretinal Drug Delivery / JC. Altamirano-Vallejo, J. Navarro-Partida, A. Gonzalez-De la Rosa // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* – 2018.
10. Borin, DB. Production, characterization and toxicology assay of creatine pegylated nanoliposome with polysorbate 80 for brain delivery / DB Borin, NJ Mezzomo et al // *An. Acad. Bras. Ciênc.* – 2018.
11. Mendes, L. P. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy / L. P. Mendes, J. Pan, V. P. Torchilin // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22, № 9.
12. Lancina, MG. Dendrimers for Ocular Drug Delivery / MG. Lancina, H. Yang // *Can. J. Chem.* – 2017. – Vol. 95, № 9. – P. 897-902.
13. Qiu, X. Drug delivery system based on dendritic nanoparticles for enhancement of intravesical instillation / X. Qiu, K. Cao, T. Lin // *Int J Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 7365–7374.
14. Xu, H.-L. Sustained-release of FGF-2 from a hybrid hydrogel of heparin-polyoxamer and decellular matrix promotes the neuroprotective effects of proteins after spinal injury / H.-L. Xu, F.-R. Tian, J. Xiao et al // *Int J Nanomedicine.* – 2018. – Vol. 13. – P. 681–694.
15. Fukuoka, Y. Combination Strategy with Complexation Hydrogels and Cell-Penetrating Peptides for Oral Delivery of Insulin / Y. Fukuoka, ES. Khafagy, T. Goto // *Biol. Pharm. Bull.* – 2018. – Vol. 41, № 5. – P. 811-814.
16. Kwon, GS. Polymer micelles as drug carriers / GS. Kwon, Teruo Okano // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 1996. – Vol. 21, № 2. – P. 107-116.
17. Li, J. A simple reduction-sensitive micelles co-delivery of paclitaxel and dasatinib to overcome tumor multidrug resistance / J. Li, R. Xu, X. Lu // *Int J Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 8043–8056.
18. Ding, Y. Development and Evaluation of a Novel Drug Delivery: Soluplus®/TPGS Mixed Micelle Loaded With Piperine In Vitro and In Vivo /

- Y. Ding, C. Wang, Y. Wang // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2018. - Vol. 27. – P. 1-8.
19. Jun, H. Redox-Responsive Biomimetic Polymeric Micelle for Simultaneous Anticancer Drug Delivery and Aggregation Induced Emission (AIE) Active Imaging / H. Jun, Z. Weihua, M. Boxuan et al // Bioconjugate Chem. – 2018.
20. Kim, G. Self-assembled polymeric micelles for combined delivery of anti-inflammatory gene and drug to the lungs by inhalation / G. Kim, C. Piao, J. Oh, M. Lee // Nanoscale. – 2018. – Vol. 10, № 18. – P. 8503-8514.
21. Zhang, S. Conjugates of TAT and folate with DOX-loaded chitosan micelles offer effective intracellular delivery ability / S. Zhang, Y. Liu, Y. Gan // Pharmaceutical development and technology. – 2018.
22. Global Global Microspheres Market - Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends And Forecast, 2013 - 2018 // Transparency Market Research. – 2016. – P. 247.
23. Campos, E. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications / E. Campos, J. Branquinho, A. S. Carreira, A. Carvalho // European Polymer Journal. – 2013. – Vol. 49, № 8. – P. 2005–2021.
24. Doucet, J. Advances in Degradable Embolic Microspheres: A State of the Art Review / J. Doucet, L. Kiri, K. O'Connell // J Funct Biomater. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 14.
25. Anselmo, A. C. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems / A. C. Anselmo, S. Mitragotri // Journal of Controlled Release. – 2014. – Vol. 190, № 28. – P. 15-28
26. Инъекционные препараты пролонгированного действия на основе микрочастиц [Электронный ресурс]: ЗАО «Институт фармацевтических технологий». – Режим доступа: <http://ipt.ru.com/inekcionnye-preparaty-prolongirovannogo-dejstviya-na-osnove-mikrochastic>.
27. Пат. 2471478 Российская Федерация, МПК А61К9/08, А61К9/127, А61К31/44, А61К47/36, А61Р25/30. Инъекционный препарат / С. А.

