

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

программы

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель магистерской

\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_  
подпись      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Сравнительная оценка различных способов получения микрочастиц из низко- и высокомолекулярных фракций полигидроксиалканоев

06.04.01 - Биология  
06.04.01.05 - Реконструктивная биоинженерия

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

Выпускник \_\_\_\_\_ А.И. Калущая

Рецензент \_\_\_\_\_ гл. науч. сотр., д.б.н. В.С. Бондарь

Красноярск 2018

## Аннотация

В настоящее время существует необходимость поиска оптимальных нано- и микроносителей для современных фармацевтических систем направленного или пролонгированного действия. Важно, чтобы такие системы были нетоксичны для организма и биоразрушаемы. Полигидроксиалканоаты – это полиэфиры алкановых кислот микробиологического происхождения, благодаря своим хорошим физико-химическим свойствам, ПГА являются хорошими кандидатами в качестве микро- и наночастиц – носителей активных веществ. В работе были сконструированы микро- и наночастицы из ПГА двумя методами. Подход, при котором взяты несколько способов получения микрочастиц, с параллельным использованием разных модификаций структуры полимера, в том числе уменьшения его исходного молекулярного веса, для применимости в фармацевтике, расширяет спектр получаемых продуктов.

Для уменьшения молекулярного веса П(ЗГБ) проводили реакции деполимеризации при использовании боргидрида натрия, гидроксида натрия, а также термическую обработку. Для получения микрочастиц из «облегченных» образцов П(ЗГБ) были использованы два метода: одноэтапного эмульгирования и метод распылительного высушивания.

Установлено, что с применением физических и химических агентов можно значительно снижать молекулярную массу ПГА, что в результате влияет на диаметр частиц. Выбор метода получения микрочастиц, в свою очередь, оказывает существенное влияние на их свойства, а именно - на размерные характеристики, значение электрокинетического потенциала и выход.

В итоге сконструирована серия нано – и микрочастиц хорошего качества эмульсионным методом, размерами от 250 нм до 2700 нм, и методом распылительного высушивания, размерами от 40 нм до 1100 нм. Применение метода распылительного высушивания позволило получить фракцию наночастиц диаметром от 40 до 120 нм.

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме "Сравнительная оценка различных способов получения микрочастиц из низко- и высокомолекулярных фракций полигидроксиалканоатов" содержит 68 страниц текстового документа, 8 иллюстраций, 8 таблиц, 80 использованных источников.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ (ПГА), ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТ (П(ЗГБ)), ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ, МИКРОЧАСТИЦЫ, НАНОЧАСТИЦЫ, БИОСОВМЕСТИМОСТЬ.

**Цель диссертационной работы:** Провести сравнительную оценку различных способов получения микрочастиц из низко- и высокомолекулярных фракций ПЗГБ.

**Задачи исследования:**

1. Отработать методы снижения молекулярной массы ПЗГБ микробиологического происхождения (обработка борогидридом натрия, гидроксидом натрия и термическая обработка)
2. Получить микрочастицы методом одноэтапного эмульгирования из П(ЗГБ) с различной молекулярной массой
3. Получить микрочастицы методом распылительного высушивания из низкомолекулярного полимера
4. Охарактеризовать полученные микрочастицы по среднему диаметру, электрокинетическому потенциалу, морфологии
5. Оценить влияние различных методов получения микрочастиц на их характеристики

**Актуальность диссертационной работы** в том, что на современном методическом уровне показано влияние степени деполимеризации микробных ПГА на размерные характеристики микрочастиц. Кроме этого, выбор метода производства частиц оказывает влияние на их характеристики (электрокинетический потенциал, размерное распределение и выход микрочастиц). Исходя из этого, существует возможность получать широкий спектр продуктов для применения в биомедицине и фармацевтике.

## ABSTRACT

The master's thesis on the topic "Comparative evaluation of different methods for obtaining microparticles based on low and high molecular fractions of polyhydroxyalkanoates" contains 68 pages of a text document, 8 illustrations, 8 tables, 80 sources used.

POLYHYDROXYALCANOATES (PHA), POLY-3-HYDROXYBUTYRATE (P (3HB)), DEPOLIMERIZATION, MICROPARTICLES, NANOPARTICLES, BIOCOMPATIBILITY.

The purpose of the dissertation work: To carry out a comparative evaluation of various methods for obtaining microparticles from low and highmolecular fractions of P(3HB).

Objectives of the study:

1. To work out methods to reduce the molecular weight of P(3HB) of microbiological origin (treatment with sodium borohydride, sodium hydroxide and heat treatment)
2. Obtain microparticles by the method of one-stage emulsification from P (3HB) with different molecular weight
3. Obtain microparticles by spray drying from a low molecular weight polymer
4. Characterize the resulting microparticles by mean diameter, electrokinetic potential, morphology
5. To evaluate the influence of different methods of obtaining microparticles on their characteristics

The relevance of the thesis work is that at the modern methodical level shows the effect of the degree of depolymerization of microbial PHAs on the size characteristics of microparticles. In addition, the choice of the production method affects their characteristics (electrokinetic potential, size distribution and yield of microparticles). On this basis, it is possible to obtain a wide range of products for use in biomedicine and pharmaceuticals.

ВВЕДЕНИЕ .....	6
1 Обзор литературы .....	8
1.1 Биоразрушаемые полимеры для медицинских применений.....	8
1.2 Требования, предъявляемые к биоматериалам для фармакологии.....	11
1.3 Биосовместимость и биodeградация полигидроксиалканоатов.....	13
1.4 Полигидроксиалканоаты – природные полиэферы, их свойства .....	16
1.5 Применение полигидроксиалканоатов в фармакологии.....	24
1.6 Методы получения микро - и наночастиц.....	26
1.7 Применение микро- и наночастиц из ПГА .....	33
2 Материалы и методы .....	36
2.1 Объекты исследования.....	36
2.1.1 Вспомогательные вещества .....	36
2.2 Методы исследования .....	37
2.2.1 Методы снижения молекулярной массы поли-3-гидроксипропиридата .....	37
2.2.2 Получение микрочастиц методом распылительного высушивания .....	39
2.2.3 Анализ свойств микрочастиц .....	40
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	41
3.1 Снижение молекулярной массы П(ЗГБ) методом термической деградации	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2 Снижение молекулярной массы ПГА борогидридом натрия	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3 Снижение молекулярной массы ПГА гидроксидом натрия...	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Влияние молекулярной массы на характеристики микрочастиц	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.5 Отличительные особенности свойств наночастиц, полученных разными методами .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	43

## ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень науки располагает к широкому внедрению высокомолекулярных соединений, включая полиэферы, синтезируемые живыми системами, в медицину и другие отрасли. Структурное разнообразие полимеров определяет широкие возможности для открытия новых перспектив при разработке новых медицинских технологий, в том числе в фармакологии и тканевой инженерии. Анализ литературы показывает, что наиболее перспективными полимерами в последнее десятилетие, наряду с полилактидами и полигликолидами, считаются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэферы алкановых кислот микробиологического происхождения. Полигидроксиалканоаты (ПГА) обладают хорошими биологическими свойствами, такими, как биосовместимость и биоразлагаемость, а также физико-химическими свойствами, подходящими для различных применений в биомедицине, в том числе для конструирования микро- и наноносителей лекарственных препаратов [1, 2].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют интерес в качестве материалов для биомедицинских применений, так как являются не токсичными и биологически совместимыми. Интерес к использованию ПГА растет в различных областях, как в тканевой инженерии, для исправления переломов, для имплантантов, так и в фармакологии – для контролируемых систем доставки лекарственных средств микро- и наноносителями, преимуществом таких систем является возможность длительного поддержания необходимого уровня лекарственного вещества в крови и тканях. ПГА могут быть химически модифицированы, благодаря своим свойствам, существует возможность управлять характеристиками носителей и использовать их для адресной доставки [3, 4].

Для разных целей требуется полимер с определенными технологическими характеристиками, которые, в первую очередь, определяются качественным составом мономеров и молекулярной массой полимера, а умение влиять на её характеристики дает возможность модифицировать продукт с целью получения

молекул - полимерных цепей различной длины. Это позволяет конструировать нано- и микрочастицы различного диаметра.

**Актуальность:** существует необходимость в разнообразных материалах и субстанциях для биомедицины, обладающих заданными свойствами, в том числе для фармацевтических препаратов нового поколения. Полигидроксиалканоаты обладают оптимальными физико-химическими свойствами, подходящими для применения в биомедицине, в том числе для конструирования микро - и наночастиц – носителей активных веществ. При этом подтверждено, что ПГА обладают такими свойствами, как биосовместимость и биоразрушаемость. Возможность модифицировать структуру и снижать молекулярную массу ПГА природного происхождения открывает более широкие возможности для получения микроносителей фармацевтических препаратов. На сегодня существует возможность использовать различные способы получения микрочастиц, уменьшать их средний диаметр и, в перспективе, управлять скоростью биодegradации.