- Кедик; заявитель и патентообладатель С. А. Кедик ; заявл. 08. 12. 11 ;  
опубл. 10. 01. 013.
28. Berklund, C. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres / C. Berklund, MJ. Kipper, B. Narasimhan // *Journal of Controlled Release*. –
29. Brazel, SC. Modeling of drug release from swellable polymers / SC. Brazel, NA. Peppas // *European Journal Pharm Biopharm*. – 2000. – Vol. 49. – P. 47–48.
30. Chaumeil, JC. Tablets of metronidazole microcapsules: release characterization / JC. Chaumeil, C. Chemtob, M. Ndongo // *Int J Pharm Sci*. – 1986. – Vol. 29. – P. 83–92.
31. Jayaprakash, S. Preparation and evaluation of biodegradable microspheres of methotrexate / S. Jayaprakash, Sm. Halith, P. Firthouse // *Asian Journal Pharm*. – 2009. – Vol. 3. – P. 26–29.
32. Xiong, Y.-C. Application of Polyhydroxyalkanoates Nanoparticles as Intracellular Sustained Drug-Release Vectors / Y.-C. Xiong, Y.-C. Yao, X.-Y. Zhan, G.- Q. Chen // *J. Biomat. Sci*. – 2010. – Vol. 21. – P. 127–140.
33. Birnbaum, DT. Microparticle drug delivery systems / DT. Birnbaum, L. Brannon-Peppas, DM. Brown // Totowa: Humana Press Inc. – 2003. – P. 117–136.
34. Jain, N. Recent approaches for the treatment of periodontitis / N. Jain, GK. Jain, S. Javed, et al // *Drug Discov. Today*. – 2008. – Vol. 13, № 932. – P. 43
35. Poole, K. M. ROS-responsive microspheres for on demand antioxidant therapy in a model of diabetic peripheral arterial disease / K. M. Poole, C. E. Nelson, R. V. Joshi // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 41. – P. 166-175.
36. Pichayakorn, W. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing metronidazole for periodontitis treatment / W. Pichayakorn, P. Boonme // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. – 2013.

37. Joshi, D. Advanced drug delivery approaches against periodontitis / D. Joshi, T. Garg, A. t K. Goyal, G. m Rath // Drug Delivery. – 2016. – Vol. 23, № 2.
38. Dhall, S. Release of insulin from PLGA-alginate dressing stimulates regenerative healing of burn wounds in rats / S. Dhall, JP. Silva, Y. Liu et al // Clin. Sci. Lond. – 2015. – Vol. 129, № 12. – P. 1115–1129.
39. Scriven, LE. Physics and applications of dip coating and spin coating / LE. Scriven // Mater Res. Soc. Symp. Proc. – 1988. – Vol. 121. – P. 717–29.
40. Suppakul, P. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications / P. Suppakul, J. Miltz, K. Sonneveld, SW. Bigger // J Food Sci. – 2006. – Vol. 68.
41. Shi, L. In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles / L. Shi, X. Wang, F. Zhao et al // Int J Nanomed. – 2013. – Vol. 8.
42. Bile, J. Antimicrobial films containing microparticles for the enhancement of long-term sustained release / J. Bile, M.-A. Bolzinger, J.-P. Valour et al // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2015. – Vol. 42. – P. 818-824
43. Deasy, PB. Microencapsulation and related drug processes // New York: Marcel Dekker. – 1984.
44. Donbrow, M. Recent advances in microcapsule delivery systems / M. Donbrow, In: Breimer DD, editor // Topics in pharmaceutical sciences. Elsevier Science. – 1987. – P. 33–45.
45. Cumpstey, I. Chemical modification of polysaccharides / I. Cumpstey // ISRN Org Chem. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-27.
46. Bajpai, VK. The diversity of bioactive polysaccharide originated from marine sources: a review / VK. Bajpai, IA. Rather, J. Lim, YH. Park // Indian J Geo-Mar Sci. – 2014. – Vol. 46, №7. – P. 1245-1252.
47. Klompong, V. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type / V. Klompong, S. Benjakul, D.

- Kantachote, F. Shahidi // *Food Chem.* – 2007. – Vol. 102, №4. – P. 1317-1327.
48. Ruttarattanamongkol, K. Functionalization of whey proteins by reactive supercritical fluid extrusion / K. Ruttarattanamongkol // *Songklanakarin J Sci Technol.* – 2012. – Vol. 34, № 4. – P. 395-402.
49. Gomes, S. Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering / S. Gomes, IB. Leonor, JF. Mano et al // *Prog Polym Sci.* – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 1–17.
50. Budja, M. Neolithic pottery and the biomolecular archaeology of lipids / M. Budja // *Documenta Praehistorica XLI.* – 2014.
51. Saranji, P. Solid lipid nanoparticles—a review / P. Saranji, S. Padhi // *J Crit Rev.* – 2016. – Vol 3, № 3. – P. 5-12
52. Hirva, S. Bicelle: a lipid nanostructure for transdermal delivery / S. Hirva, P. Jenisha // *J Crit Rev.* – 2016. - Vol 3, № 2.
53. Dhana, LP. Recent advances based on solid lipid nanoparticle systems for delivery of drugs / LP. Dhana, N. Rahul, M. Chakrapani, P. Venkatkrishnakiran // *Asian J Pharm Res.* – 2012.
54. Shrestha, H. Lipid-based drug delivery systems / H. Shrestha, R. Bala, S. Arora // *J Pharm.* – 2014. – P. 1-10.
55. Dua, JS. Liposome: methods of preparation and applications / JS. Dua, AC. Rana, AK. Bhandari // *Int J Pharma Sci Res.* – 2012.
56. Lason, E. Solid lipid nanoparticle—characteristics, application and obtaining / E. Lason, J. Ogonowski // *Chemik.* – 2011. – Vol. 65. – P. 960-967.
57. Anuchapreeda, S. Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy / S. Anuchapreeda, Y. Fukumori, S. Okonogi, H. Ichikawa // *J Nanotechnol.* – 2012. – P. 1-11.
58. Zheng, Z. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases / Z. Zheng, PC. Tsai, T. Ramezanli et al // *Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 205-218.

59. Almeida, H. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery / H. Almeida, MH. Amaral, P. Lobão // *J Appl Pharm Sci.* – 2012. – Vol. 2. – P. 1-10.
60. Teo, SY. Polymeric materials as platforms for topical drug delivery: a review / SY. Teo, SY. Lee, MJ. Rathbone, SN. Gan // *Int J Pharm Pharm Sci.* –
61. Toguchi, H. Formulation study of leuporelin acetate to improve clinical performance / H. Toguchi // *Clinical Therapeutics.* – 1992. – Vol. 14.
62. Okada, H. Preparation of threemonth depot injectable microspheres of leuporelin acetate using biodegradable polymers / H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa, H. Toguchi // *Pharmaceutical Research.* – 1994. – Vol. 11, № 8. – P. 1143–1147
63. Guo, J. Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency / J. Guo, MM. Giusti, G. Kaletunç // *Food Research International.* – 2018. – Vol. 107. – P. 414-422
64. Rossi, S. A novel dressing for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride to chronic skin ulcers: Hyaluronic acid particles in alginate matrices / S. Rossi, M. Mori, B. Vigani et al // *Eur J Pharm Sci.* – 2018. – Vol. 15, № 118. – P. 87-95.
65. Singh, M. Biodegradable delivery system for a birth controls vaccine: immunogenicity studies in rats and monkeys / M. Singh, O. Singh, GP. Talwar // *Pharmaceutical Research.* – 1995. – Vol. 2, № 11. – P. 1796-1800.
66. O'Hagan, D. T. Controlled release microparticles for vaccine development / D. T. O'Hagan, H. Jeffery, M. J. J. Roberts, J. P. McGee, S. S. Davis // *Vaccine.* – 1991. – Vol. 9, № 10. – P. 768-771.
67. Cleland, JL. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres / JL. Cleland, A. Jones // *Pharmaceutical Research.* – 1996. – Vol. 13, № 10. – P. 1464-1475.