**Цель работы:** Провести сравнительную оценку различных способов получения микрочастиц из низко- и высокомолекулярных фракций полигидроксиалканоатов микробиологического происхождения.

Исходя из заданной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Отработать методы снижения молекулярной массы ПЗГБ микробиологического происхождения (обработка борогидридом натрия, гидроксидом натрия и термическая обработка)
2. Получить микрочастицы методом одноэтапного эмульгирования из П(ЗГБ) с различной молекулярной массой
3. Получить микрочастицы методом распылительного высушивания из низкомолекулярного полимера
4. Охарактеризовать полученные микрочастицы по среднему диаметру, электрокинетическому потенциалу, морфологии
5. Оценить влияние различных методов получения микрочастиц на их характеристики

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Биоразрушаемые полимеры для медицинских применений

В настоящее время известно большое количество материалов, которые применимы в сфере биомедицины. К таким материалам, относят биоразрушаемые синтетические и природные полимеры. Наиболее известными видами синтетических полимеров являются полиэтилен, полиметилметакрилат, полиамиды, полиуретаны (ПУ), поливиниловый спирт (ПВС), силиконы, полигликолиды (ПГК), полилактиды (ПЛК). Но их биосовместимость неидеальна [6,7].

Сополимеры полилактида с полигликолидом или по-другому их называют сополимеры молочной и гликолевой кислот (ПЛГК) (PLGA)– это наиболее широко применяемые синтетические полимеры для создания систем пролонгированного действия. ПЛГК имеют лучшие характеристики по теплостойкости, сроку биоразрушения и механической прочности. Данные сополимеры обладают низкой токсичностью[8].

Свойства и области применения ПЛГК могут быть очень различными за счет изменения молекулярной массы полимера и за счет изменения соотношения мономерных звеньев в полимере [9]. Высокомолекулярные сополимеры молочной и гликолевой кислот представляют собой бесцветные стеклоподобные полимеры, растворимые в большом количестве органических растворителей, в том числе хлорированных углеводородах, тетрагидрофуране, ацетоне и этилацетате. ПЛГК может находиться частично в кристаллическом либо аморфном состояниях [10]. Материалам из ПЛГК свойственно объемное разрушение. При объемном разрушении молекулы среды проникают в полимерную матрицу быстрее, чем происходит деструкция. Вследствие этого гидролиз полимера протекает и на его поверхности, и в объеме, а активное вещество высвобождается за счет одновременного протекания и диффузии, и растворения. Кроме того, полимерная матрица может разрушиться на части еще до полного выхода активного вещества, что является одной из причин

«взрывного эффекта» при высвобождении. Данный эффект негативно отражается на прочностных характеристиках изделий [11,12].

В организме сополимеры молочной и гликолевой кислот деградируют в основном путем неферментативного гидролиза. На биодegradацию влияет значение pH. Процесс биодegradации полимеров подавляется в кислотной и ускоряется в щелочной среде. Гидролитическая деградация изделий из этих полимеров контролируется диффузией воды, проникающей в поры изделия и релизом водорастворимых кислотных олигомерных побочных продуктов разрушения полимеров. Роль ферментов в биодеструкции ПЛГК до конца не ясна. Одни исследователи говорят, что деструкция ПЛГК происходит только за счет гидролиза, а другие – что ферменты все-таки способствуют биодеструкции ПЛГК, что проявляется в различии скоростей деструкции *invitro* и *invivo* [13].

Таким образом, синтетические биополимеры, имеющие хорошо воспроизводимые свойства и обладающие широким спектром механических свойств – от гидрогелей до жестких материалов, все – же имеют большой недостаток, а именно неидеальную биосовместимость. Это не позволяет отнести их к универсальным материалам[5]. Основная проблема данных полимеров заключается в том, что кислые продукты их гидролиза могут оказывать влияние на стабильность и биологическую активность инкапсулируемого препарата, а также вызывать деградацию белков. А именно карбоксильные группы концевых цепей при деградации полимера взаимодействуют с положительно заряженными белками, приводя к изменению их структуры. Согласно US FDA (Food and Drug Administration), чистая L-молочная кислота официально признана безвредной пищевой добавкой, в то время как D-форма может оказывать вредное воздействие на метаболизм, вызывать ацидоз и декальцификацию. Резкое увеличение (в 2—3 раза) уровня лактата в сыворотке крови наблюдается при тяжёлых расстройствах кровообращения, таких как геморрагический шок, острая левожелудочковая недостаточность и др., когда одновременно страдает и поступление кислорода в ткани, и печёночный кровоток[14].

Хорошей альтернативой синтетическим полимерам являются биоразрушаемые природные полимеры, к ним относятся полисахариды и их производные (альгинаты, целлюлоза, хитозан, декстран, гепарин, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат); белки (коллаген, эластин, фибрин, фибронектин, шелк); полигидроксиалканоаты (производные гидроксикислот, синтезируемые прокариотическими организмами в качестве запасного энергетического вещества) [13].

Достаточно широкое применение в медицине нашли природные полисахариды хитозан и альгинат. Хитозан чаще всего получают гидролизом хитина, который выделяют из панцирей ракообразных. Альгинат – природный линейный полисахарид, получаемый из морских водорослей или биотехнологической ферментацией. В медицинской практике эти полисахариды в виде пленок, губок и гидрогелей используют как раневые, ожоговые и заживляющие покрытия, в системах доставки клеток, лекарственных веществ и различных факторов роста [15].

Гиалуроновая кислота (ГК) – гликозаминогликан, является естественным компонентом межклеточного вещества мягких тканей позвоночных, это перспективный материал для восстановительной хирургии и тканевой инженерии. Гликозаминогликан используется в медицине при заболеваниях суставов, в качестве барьерных мембран, ожоговых покрытий и в косметологии [7].

Коллаген и фибрин также являются распространенными полимерными материалами в природе и широко применяются в медицине. Коллаген применяется в медицине в качестве эндопротезов мягких тканей, компонентов материалов для лечения поражений кожного покрова и др. Фибрин может быть использован в виде фибрин-полимерного сгустка для покрытия пораженных участков кожного покрова, в виде порошка в качестве гемостатического агента для обработки ран [7].

## 1.2 Требования, предъявляемые к биоматериалам для фармакологии

Основными требованиями к биоматериалам являются биосовместимость, либо инертность для организма, и биоразрушаемость.

Биосовместимость – это способность материала находиться внутри организма без воспалительных и аллергических реакций. В настоящее время не существует абсолютно биосовместимых материалов, кроме того, для разных клинических задач необходима разная степень биосовместимости. На биосовместимость материала оказывают влияние состав и форма материала. Матрицы для клеток могут быть в форме гелей, микро - и наночастиц, волокон, пленок, различных трехмерных конструкций [11].

На текущий день важную роль для развития фармакологии играет разработка биоразрушаемых материалов, то есть способных постепенно разлагаться в организме с образованием нетоксических продуктов, которые вовлекаются в метаболизм или легко выводятся из организма. Деградация материалов в организме осуществляется гидролитически или ферментативно, поверхностно или во всем объеме матрикса [12].

Микро - и наночастицы, изготовленные из синтетических или натуральных биополимеров, чаще всего нужны в качестве систем доставки препаратов и биологически активных веществ, но также могут быть использованы в качестве матриц для доставки клеток в требуемое место [12].

Важным параметром при выборе материала для носителя в фармацевтической системе являются свойства поверхности образца материала: гидрофильно-гидрофобный баланс поверхности, шероховатость, заряд [12]. Было установлено, что для адгезии и пролиферации клеток более благоприятна поверхность со средней гидрофобностью. Более гидрофильная поверхность лучше подходит для адгезии белков, таких как фибронектин или коллаген, связывающих клетки с субстратом. Показано, что носители, изготовленные из материалов с гидрофильной поверхностью, обладают лучшими биологическими свойствами. Для повышения гидрофильности поверхности

полимеров используются различные приемы – обработка плазмой кислорода, водорода, азота, обработка щелочью, липазой, белками, покрытие материала стерином, акриламидом и другими веществами в зависимости от требуемого результата [13]. Для этой же цели применяют присоединение полиэтиленгликоля (ПЭГ) к полиэфирам. Полимеры, не содержащие ПЭГ являются гидрофобными по своей природе. Включение низких процентов ПЭГ (5-30%) приводит к более гидрофильным, но все еще нерастворимым полимерам. После воздействия воды внутри полимера образуется гидрогелеподобная структура. Полимеры с низким процентом ПЭГ обычно не подходят для контроля высвобождения гидрофильных лекарств, но обеспечивают контролируемое высвобождение белков.