68. Crotts, G. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues / G. Crotts, TG. Park // *Journal of Microencapsulation*. – 1998. – Vol. 15, № 6. – P. 699-705.
69. Шершнева, А. М. Полимерные микрочастицы на основе полигидроксиполлактоидов: получение, характеристика, применение: дис. канд. б наук : 03. 01. 06 / Шершнева Анна Михайловна. – Красноярск, 2015. – 149 с.
70. Cavalier, M. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly((+/-)-lactide) microspheres / M. Cavalier, JP. Benoit, C. Thies // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1986. – Vol. 38, № 4. – P. 249-253.
71. Tsai, DC. Preparation and in vitro evaluation of polylactic acid mitomycin C microcapsules / DC. Tsai et al // *Journal of Microencapsulation*. – 1986. – Vol. 3, № 3.
72. Hines, DJ. Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights / DJ. Hines, DL. Kaplan // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. – 2013. – Vol. 30, № 3. – P. 257–276.
73. Lee, PW. Poly(lactic-co-glycolic acid) devices: Production and applications for sustained protein delivery / PW. Lee, JK. Pokorski // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. – 2018.
74. Li, M. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches / M. Li, O. Rouaud, D. Poncelet // *Int. J. Pharm.* – 2008.
75. Fernández-Carballido, A. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration / A. Fernández-Carballido, R. Herrero-Vanrell, IT. Molina-Martínez, P. Pastoriza // *Int J Pharm.* – 2004. –
76. Fude, C. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (dl-lactic acid) or poly (dl-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method / C. Fude, C. Dongmei, T. Anjin et al // *Journal Controlled Release*. – 2005. – Vol. 107. – P. 310–319.

77. Nga, S.-M. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound / S.-M. Nga, J.-Y. Choi, H.-S. Han // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2010. – Vol. 384. – P. 120–127.
78. Berkland, C. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions / C. Berkland, K.K. Kim, D.W. Pack // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – Vol. 73, № 1. – P. 59-74.
79. Palmieri, G.F. Spray-Drying as a Method for Microparticulate Controlled Release Systems Preparation: Advantages and Limits. I. Water-Soluble Drugs / G.F. Palmieri, G. Bonacucina, P. Di Martino, S. Martelli // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2010. – Vol. 27. – P. 195-204.
80. Bodmeier, R. Preparation of biodegradable poly(+/-)lactide microparticles using a spray-drying technique / R. Bodmeier, H. Chen // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1988. – Vol. 40, № 11. – P. 754-757.
81. Gander, B. Quality improvement of spray-dried, protein-loaded D, L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection / B. Gander // *Journal of Microencapsulation*. – 1995. – Vol. 12, № 1. – P. 83-97.
82. Padalkar, AN. Microparticles: an approach for betterment of drug delivery system / AN. Padalkar, SR. Shahi, MW. Thube // *Int J of Pharma Res and Dev*. – 2011.
83. Osman, Y. Microbial biopolymer production by *Microbacterium* WA81 in batch fermentation / Y. Osman, A. Abd Elrazak, W. Khater // *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. – 2016. – Vol. 3. – P. 250–262.
84. Brigham, CJ. Manipulation of *Ralstonia eutropha* carbon storage pathways to produce useful bio-based products / CJ. Brigham, N. Zhila, E. Shishatskaya, TG. Volova, AJ Sinskey // *Subcell Biochem*. – 2012. – Vol. 64. – P. 343-66.
85. Kozhevnikov, IV. Cloning and molecular organization of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene (phaC) of *Ralstonia eutropha* strain

- B5786 / IV Kozhevnikov, TG Volova, T. Hai, A. Steinbuchel // Prikl Biokhim Mikrobiol. – 2010. – Vol. 46, № 2. – P. 153-60.
86. Volova, TG. Effects of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) reserves on physiological-biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha* / TG. Volova, N. Zhila, GS. Kalacheva, CJ. Brigham, AJ Sinskey // Res Microbiol. – 2013. – Vol. 164, № 2. – P. 164.
87. Volova, TG. Synthesis of P(3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by *Cupriavidus eutrophus* B10646 / TG Volova, DA Syrvacheva, NO Zhila, AG Sukovatiy // Journal of Chemical Tech. and Biotech. – 2016. – Vol. 91, № 2. – P. 416-425
88. Жила, Н. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н. Жила, Т. Г. Волова, Г. С. Калачева // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. – 2014. – Т. 2, № 2. – С. 161-173.
89. Volova, TG. A Glucose-Utilizing Strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: Growth Kinetics, Characterization and Synthesis of Multicomponent PHAs / TG. Volova, E. Kiselev, O. Vinogradova, E. Nikolaeva // PLoS One. –
90. Volova, TG. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) by the autotrophic CO-oxidizing bacterium *Seliberia carboxydohydrogena* Z-1062 / TG. Volova, N. Zhila, E. Shishatskaya // Fermentation, Cell Culture and Bioengineering. –
91. Jain, S. Poly (3-hydroxyalkanoates): biodegradable plastics / S. Jain, AK. Singh, A. Tiwari // Res Rev J Chem. – 2014. – Vol. 3.
92. Wei, X.-X. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Poly(3-hydroxybutyrate) Production under Microaerobic Condition / Wei X.-X. , W.-T. Zheng // Biomed Res Int. – 2015.

93. Eke, G. In vitro and transdermal penetration of PHBV micro/nanoparticles / G. Eke, AM. Kuzmina, AV. Goreva, EI. Shishatskaya et al // J Mater Sci: Mater Med. – 2014. – Vol. 25. – P. 1471-1481.
94. Chang, H. M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering / H. M. Chang, Z. H. Wang, H. N. Luo // Braz J Med Biol Res. – 2014. – Vol. 47, № 7. – P. 533–539.
95. Kim, HY. Paclitaxel-incorporated nanoparticles using block copolymers composed of poly(ethylene glycol)/poly(3-hydroxyoctanoate) / HY Kim, JH Ryu, CW Chu // Nanoscale Res Lett. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 525.
96. Valappil SP. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses / SP. Valappil, SK. Misra, AR. Boccaccini, I. Roy // Expert Rev Med Devices. – 2006. – Vol. 3, № 6 – P. 853-868.
97. Chen, GQ. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials /GQ. Chen, Q. Wu // Biomaterials. – 2005. - Vol. 26(33).
98. Chaudhari AA. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review / AA. Chaudhari, K Vig, DR Baganizi // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol. 17, № 12.
99. Arza, CR. Network formation of graphene oxide in poly(3-hydroxybutyrate) nanocomposites / CR. Arza, P. Jannasch, F. Maurer // European Polymer Journal. – 2014. – Vol. 59. – P. 262–269.
100. Saadata, A. Characterization of Biodegradable P3HB/HA Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering / A. Saadata, S. Karbasib, A. A. Behnam Ghaderc, M. Khodaeia // Procedia Materials Science. – 2015. – Vol. 11. – P. 217–223.
101. Liu, Q. Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Structure, Property, and Fiber / Q. Liu, H. Zhang, B. Deng, X. Zhao // International Journal of Polymer Science. – 2014.
102. Montaña-Leyva, B. Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and wheat straw fibers biocomposites produced by co-grinding: Processing and