Шероховатость поверхности – следующий важный параметр, влияющий на гидрофильность поверхности, адсорбцию белков, прикрепляемость клеток и их дальнейший рост, а также на протекание воспалительной реакции. Для разных типов клеток подходят поверхности с различными коэффициентами шероховатости [15].

Заряд поверхности материалов влияет на адгезию клеток, взаимодействуя с зарядом клеточных мембран и, таким образом усиливая взаимодействие между клеткой и субстратом/материалом. При использовании материалов для применения в качестве лекарства, и, соответственно, для контакта с кровью необходимо, чтобы молекулы материала были отрицательно заряжены, как клетки крови, для предотвращения тромбообразования. Заряд поверхности материала также определяет интенсивность местной воспалительной реакции-тканей[13].

### **1.3 Биосовместимость и биodeградация полигидроксиалканоатов**

Химическая структура полигидроксиалканоатов обуславливает их хорошую биосовместимость и биоразрушаемость, что делает их идеально подходящими для потребностей современной медицины. В отличие от природных полимеров (хитозан, альгинат, декстран, коллаген и т.д.) и химически синтезированных полимеров, ПГА производятся биотехнологическими методами, которые позволяют достичь высокой степени чистоты, а также контролировать и указывать физико-химические свойства биополимеров в процессе их биосинтеза [4]. ПГА имеют набор уникальных свойств: высокая механическая прочность и термическая пластичность, что позволяет легко обрабатывать и получать широкий спектр продуктов, способность образовывать композиты с синтетическими полимерами, неорганическими материалами, а также с лекарственными средствами, полная биоразлагаемость до нетоксичных продуктов, биосовместимость (включая гемосовместимость) с тканями человека и животных, а также экологическая безопасность [4].

Ранее была доказана биологическая безопасность и лекарственная эффективность микрочастиц из ПГА в культурах клеток, а также в экспериментах на животных [16].

ПГА были во внимании многих компаний, как биоразлагаемые и биосовместимые альтернативы синтетическим полимерам в течение очень долгого времени. В 1976 году Imperial Chemical Industries (ICI Ltd., Великобритания) признала потенциальную применимость поли(3-гидроксибутирата), чтобы заменить некоторые полученные из нефти синтетические полимеры. Одним из вкладов ПГА в медицине был в сердечно-сосудистой области. Terpha Inc., базирующаяся в Кембридже, штат Массачусетс, была посвящена производству пластыря перикарда, кардиологических стентам, сосудистых трансплантатов, сердечных клапанов, имплантантов, таблеток, наложения швов, перевязочных материалов, присыпок, пролекарств и

микрочастиц носителей с использованием ПГА [17].

Очевидно, что основным требованием для изготовления системы пролонгированного действия с контролируемым высвобождением лекарственных средств является наличие подходящего материала, который должен быть абсолютно безвредным для организма и обладать необходимыми физико-механическими и биомедицинскими свойствами, в том числе биодegradацией.

Таким образом, учитывая вышесказанное, ПГА являются хорошим материалом для изготовления систем доставки лекарственных средств, так как обладают всеми требуемыми свойствами. Эти полимеры являются биологически совместимыми и инертными по отношению к тканям животного происхождения; в биологических средах они деградируют до конечных продуктов ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ). К примеру, гидролитическое разложение ПГБ *in vitro* переходит к мономеру D-3-гидроксипропановой кислоты, который является нормальной составляющей крови, как ацетоацетат и ацетон, представляет собой одно из трех кетонных тел, вызываемые эндогенно процессом кетогенеза. Поэтому считается, что ПГБ можно хорошо переносить *in vivo* [18]. Об этом свидетельствует ряд работ, в которых впервые исследована реакция тканей, длительность функционирования, а также локализация продуктов деградации ПГА при имплантации полимерных микрочастиц внутримышечно и при введении в кровоток. Моноциты участвуют

В ответ тела на полимерный имплантат. Они мигрируют на сайт имплантации, где они дифференцируются в макрофаги, которые играют важную роль в процессе резорбции фагоцитозом фрагментов имплантата и поэтому участвуют в биодegradации посторонних материалов. Опыты на крысах, которым были внутримышечно введены микрочастицы, полученные из П(ЗГБ) показали, что микроскопическая картина в месте введения изменялась в ходе эксперимента, и изменения касались реакции тканей на введение микрочастиц, их среднего диаметра и количества частиц, а также их целостности. Спустя 2 недели в тканях вместе введения микрочастиц наблюдали присутствие моноядерных макро-

фагальных клеток секреторно-фагоцитарного типа, а также наличие нескольких гигантских клеточных тел (ГКИТ). В эти сроки количество крупных (свыше 10-15 мкм) частиц стало значительно меньше и не превышало 14 % в поле зрения. В ходе дальнейшего наблюдения отмечено нарастание макрофагальной активности наряду с уменьшением фракции крупных частиц до 4-5 % от общего числа в поле зрения, что свидетельствует о протекании процесса разрушения полимерного матрикса частиц. Однако в целом в течение достаточно длительного периода наблюдения большинство неразрушенных микросфер присутствовало в тканях, что свидетельствует о достаточно длительном процессе биорезорбции микрочастиц *in vivo*, несмотря на их малые размеры, что говорит о возможности использования поли-3-гидроксибутирата для создания долговременной лекарственной формы, предназначенной для внутримышечного введения [44, 46].

В отличие от других материалов, широко используемых в контролируемой доставке лекарственных средств, таких как желатин, белки, полилактид и поли (этиленгликоль) - поли (D, L-лактида), ПГА доступны в химически чистой форме и имеют низкую скорость разложения в биологических средах.

Биоразлагаемые носители используются для того, чтобы подготовить болеутоляющие средства, антидепрессанты, противозачаточные средства, противораковые и противовоспалительные препараты [18].

## 1.4 Полигидроксиалканоаты – природные полиэфиры, их свойства

Полигидроксиалканоаты являются природными полиэфирами, полученными и накопленными различными микроорганизмами царства бактерий и архей, которые аккумулируют энергию в виде хранения углеродных соединений в условиях ограниченного питания (т.е. азот, кислород или фосфор), но в присутствии избытка источников углерода. Образуются в результате микробного биосинтеза специализированных штаммов-продуцентов: *Wautersia eutropha* B5786, *Ralstonia eutropha* H16, *Pseudomonas putida* KT2442, *Azotobacter chroococcum* 7B, *Rhodococcus ruber*, *Aeromonas caviae*, *Paracoccus denitrificans* и др [20].

В последние годы, полиуретаны и производные из полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые считались "золотым стандартом" для полимеров, применяемых в медицине, постоянно заменяются различными полимерами и сополимерами из натуральных источников, в силу их превосходной биосовместимости и биоразлагаемости. Полигидроксиалканоаты являются одним из новых материалов, которые получили большое внимание с момента их открытия в 1926 году М. Lemoigne [21]. С тех пор более 300 видов, в том числе и грамположительных и грамотрицательных бактерий, которые были описаны с метаболической способностью синтезировать ПГА [25].

Физические и термопластичные свойства полигидроксиалканоатов и их биоразлагаемость делают их лучшей альтернативой синтетическим пластмассам. ПГА с различным составом, могут быть получены путем ферментации микроорганизмами набора субстратов [22].

Высокая стоимость производства и трудность при обработке гомополимеров ПГА делают их менее благоприятными для крупномасштабного использования [23, 24].

Работы по изменению мономерного состава и их молекулярной массе ( $M_w$ ), привели к полимерам, которые более пригодны для дальнейшей переработки. Эти аспекты зависят от вида бактерий, субстрата, стратегии

питания и физиологических условий. Этими компонентами можно манипулировать, чтобы добиться получения полимера с заданными свойствами [26, 27].

В зависимости от величины алкильной группы ПГА подразделяются на коротко-, средне- и длинноцепочечные:

- гидроксиспиртосы с короткой длиной цепи, такие как короткоцепочечные ПГА (scPHA – “Short chain length“), с алкильной боковой цепью, которые продуцируются *Ralstonia eutropha* и многими другими бактериями. Содержат 3-5 атомов углерода, например ПЗГБ, П4ГБ.
- гидроксиспиртосы со средней длиной цепи, такие как mcPHA (“Medium chain length“) с алкильной боковой цепью, которые продуцируются *Pseudomonas oleovorans* и др. McPHAs содержат 6-14 атомов углерода, например, РЗННх, РЗНО, РЗНД, РЗНДД, РЗНТД и РЗННД.
- lсPHAs, полученные из жирных кислот с длинной цепью кислоты, которые содержат более 14 атомов углерода.