- mechanical behavior / B. Montaña-Leyva, N. Gontard, H. Angellier-Coussy // *J Compos Mater.* – 2016.
103. Xiang, HX. Synthesis, structure and thermal properties of poly(A-block-B-block-A) copolymer based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and amorphous polystyrene / HX. Xiang, SC. Wang, RL. Wang et al // *Materials Research Innovations.* – 2014. – Vol. 18.
104. Basnett, P. Production of a novel medium chain length poly(3-hydroxyalkanoate) using unprocessed biodiesel waste and its evaluation as a tissue engineering scaffold / P. Basnett, B. Lukasiewicz, E. Marcello et al // *Microb Biotechnol.* – 2017. – Vol. 10, № 6. – P. 1384–1399.
105. Pouton, CW. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery / CW. Pouton, S. Akhtar // *Adv Drug Deliver Rev.* – 1998. –
106. Williams, S. Therapeutic uses of polymers and oligomers comprising gamma-hydroxybutyrate / S. Williams // *US Patent Appl.* - 2000.
107. Shishatskaya, EI. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures / EI Shishatskaya, TG Volova, AP Puzyr et al // *J Mater Sci-Mater.* – M. – 2004. - Vol. 15. – P. 28.
108. Муруева, А. В. Исследование полимерных микроносителей, нагруженных противовоспалительными препаратами, для терапии модельных дефектов кожных покровов / А. В. Муруева, А. М. Шершнева, Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2014. – Т. 5. – С. 614-619.
109. Bonartsev, AP. New Poly(3-hydroxybutyrate) Microparticles with Paclitaxel Sustained Release for Intraperitoneal Administration / AP. Bonartsev, AL. Zernov, SG. Yakovlev et al // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2017. – Vol. 17, № 3. – P. 434-441.
110. Li, W. Dual Inhibition of Cdc7 and Cdk9 by PHA-767491 Suppresses Hepatocarcinoma Synergistically with 5-Fluorouracil / W. Li, XL. Zhao, SQ

111. Шишацкая, Е. И. Исследование лекарственной эффективности доксорубина, депонированного в микрочастицы из резорбируемого Биопластотана, на лабораторных животных с солидной формой карциномы Эрлиха / Е. И. Шишацкая, А. В. Горева, А. М. Кузьмина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2012. – Т. 154, №12. – С. 741-745
112. Dunne, M. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles / M. Dunne, OI. Corrigan, Z. Ramtoola // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21. – P. 1659-1668.
113. Panyam, J. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles / J. Panyam, MM. Dali, SK. Sahoo et al // *J Control Release*. – 2003. – Vol. 92. – P. 173-187.
114. Grislain, L. Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier / L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts et al // *Int. J. Pharm.* – 1993. – Vol. 15. – P. 335-345.
115. Olivier, JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles / JC. Olivier // *NeuroRx*. – 2005. – Vol. 2. – P. 108-119.
116. Peracchia, M. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics / M. Peracchia, R. Gref, Y. Minamitake et al // *J Control Release*. – 1997. - Vol 46. – P. 223–231
117. Ghaderi, R. Effect of preparative parameters on the characteristics of poly(lactide-co-glycolide) microspheres made by the double emulsion method / R. Ghaderi, C. Stureson, J. Carlfors // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1996. – Vol. 141, №1. – P. 205-216.
118. Schaefer, H. Skin barrier: principles of percutaneous absorption / H. Schaefer, TE Redelmeier // *Karger Publishers*. – 1996. – Vol. 19. – P. 1-6