Поскольку эти различные типы ПГА имеют различные структурные и механические свойства, они должны классифицироваться в соответствии с их свойствами и модифицированы для легкого использования в медицинских целях. К числу наиболее распространенных и изученных относятся короткоцепочечные полимеры: гомополимер поли(3-гидроксипропаноата) (П(ЗГБ)) и образованные на его основе сополимеры с различным включением 3-гидроксивалерата (П(ЗГБ-со-ЗГВ)) или 4-гидроксипропаноата (П(ЗГБ-со-4ГБ)); и среднецепочечные: сополимеры с различным включением 3-гидроксиоктаноата (П(ЗГБ-со-ЗГО)) или 3-гидроксиоктаноата (П(ЗГБ-со-ЗГО)) [2].

Физические свойства ПГА находятся под влиянием их мономерного состава и химической структуры [15-17]. Некоторые scPHAs могут быть слишком жесткими и ломкими, и могут не обладать хорошими механическими свойствами, необходимыми для биомедицины. Напротив, mcPHAs могут быть эластомерными, но имеют очень низкую механическую прочность. Поэтому для

упаковочных материалов, тканевой инженерии и других применений, физические и механические свойства микробных полиэфиов должны быть разнообразными и улучшенными. В дополнение к этому, необходимо чтобы высокогидрофобные ПГА имели гидрофильный характер для биомедицинских применений, особенно для систем доставки лекарств [2].

Среди более чем 150 мономеров, о которых сообщалось до сих пор, только небольшое количество гомополимеров и сополимеров ПГА продуцируются микроорганизмами при нормальных физиологических условиях [28,29,30].

В большинстве случаев продуцируются короткоцепочечные ПГА, среди которых ПГБ, П(ЗГБ:ЗГВ), П(ЗГБ:4ГБ), П(ЗГБ:ЗГП) и П(ЗГБ:ЗГВ:4ГБ) [32].

ПГА полимеры, которые встречаются реже, включают другие гомополимеры 4ГБ, 3ГВ, 3Г5ПВ. Молекулярная масса ПГА охватывает широкий диапазон от  $0,5 \times 10^5$  до  $35 \times 10^5$  Да и индекс полидисперсности (ИПД) варьируется от 1,1 до 6,0 [26].

ИПД является индексом распределения молекул в пределах полимерного образца, который измеряется как отношение средневесового молекулярного веса ( $M_w$ ) к среднечисловому молекулярному весу полимера ( $M_n$ ). Таким образом, он определяет гетерогенность полимерной смеси по отношению к размеру молекул. Более широкий диапазон коэффициента полидисперсности затрудняет установление гомогенности сополимера, особенно тех, которые имеют значительно отличающиеся значения  $M_w$  и  $M_n$ . Это связано с неопределенными термическими и механическими свойствами. Термопластичность, степень кристаллизации, эластичность, механическая прочность ПГА в значительной степени зависят от его состава и молекулярной массы (м.м.) [31]. Таким образом, гомополимер-ПГБ, который имеет низкую м.м. ( $5-10 \times 10^5$  Да), является полукристаллическим и хрупким в природе [32]. Однако некоторые факторы регулируют эти аспекты и могут быть использованы для настройки в сторону более желательных.

По свойствам полигидроксибутират (ПГБ) похож на такие синтетические термопласты, как полиэтилен и полипропилен, но в отличие от них имеет преимущество - разлагается в биологических средах с образованием нетоксичных продуктов. Это свойство заслужило внимание исследователей к ПГБ и его структурным аналогам, как к перспективным биodeградируемым пластикам медицинского назначения. Температура плавления ПГБ, синтезированного разными микроорганизмами, варьирует; минимальное значение этой величины составляет 157 °С, максимальное — около 188 °С. [33].

Существует возможность получения поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) разной молекулярной массы ( $M_w$ ) путем изменения условий культивирования штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7В: рН среды, температура, уровень аэрации, внесение дополнительного источника углерода - ацетат натрия, а также при росте на неочищенных комплексных источниках углерода (меласса, винасса, крахмал). Полимер с высокой степенью полимеризации может быть получен при оптимальном для роста культуры нейтральном рН среды (1 485 кДа), при температуре культивирования 30-37°С (1600-1450 кДа соответственно), при низком уровне аэрации (2215 кДа). К снижению степени полимеризации ПГБ приводит отклонение рН среды в кислую (рН 6.0, 476 кДа) или щелочную область (рН 8.0, 354 кДа), а также понижение температуры культивирования до 20°С (897 кДа). Описан способ получения ПГБ заданной молекулярной массы в широком диапазоне молекулярных масс от 270 до 1515 кДа с высоким содержанием ПГБ в клетке путем внесения в среду ацетата натрия при изменении его градиента концентрации [34].

С развитием полимерной химии увеличился выбор материалов, пригодных для создания систем доставки лекарственных препаратов в составе нано- и микрочастиц. Структурные характеристики полимеров являются определяющими составляющими для регулирования поведения СД и высвобождения ЛП из них. К примеру, одним из факторов, оказывающих влияние на кинетику высвобождения препарата, являются физико-химические свойства используемого полимера [35].

Важно учитывать молекулярную массу полимера, выбранного для исследования. Увеличение данного параметра приводит к изменению механических свойств материала [36]. Из-за увеличения числа переплетений между цепями полимеры с тяжелыми цепями часто оказываются жестче, чем полимеры с легкими. К тому же переплетения могут препятствовать всасыванию воды в объем, в результате чего растворение препарата замедляется, и высвобождение происходит гораздо медленнее [35,37].

Не менее важным фактом является то, что от молекулярной массы полимеров зависит динамика разложения [36]. Полимерные цепи расщепляются до тех пор, пока молекулярная масса не достигнет критического значения, при котором может диффундировать препарат. Это приводит к значительному разрушению и образованию пор в микрочастицах, через которые всасывается вода, что способствует высвобождению инкапсулированного препарата. Таким образом, при высокой начальной молекулярной массе полимера процесс разрушения будет протекать медленнее, ведь для достижения критического значения молекулярной массы, при которой начинается выход препарата, требуется больше времени. И, напротив, при низких начальных величинах молекулярной массы (около 4000 г/моль) высвобождение препарата происходит незамедлительно [37].

ПГА имеют набор свойств: высокая механическая прочность, термическая пластичность, что позволяет легко обрабатывать и получать широкий спектр продуктов, способность образовывать композиты с синтетическими полимерами, неорганическими материалами, а также с лекарственными средствами, полная биоразлагаемость до нетоксичных продуктов, биосовместимость (включая гемосовместимость) с тканями человека и животных, а также экологическая безопасность [4]. Ранее доказали возможность получения высокоочищенных партий полигидроксиалканоев, пригодных для контакта с кровью [49].

Если биоматериал из ПГА пропитан соединением, в процессе разложения материала это соединение высвобождается, действуя как автоматический

дозированный агент. Кинетику дозирования соединения из матрицы ПГА можно настроить путем изменения свойств полимера, а также использования различных типов ПГА с различными мономерными боковыми цепями.

На свойства полимера оказывают влияние различные факторы: степень кристалличности, мономерный состав, молекулярная масса и другие.

Чрезвычайно высокая молекулярная масса ПГА микробиологического происхождения затрудняет введение данного класса полимеров в современную фармакологию, усложняет процесс переработки в нано- и микросферические носители активных агентов. К тому же природные биополимеры имеют высокую стоимость получения и достаточно трудоемкий процесс обработки.

На величину молекулярной массы можно оказывать влияние с помощью различных физических и химических агентов. Ранее было показано снижение молекулярного веса сополимера П(3-ГБ-3-ГВ) (поли(3-гидроксипропанат-со-3-гидроксивалерат)) в 14 раз в результате обработки боргидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) в течение 4 часов. Боргидрид натрия - неорганическое соединение с молярной массой 37,833 г/моль. Хорошо растворим в полярных органических растворителях и воде. Боргидрид натрия используется в органическом синтезе как восстановительный агент. С его помощью проводят восстановление карбонильных соединений до спиртов, иминов до вторичных аминов, нитросоединений и т. п. [38].

Изучена термическая деградация таких биоразрушаемых полиэфиров, как поли(3-гидроксипропаната), поли(3-гидроксивалерата) и их сополимера. Основным продуктом являлся четко определенный олигомер, особенно макромолекула 500-10 000 г / моль, которая содержит одну ненасыщенную концевую группу, преимущественно трансалкенильную концевую группу, а также в виде карбоксильной концевой группы. Изучали процесс влияния состава сополимера и времени реакции при 190 ° С. В течение первых нескольких часов реакции термическая деградация ПГБ и ПГВ следовала кинетической модели случайного разрыва, но в конечном итоге автоматически ускорялась от пиролиза, вероятно, из-за влияния концевых кротоновых групп образованных олигомеров [45].

В настоящее время активно разрабатывают методы очистки биополимеров. Например, в работе авторов Daniel M. Horowitz и Elaine M. Brennan упоминается о водных способах очистки микробиологического 3-гидроксибутиратного полимера, в котором клетки подвергают термообработке при температурах выше 80 ° C, а затем расщепляют ферментами, поверхностно-активными веществами и перекисью водорода. Авторы раскрывают способ очистки микробных полиэфигов с использованием комбинации перекиси водорода с хелатообразующим агентом. Недостатком является то, что пероксидная обработка должна проводиться при высоких температурах, например, 80-180° C, что требует интенсивного нагрева и охлаждения продукта, а в некоторых случаях требуется оборудование высокого давления. Кроме того, пероксид водорода часто оказывается неустойчивым в присутствии высоких уровней клеточной биомассы, это приводит к тому, что перекись водорода непродуктивно разлагается на воду и кислород, образуя объемную пену. Помимо этого, авторы считают недостатком то, что длительные высокие температуры и перекись водорода также могут приводить к уменьшению молекулярной массы полимеров и, в некоторых случаях, могут способствовать кристаллизации полимеров [46].

В другой работе автором Williams совместно с другими авторами показано, что обработка ПГА пероксидом водорода с концентрацией 50 % приводит к снижению уровня пирогена (эндотоксина). Пирогены представляют собой гетерогенную группу вызывающих лихорадку веществ, полученных из грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов. Они стимулируют иммунный ответ, продуцируя эндогенные пирогены, простагландины и другие провоспалительные цитокины такие, как IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  [47].

Очевидно, что биоразлагаемые полимеры, используемые для медицинских целей должны быть биосовместимыми и деградировать до нетоксичных метаболитов. Медицинские приспособления также не должны быть пирогенными, то есть продукты не должны вызывать лихорадочные реакции у пациен-

тов. Наличие бактериального эндотоксина (неотъемлемого компонента наружной мембраны грамотрицательных бактерий) в продукте, безусловно, является самой большой проблемой производителей при достижении минимального уровня пирогена. Обработка ПГА 50 % пероксидом водорода позволяет снизить уровень эндотоксина до значения, при котором не возникает острой ответной реакции в организме животных при имплантации материала. Что в будущем может быть полезно в том случае, если выделенный после ферментации полимер не будет подвергаться обработке агрессивными органическими растворителями [47].

Кроме того, для химической модификации полигидроксиалканоатов проводят щелочной гидролиз гидроксидом калия, натрия и др. С продолжительностью гидролиза резко возрастает концентрация поверхностных карбоксильных групп. Полимер приобретает гидрофильный характер. Как показывает ряд исследований, помимо электрических свойств и химического состава, на адгезию клетки-хозяина к биоматериалу влияет степень гидрофильности полимера. Показано, что по мере гидролиза полимера возрастает адсорбция белков, а также адгезия и пролиферация моноцитов-макрофагов.

Общепризнано, что белки плазмы мгновенно адсорбируются на биоматериале, когда он вступает в контакт с биологическими жидкостями и что биосовместимость полимерного материала в значительной степени определяется специфическими взаимодействиями между адсорбированными белками и рецепторами, расположенными на поверхности клеток. Многие авторы показали, что адсорбированные белки такие, как фибронектин, альбумин, ламинин, коллаген и витронектин участвуют в клеточной адгезии [48].

## 1.5 Применение полигидроксиалканоатов в фармакологии

Данный класс биополимеров соответствует всем ранее изложенным требованиям, предъявляемым к биоматериалам в фармакологии. Исследования, проводимые в Институте биофизики Сибирского отделения РАН, показали высокую биосовместимость высокоочищенных образцов ПГА на клеточном, тканевом уровне, включая их пригодность для контакта с кровью и для депонирования лекарственных препаратов в микроносителях [49,50].

Как упоминалось ранее, молекулы ПГА природного происхождения обладают избыточным молекулярным весом для того, чтобы использовать их в технологиях, применяемых при получении микро- и наноносителей. Материалы из ПГА применяются в самых различных сферах. В медицине и хирургии (изготовление рассасывающихся шовных нитей, хирургических пластин, пленок для покрытия ран, эндопротезов и др.). В пищевой промышленности (предупреждение окислительной порчи напитков и продуктов, упаковочные материалы), в сельском хозяйстве (покрытие семян, удобрений и пестицидов), радиоэлектронике, коммунальном хозяйстве (биodeградируемые упаковочные материалы, тара). Кроме того, применяются в фармакологии для депонирования и доставки биологически активных соединений и лекарственных средств [19].

Из полигидроксиалканоатов могут быть получены пленки, пористые матрицы. А также микросферы и наночастицы, как носители лекарственных средств (ЛС). Лекарственные вещества могут быть инкапсулированы в микроносители из гомополимера или сополимера из ПГА. Системы доставки ЛС в виде микро- и наночастиц широко используются для доставки ряда препаратов, таких как анестетиков, антибиотиков, противовоспалительных средств, противораковых агентов, гормонов, стероидов и вакцин [52, 53].

Существует ряд интересных особенностей микрочастиц, которые делают их особенно подходящими для микрокапсулирования:

- контролируемый выпуск инкапсулированных материалов
- защита инкапсулированных материалов от разрушающих реакций

(например, окисление, дегидратация, УФ, тепло, кислоты и основания) во внешней среде, что также может привести к увеличению срока годности

- маскирование органолептических свойств, таких как цвет, вкус и запах инкапсулированных материалов
- легкое обработка полученных порошкообразных материалов
- безопасное обращение с токсичными инкапсулированными материалами [54].

Полигидроксibuтират и его сополимер были использованы для приготовления микросфер, содержащих прогестерон как модельный препарат. Включение прогестерона в микросферы было очень эффективным, и более 80% было включено. Выделение препарата *in vitro* из микросфер, полученных из сополимера, содержащего 9% гидроксивалерат было самым медленным, эти микросферы были менее пористыми, чем микросферы полученные из других полимеров. В начале 1990-х гг. ПГА стали кандидатами для носителей ЛС из-за их биоразлагаемости, биосовместимости, и их деградации посредством поверхностного разрушения. Потенциальное использование сополимера П(ЗГБ) с гидроксивалератом в доставке лекарственных средств была оценена в ряде исследований. ПГА могут быть потенциальным кандидатом в лечении высокорезистентных инфекций [53, 55]. Исследование с использованием микросфер из ПГБ показало, что высвобождение противоопухолевого препарата рубомицина ингибирует пролиферативную активность карциномы Эрлиха у мышей [49]. Все эти данные свидетельствуют о высокой перспективности внедрения ПГА в фармакологию в качестве носителей лекарственных веществ.

## 1.6 Методы получения микро- и наночастиц

В настоящее время микро- и наночастицы могут быть сконструированы из множества природных или синтетических материалов различными способами приготовления. В качестве синтетических материалов используют полиуретаны, поливинилхлорид, силаны, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт и метакрилаты. Из природных материалов используют целлюлозу, крахмал, хитозан, лигнин, зеин, альбумин. Наиболее популярными материалами для получения микро- и наночастиц являются биodeградируемые сложные полиэфиры, такие как полилактид, поли (лактид-со-гликолид), поликапролактон и полигидроксиалканоаты [57, 58].

Как исходные материалы, так и методы получения позволяют получать большое разнообразие микрочастиц с точки зрения размера, распределения по размерам, состава, поверхностных свойств, морфологии и скорости деградации. Поли (лактид-со-гликолид) (ПЛГК) с соотношением 50:50 деградируют быстрее, чем ПЛГК-полимеры с более высоким содержанием молочной кислоты или со стопроцентным её содержанием. Полимеры полигликолевой кислоты или ПЛГК с высоким содержанием гликолевой кислоты не используются для доставки лекарств из-за их ограниченной растворимости в обычно используемых органических растворителях, которые необходимы для создания микрочастиц или наночастиц [59].

Молочная и гликолевая кислоты являются высококислотными из-за непосредственной близости групп  $-OH$  и  $-COOH$ . Было показано, что подкожные имплантаты из ПЛГК развивают очень кислые среды (pH 2) *in vivo* [60].

Важным природным материалом для наночастиц является альбумин. Наночастицы из него могут быть получены путем химического сшивания (глутаральдегидом), либо путем термической денатурации. Глутаральдегидные сшитые частицы проявляли цитотоксичность *in vitro*, в

отличие от термически денатурированных[61].

Таким образом, в настоящее время существует возможность использовать большое разнообразие материалов для изготовления микро- и наночастиц, которые считаются перспективными системами доставки лекарственных средств, но предпочтение отдается биоразрушаемым и низкотоксичным исходным материалам.

Микрочастицы из биосовместимых и биodeградируемых полимеров – это современные лекарственные формы, способные элиминировать побочные эффекты и неидеальную фармакокинетику уже существующих лекарственных препаратов [39].