119. Boateng, JS. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review / JS. Boateng, KH. Matthews, HNE Stevens, GM. Eccleston // J Pharm Sci. – 2008. – Vol. 97, № 8. – P. 2892–2923
120. Kamoun, EA. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings / EA. Kamoun, ES. Kenawy, X. Chen // J Adv Res. – 2017. – Vol. 8, № 3. – P. 217-233.
121. Andreu, V. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds / V. Andreu, G. Mendoza, M. Arruebo // Materials (Basel). –
122. Chen, M-M. Sequential delivery of chlorhexidine acetate and bFGF from PLGA-glycol chitosan core-shell microspheres / M-M. Chen, H. Cao, Y-Y. Liu // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2016.
123. McDonnell, G. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance / G. McDonnell, A. D. Russell // Clin Microbiol Rev. – 1999. –
124. Антисептики, раневые покрытия и дезинфицирующие средства [Электронный ресурс] : Smed. ru. – Режим доступа: <https://www.smed.ru/guides/43314>
125. Brilliant Green [Электронный ресурс] : Open Chemistry Database // National Center for Biotechnology Information. – Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12449#section=Top>
126. Грехнева, Е. В. Свойства фурацилина, инкапсулированного в водоростворимые полимеры / Е. В. Грехнева, Т. Н. Кудрявцева, Л. Г. Климова // Auditorium. – 2017.
127. Ольхов, А. А. Матрицы контролируемого высвобождения лекарственных веществ на основе композиций полиамид — полигидроксibuтират / А. А. Ольхов, Ю. Н. Панкова, Р. Ю. Косенко // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 1


128. Зайцев, С. Ю. Полимерные пленки на основе сополимеров п-винилпирролидона как перспективные медицинские препараты / С. Ю. Зайцев, Т. Г. Тюрина, В. В. Зайцева // ИД Научная Библиотека. – 2015.
129. Панкова Ю. Н. Новые композиционные полимерные материалы на основе поли(3-гидроксibuтирата) для контролируемого высвобождения лекарственных веществ : дис. канд. хим. н. : 05. 17. 06 / Панкова Юлия Николаевна. – Москва, 2007. – 151 с.
130. Камаева, С. С. Разработка вагинальных плёнок с мирамистином для лечения воспалительных заболеваний гениталий / С. С. Камаева, Л. А. Поцелуева // В мире научных открытий. – 2010. - Т. 5, № 2. – С. 83-85.
131. Чернецкая, Ю. Г. Противомикробная активность новых лекарственных средств - гентамицин, мирамистин на основе гидрогелевых полимерных матриц / Ю. Г. Чернецкая, Н. А. Дедюшко, Т. В. Трухачева [и др. ] // Вестник фармации. – 2009. – Т. 3, № 45. – С. 63-75.
132. ГелеПран с мирамистином - гелевая антимикробная повязка, 7,5x10 см [Электронный ресурс] : Интернет-магазин ПроЗабота. ру. – Режим доступа: <https://prozabota.ru/lechebnye-povyazki-na-nekleyushcheysya-osnove/gelepran-s-miramistinom-gelevaya-antimikrobnaya-povyazka-7-5-x-10-sm.html>.
133. Гриб, И. В. Получение хитозановых микрочастиц с мирамистином методом распылительного высушивания и изучение их физико-химических свойств / И. В. Гриб, В. И. Куликовская, И. Л. Юркова // ЭБ БГУ:Естественные и точные науки:химия. – 2014.
134. Куликовская, В. И. Получение и свойства микрочастиц пектината кальция, содержащих мирамистин / В. И. Куликовская, Д. И. Егоров, В. Е. Агабеков // Доклады национальной академии наук Белоруссии. – 2015. – Том 59, № 6



135. МУК 4. 2. 1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
136. Лабинская, А. С. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 1. Общая и санитарная микробиология / А. С. Лабинская, Е. Г. Волина. – М.: Бином, 2008. – 1080 с.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой  
 Е. И. Шишацкая

« 18 » июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Функциональные характеристики микросферических носителей биологически  
активных веществ для реконструктивных технологий  
мягких тканей

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель  д.б.н., профессор Е. И. Шишацкая

Выпускник  А. В. Владимирова

Рецензент  д.м.н., профессор Ю. Ю. Винник

Красноярск, 2018