Такие микрочастицы могут быть использованы в качестве систем доставки для очень широкого диапазона препаратов; они могут быть введены в кровотоки, подкожно, внутримышечно или предназначены для перорального введения или вдыхания. В настоящее время в литературе описаны различные способы изготовления микросфер из ПГА, главным образом из полигидроксibuтирата и его сополимеров с гидроксивалератом, с использованием техники испарения растворителя, процесса экстракции растворителем или полимеризации мономеров.

Микросферы считаются лучшей формой для инъекционной доставки препарата пролонгированного действия. Микросферы, хотя и содержащие небольшое количество биоматериала, имеют большую площадь поверхности и, при введении подкожно или внутримышечно, они вступают в контакт со широкими областями внутри организма, что может привести к более сильной реакции ткани.

Биологическая безопасность и лекарственная эффективность микрочастиц из ПГА была доказана. Таким образом, известно, что биосовместимость материалов зависит не только от химической структуры и чистоты образцов, но и от размера, а также формы имплантата, т.е. частицы или кластера частиц[16].

### **Метод удаления/испарения растворителя.**

Распространенным методом получения микрочастиц является метод удаления/испарения растворителя из двух- или трехкомпонентной эмульсии. Эмульсионный метод основан на испарении растворителя из эмульсии по типу «масло в воде» в процессе механического перемешивания. Перемешивание полимерных эмульсий осуществляется с применением магнитной мешалки, высокоскоростного гомогенизатора. В качестве масляной фазы выступает раствор полимера в органическом растворителе. В качестве водной фазы выступает раствор поливинилового спирта. Метод часто используется для инкапсулирования нерастворимых или плохо водорастворимых лекарств.

Метод включает следующие этапы:

- растворение полимера в соответствующем летучем органическом растворителе с последующим добавлением активного соединения;
- эмульгирование органической фазы в водной фазе с образованием эмульсии O / W;
- удаление растворителя из дисперсной фазы путем испарения растворителя при механическом перемешивании эмульсии;
- сбор, промывка и высушивание микрочастиц.

Данным методом ранее были приготовлены микросферы из поли (3-гидроксibuтират) размером, сравнимым с диаметром капилляра (5-10 мкм) с целью инкапсулирования бычьего сывороточного альбумина [80].

Помимо широко применяемого эмульсионного метода, микрочастицы могут быть получены иными способами: полимеризацией мономеров, путем химического сшивания, ионным гелеобразованием, с помощью метода фазового разделения, технологией сверхкритических жидкостей, методом атомизации, высушиванием растворов и т.д.

**Метод химического сшивания.** В первой опубликованной работе с использованием метода химического сшивания для получения микрочастиц

зеина авторы заявили, что процесс инкапсулирования основан на глутаральдегид опосредованной реакции межмолекулярного сшивания между зеином и различными противоопухолевыми препаратами, такими как полисахарид-К, митомицин, дауномицин или пепломицин. Однако реакция сшивания может также происходить между молекулами зеина, поскольку глутаровый альдегид является агрессивным и неразборчивым сшивающим реагентом, который может легко реагировать с фенольными, имидазольными, гидроксильными и аминогруппами в белках. Из-за гидрофобности зеина и возрастающей молекулярной массы реакция межмолекулярного сшивания наделяет зеин высокой тенденцией к агрегации и, таким образом, облегчает молекулярную самосборку в микрочастицы при воздействии водного раствора. Полученные микрочастицы имеют тенденцию к агрегации в крупные частицы после лиофилизации и обычно проявляют медленное и неполное высвобождение лекарственного средства из-за задержки проникновения среды и сшитой матрицы зеина.

Учитывая возможное негативное влияние сшивания на активность лекарств, химическое сшивание может быть более подходящим для лекарств без реактивных групп или тех, которые могут восстанавливать свою активность *in vivo* посредством гидролиза или разрушения ковалентных связей, образованных сшиванием. Кроме того, химическое сшивание включает использование токсичных растворителей и может привести к потенциальному риску токсичности при разработке и оценке продукта.

Таким образом, необходимы альтернативные сшивающие агенты и новые методы сшивания для обеспечения безопасности процедуры и конечных продуктов.

**Эмульгирование / осаждение.** Для получения микрочастиц на основе того же белка зеина используют метод эмульгирование / осаждение, который включает эмульгирующие водные растворы, содержащие лекарственное средство и зеин в масле, загруженном поверхностно-активным веществом для получения эмульсии вода-в-масле, причем водная фаза служит в качестве матрицы для подготовки носителя.

Поскольку зеин нерастворим в нейтральном растворе и в этой системе не содержится спирт, водный раствор необходимо поддерживать щелочью в процессе предварительной подготовки эмульсии. Вводят кислоту, растворимую в масле (например, холодную уксусную кислоту), чтобы довести ее рН до нейтральной (6,0). Во время этого процесса зеин осаждается и объединяется в частицы с различными размерами.

**Методика эмульгирования / осаждения / гелеобразования.** По существу является сочетанием эмульгирования / осаждения и эмульгирования / гелеобразования, которое можно использовать для изготовления микрочастиц гибридного зеина или, например, композиционные микрочастицы из хитозана и поли-( $\gamma$ -глутаминовой кислоты)[58].

Механизм внутреннего гелеобразования основан на высвобождении иона кальция иницированном кислотой растворимой в масле и связанного с кальцием ионного сшивания полимера. По этой причине в состав должны быть включены кальциевая соль и другой полимер (например, альгинат или термически денатурированный изолят соевого белка), который может быть сшит ионами кальция. В данной методике уксусная кислота имеет две роли: одна - нейтрализовать рН, чтобы осадить молекулы зеина, а другая - высвободить ионы кальция для инициации гелеобразования полимера.

Осаждение зеина и выброс ионов кальция обычно происходят одновременно, и, таким образом, разделение фаз не происходит в микрочастицах гибридного зеина. Использование большого объема раствора хлорида кальция позволяет микрочастицам переходить в водный раствор и, таким образом, способствует дальнейшему гелеобразованию и затвердеванию частиц. По сравнению с химическим сшиванием и эмульгированием / выпариванием растворителя, этот способ не использует токсичные растворители или сшивающие агенты и, следовательно, позволяет избежать потенциальной токсичности реагентов и других нежелательных побочных эффектов. Кроме того, он обладает перспективным потенциалом масштабирования и может быть использован для инкапсулирования как

гидрофобных, так и гидрофильных агентов.

**Метод распылительного высушивания.** Процедура распылительной сушки обычно включает: распыление исходной жидкости, испарение растворителя и образование частиц, затем сбор частиц.

В основе данного метода лежит распыление материала в системе. Высушиваемый продукт с помощью форсунок диспергируется в сушильную камеру, в которой он контактирует с сушильным агентом (горячим воздухом или инертным газом). Метод имеет ряд преимуществ:

- небольшая продолжительность процесса получения (сушка проходит практически мгновенно);
- возможность регулирования показателей качества высушенного продукта путём изменения параметров режима сушки (объёмный вес сухого порошка, размер частиц, остаточная влажность и др.);
- широкий диапазон возможных температур в зоне сушки: от 50 до 220 °С;
- распылительное высушивание позволяет легко получить сухой продукт, состоящий из нескольких компонентов;
- частицы, полученные в процессе распылительного высушивания различных образцов, обладают стабильностью даже при комнатной температуре.

Недостатком данного метода считается довольно низкий выход микрочастиц, который составляет порядка 20-50 % от исходной массы вещества. Однако установлено, что данная величина может быть увеличена до 70-90 % за счет внедрения высокопроизводительных циклонов для сбора высушенных микрочастиц и тщательного подбора рабочих параметров, которые играют ключевую роль в получении качественного продукта[1].

**Сверхкритический метод антирастворимости.** Подобно распылительной сушке, сверхкритический метод антирастворимости (Supercritical anti-solvent - SAS) также может быть использован для изготовления микро / наночастиц и капсул. Разница в этих двух методах в

основном касается процесса удаления растворителя. Спрей-сушка обычно удаляет растворитель с помощью теплого воздушного потока, тогда как SAS в основном включает процесс экстракции аэрозольным растворителем, опосредованный сверхкритическим CO<sub>2</sub>. Сверхкритический метод антирастворимости требует растворения биоматериала и лекарственного средства в системе растворителей, который обычно состоит из воды и спиртов. Затем полученный раствор распыляется в сверхкритическом CO<sub>2</sub>. При непрерывном извлечении соразтворителя из распыленных капель, полимер или же белок и лекарственное средство постепенно теряют свою растворимость, образуют ядра и превращаются в твердые микрочастицы. Весь процесс аналогичен распылительной сушке, но более низкая температура и бескислородная среда дают больше преимуществ, особенно для тепло- или окислительно-нестабильных препаратов.

По сравнению с вышеперечисленными методами метод распылительного высушивания является более простым, недорогим и производительным способом получения микрочастиц. А также наиболее применяемым является эмульсионный метод получения микро- и наноносителей.

Меньшие частицы с более узким распределением частиц по размерам приводят к лучшей гибкости введения. Кроме того, увеличение биодоступности уменьшает требуемую дозировку лекарственного средства и повышает контроль за продолжительным периодом [65-68].

Частицы меньшего размера могут ускоряться к органам-мишеням и равномерно распределять лекарственные средства по всему телу. Кроме того, дозировка лекарственного средства может контролироваться биоразлагаемыми полимерами, так что полимеры могут фактически контролировать периодическое время высвобождения. Размер частиц должен составлять от 1 до 5 мкм для доставки при вдыхании, от 0,1 до 0,3 мкм для внутривенной доставки и от 0,1 до 100 мкм для пероральной доставки [69].

## 1.7 Применение микро- и наночастиц из ПГА

Большинство систем доставки лекарственных средств основаны на использовании натуральных полимеров на основе белков, полисахаридов и природных полиэфирах. Особое внимание сосредоточено на использовании поли(3-гидроксibuтирата) и родственных сополимеров, главным образом поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) для таких систем доставки[42].

Микроносители лекарственных препаратов могут быть введены инъекцией в кровотоки, подкожно или внутримышечно, а также адаптированы для орального применения или для ингаляций. Незащищенные терапевтические белки и полипептиды показывают короткий период полувыведения *in vivo* и проявляют антигенные свойства когда они вводятся в организм. По этой причине эффективная доставка белковых препаратов требует защиты от враждебной иммунологической системы организма. Полимеры биологического происхождения эффективно используются при доставке различных агентов (особенно лекарственных средств) к какому-либо участку в организме человека. По сравнению с химически полученными полимерами, такие как полигликолят (PGA), полилактат (PLA) и поли(лактид-со-гликолид) (PLGA), которые в основном хорошо известны как биологически разлагаемые носители лекарственных средств, обладающих хорошими замедляющими свойствами, ПГБ и их преимущества связаны с большей технологичностью, отличной биосовместимостью и склонностью к биодegradации в различных условиях окружающей среды.

Кроме этого, короткоцепочечные ПГА могут образовывать поры на поверхности микрочастиц, что обеспечивает быстрое высвобождение лекарства независимо от скорости degradation полимера. Так, ранее в работе Gangrade было установлено, что с увеличением содержания 3-ГВ в полимерной цепи (от 9 до 24 мол.%) возрастал отток препарата, что объяснялось изменением поверхности частиц с образованием пор [40].

Недавно также было подтверждено увеличение оттока

противоопухолевого препарата эллиптицина в зависимости от содержания 3-ГВ в полимерной цепи [41].

Исследования показывают положительные результаты использования наночастиц в качестве внутрисосудистых препаратов для вливания, инъекционных эмульсий для парентерального и энтерального введения, а также в качестве вакцинных дозированных форм для использования при подкожных или внутримышечных инъекциях [74-76].

Наиболее интересным является факт возможности управления кинетикой высвобождения лекарственного препарата с помощью изменения химической структуры ПГА для достижения максимальной доставки препарата. К примеру, разложение короткоцепочечных ПГА происходит за счет поверхностной эрозии, что делает их привлекательными для использования в качестве полимерных носителей лекарственных средств [2].

Основное преимущество контролируемой системы доставки препаратов в фармакологии в том, что концентрация вещества в крови и / или тканях пациента могут поддерживаться на целевом уровне в течение длительного времени [16].

Кроме того, контролируемые тормозящие свойства системы доставки на основе ПГБ и ПГБВ могут модулироваться различными вариациями в обработке и молекулярной массой полимера, как уже упоминалось ранее, и сополимера [3].

Известны единичные примеры включения белковых соединений в композитные микрочастицы из ПГА с полиэтиленгликолем, полилактидами [44].

Исследования показывают, что полигидроксibuтират является хорошим кандидатом для изготовления препаратов пролонгированного действия, в виде микрочастиц предназначенных для внутримышечной инъекции [44].

Так, в исследовании, направленном на разработку высокотехнологичного метода получения микрочастиц, загруженных препаратом паклитакселом, на основе поли-(3-гидроксibuтирата) (ПГБ). Частицы получали методом пьезоэлектрического распылительного высушивания. Правильная сферическая фор-

ма, узкое размерное распределение, а также удовлетворительные результаты высвобождения препарата из полимерных микроносителей *in vitro* еще раз доказывают перспективность такой лекарственной формы для ее будущего применения в фармакологии. Это исследование стало первым этапом для создания противоопухолевого препарата паклитаксела пролонгированного действия [70].

Известно, что в организме человека несколько метаболических процессов производят перекись водорода. Её накопление в клетках влияет на их нормальную функцию, способствуя окислительным процессам, повреждающим ДНК, белки и липиды. Каталаза представляет собой антиоксидантный фермент, способный разлагать перекись водорода на кислород и воду, безобразования свободных радикалов, тем самым защищая клетки от токсического действия перекиси водорода [77].

Было продемонстрировано, что высокие концентрации перекиси водорода образуются в опухолевых тканях. Эта концентрация перекиси водорода активирует транскрипцию различных генов, что может ускорить рост опухолевых клеток при метастазировании. Следовательно, устойчивая доставка каталазы к метастазам опухолевых клеток, по-видимому, являются многообещающим подходом для ингибирования или предотвращения метастазов опухолей. Инкапсуляция каталазы в проницаемый и биоразрушаемый полимер защитит фермент от внешних условий и позволит доставить его к раковым клеткам. Для такой цели в качестве носителя уже был использован сополимер полигидроксипропиридата с гидроксипропиридатом (ПГБВ) [78].

Результат разработки микрочастиц из ПГБ, нагруженных БСА, показал, что они являются хорошей моделью белковых препаратов пролонгированного действия [80].

Таким образом, биоразлагаемые носители используются для того, чтобы подготовить болеутоляющие средства, антидепрессанты, противозачаточные средства, противоопухолевые, противовоспалительные, белковые препараты и многие другие.

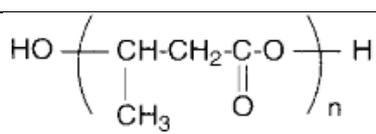
## 2 Материалы и методы

### 2.1 Объекты исследования

Объектом исследования послужили высокоочищенные образцы полигидроксиалканоатов (ПГА): гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)) синтезированные в лаборатории «Биотехнологии новых материалов» СФУ. Для синтеза ПГА использовали продуктивный штамм *Cupriavidus utrophus B10646*, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Штамм культивировали на стандартной солевой среде Шлегеля на глюкозе.

В работе было использовано две партии ПГА от ферментации 2013, 2016. Характеристики использованных образцов в таблице 1.

Таблица 1 – Биоразрушаемые ПГА, используемые для получения микрочастиц

Состав полимера, мол. %	Структурная формула	Свойства полимера				
		Mn, кДа	Mw, кДа	PD	C <sub>x</sub> %	T <sub>m</sub> °C
П(ЗГБ) (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) n 100		616	1500	2,40	72	178
		111	400	3,65	63	178

Рентгеновские эксперименты для определения степени кристалличности образцов проводятся на порошковом дифрактометре D&ADVANCE (“Bruker AXS”, Германия) с линейным детектором VANTEC.

#### 2.1.1 Вспомогательные вещества

В работе использован поливиниловый спирт (ПВС) с Mw 31–50 кДа (Sigma-Aldrich, США), в качестве деполимеризующего агента борогидрид натрия (NaBH<sub>4</sub>) (Panreac, Испания) и гидроксид натрия (NaOH). Хлороформ, дихлорметан, метанол, гексан, этиловый спирт.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Методы снижения молекулярной массы поли-3-гидроксибутирата

А) Борогидрид натрия в качестве деполимеризующего агента.

Для проведения реакции 12 мг  $\text{NaBH}_4$  растворяли в 2 мл метанола. Полученный раствор по каплям добавляли в 3 % раствор П(ЗГБ) (300 мг полимера в 10 мл хлороформа), затем эмульсию механически перемешивали (250 об/мин) в течение 3 и 48 часов (*Heipolph RZR1*, Германия). Далее полученный раствор полимера осаждали в 40 мл холодного этанола. После этого пропускали полимерный раствор через фильтр и оставляли до полного испарения растворителя [38].

Б) Термическая обработка

Перед термической обработкой были отлиты пленки из 2% раствора П(ЗГБ). Далее делали навески пленок по 750 мг и расплавляли с использованием колбонагревателя (*LH 125*) при  $190^\circ\text{C}$ . Колба нагревалась в течение 10; 20 и 30 минут. Затем растворяли полимер в колбе 20 мл хлороформа и осаждали в 100 мл гексана. Далее раствор полимера был профильтрован [45].

В) Гидроксид натрия в качестве деполимеризующего агента

Был приготовлен 2,5 М раствор  $\text{NaOH}$ . Далее к 10 мг молотого П(ЗГБ) добавляли по 2,5 мл раствора  $\text{NaOH}$ . Реакция проходила при механическом перемешивании растворов в течение 15; 30; 40; 50 и 60 минут соответственно. Затем проводилась нейтрализация реакции соляной кислотой.

После обработки вышеперечисленными методами, молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гелепроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США). Находили средневесовую ( $M_w$ ), среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также индекс полидисперсности ( $D = M_w/M_n$ ).  $^1\text{H}$  ЯМР спектр молекулярной структуры полимеров определены на спектрометре Bruker-Avance III-600 MHz (США).

### 2.2.2 Получение микрочастиц эмульсионным методом

Для получения микрочастиц из двухкомпонентной эмульсии был взят высокомолекулярный образец П(ЗГБ)с исходной молекулярной массой 1500 кДА. Из него посредством термической обработки и обработки борогидридом натрия были получены низкомолекулярные образцы, из которых также были получены микрочастицы эмульсионным методом. Метод основан на испарении растворителя из эмульсии при механическом перемешивании.

Чтобы получить двухкомпонентную эмульсию «масло-вода» был приготовлен 1%-ный раствор П(ЗГБ) (100 мг полимера в 10 мл дихлорметана). Раствор вносили в 100 мл 1%-ного водного раствора ПВС при перемешивании высокоскоростным гомогенизатором (24000 об/мин) (*Heidolph*, Германия) в течение 5 мин; полученную эмульсию механически перемешивали на магнитной мешалке *Heipolph RZR1* (Германия) до полного испарения растворителя. Микрочастицы собирали после центрифугирования (5 минут 10000 об/мин). Затем микрочастицы промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильной камере.

## 2.2.2 Получение микрочастиц методом распылительного высушивания

Для применения метода распылительного высушивания молекулярная масса полимера должна быть не выше 100 кДа. Для получения микрочастиц методом распылительного высушивания были взяты низкомолекулярные образцы после термической обработки и после обработки борогидридом натрия П(ЗГБ) с начальной молекулярной массой 400 000 Да.

Был приготовлен 1% раствор П(ЗГБ) (400мг полимера растворяли в 40 мл дихлорметана). Установлена температура на входе в систему 95°C и скорость подачи раствора 1,5мл/мин.

В процессе распылительного высушивания на установке MiniSprayDrierB-290 (BUCHILaboratoryEquipment, Швейцария) происходит быстрое удаление растворителя, которое приводит к ускоренному образованию микрочастиц. В установке через сопло распылителя (отверстие диаметром 0,7 мм) подается инертный газ (аргон) и с током газа под действием центробежных сил сухие частицы осаждаются в высокопроизводительные циклоны. Был приготовлен 1%-ный раствор П(ЗГБ) (100 мг полимера в 10 мл дихлорметана).

### 2.2.3 Анализ свойств микрочастиц

Свойства микрочастиц полученных двумя способами, были проанализированы с помощью системы для характеристики наночастиц: ZetasizerNanoZS (Malvern, Великобритания). Был определен электрокинетический потенциал или  $\zeta$ -потенциал, средний диаметр и размерное распределение микрочастиц. Каждый образец был измерен в трех повторах. Полученные результаты размерного распределения и средний диаметр были использованы для описания размера микрочастиц. Поверхностный заряд микрочастиц был охарактеризован величиной электрокинетического потенциала (дзета-потенциала), которая определяется электрофоретической подвижностью частиц в суспензии с применением уравнения Генри на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS.

Поверхностные характеристики микрочастиц изучали с применением сканирующей электронной микроскопии на микроскопах S-5500 и TM-3000 (Hitachi, Япония).

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

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

где  $W_m$  – масса полученных микрочастиц, мг;

$W_p$  – масса использованного полимера, мг.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПГБ – полигидроксибутират

ПГВ – полигидроксиалерат

СД – система доставки

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

$M_w$  – средневесовой молекулярный вес

$M_n$  – среднечисловой молекулярный вес

ИПД – индекс полидисперсности

м.м. – молекулярная масса

IL-1 $\beta$ , IL-6 – интерлейкин-1, интерлейкин - 6

TNF- $\alpha$  - туморонекротический фактор-альфа

$^1\text{H}$ -ЯМР – протон ядерный магнитный резонанс

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шершнева, А.М. Конструирование наночастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки [Электронный ресурс] / А.М. Шершнева, Е.И. Шишацкая // Journal of Siberian Federal University. Biology 2 – Красноярск, 2014. – Т. 2, № 7. – С. 195-208. Режим доступа: <http://www.elib.krasu.ru/bitstream/handle/>(дата обращения: 10.12.2016).
2. Hazer, D. Burchu Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review [Электронный ресурс] / D. Hazer Burchu et al. // Journal of Materials Science and Engineering: C. – 2013. – vol. 32, p. 637–647. Режим доступа: <http://www.sciencedirect.com/science/>(дата обращения: 10.12.2016).
3. Petriz, A. Reyes Novel Poly(3-hydroxybutyrate-g-vinyl alcohol) Polyurethane Scaffold for Tissue Engineering [Электронный ресурс] / A. Pétriz Reyes et al. // A nature research journal. – 2016. – режим доступа: <http://www.nature.com/articles/srep31140>(дата обращения: 12.12.2016).
4. Bonartsev, A. P. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by Strain Azotobacter chroococcum 7B [Электронный ресурс] / A.P. Bonartsev et al. // Journal of Acta Naturae. – 2016. – v.8, p. 77–87. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081702/>(дата обращения: 12.12.2016).
5. Горева, А.В. Характеристика полимерных наночастиц на основе резорбируемых полиэфиров окисалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов [Электронный ресурс] / А.В. Горева и др. // Высокомолекулярные соединения. – 2013. – Т. 54, № 2. – С. 224-236. Режим доступа: [http://biotech.sfu-kras.ru/files/374\\_Goreva\\_rys.pdf](http://biotech.sfu-kras.ru/files/374_Goreva_rys.pdf)(дата обращения: 11.12.2016).
6. Николаева, Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] / Е.Д. Николаева // Journal of Siberian Federal University. – Красноярск, 2014. – Т. 2, №7. – С. 222-233. Режим доступа:

<http://www.elib.krasu.ru/bitstream/han>(дата обращения: 15.12.2016).

7. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль нанобных полигидроксиалканоатов [Электронный ресурс] / Т.Г. Волова // Journal of Siberian Federal University. – Красноярск, 2014. – Т. 2, № 7. – С. 103-133. Режим доступа: <http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/han>(дата обращения: 12.12.2016).

8. Кедик, С.А. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот[Электронный ресурс] / С.А. Кедик и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 18-32. Режим доступа: [http://dissolutiontech.ru/assets/files/3\\_Kedik.pdf](http://dissolutiontech.ru/assets/files/3_Kedik.pdf)(дата обращения: 15.12.2016).

9. Bogdan, C. Simionescu Natural and Synthetic Polymers for Designing Composite Materials / C. Simionescu Bogdan, Ivanov Daniela // Handbook of Bioceramics and Biocomposites. – 2015. - № 9. – Р. – 1-54. Режим доступа: <http://link.springer.com/referencework>(дата обращения: 10.12.2016).

10. Shi, Rui Recent Advances in Synthetic Bioelastomers / Rui Shi et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2009. - № 10. – Р. 4223-4256. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2790105/>(дата обращения: 15.12.2016).

11. Тимченко, Т.В. Поли-d,l-лактид-ко-гликолид: методы получения, свойства и использование для разработки лекарственных препаратов со средствами нано- и нанодоставки / Т.В. Тимченко и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 1-11. Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/poli-d-l-laktid>(дата обращения: 15.12.2016).

12. Felicity, Y. Nan Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading / Y. Han Felicity et al. // Frontiers in Pharmacology. – 2016. – Vol. 7, № 185. – Р. 1-11. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>(дата обращения: 15.12.2016).

13. Gisha, E. Luckachan Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives / E. Luckachan Gisha, C. K. S. Pillai // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 637-676. Режимдоступа: <http://link.springer.com/article/10>.(дата обращения: 15.12.2016).
14. George, A.B. What does glycolysis make and why is it important? / A. B. George // *Journal of Applied Physiology*. — 2013. — Vol. 108. — № 6. — p. 1450-1451. — DOI:10.1152/jappphysiol.00308.2010
15. Vert, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts / M. Vert // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – Vol. 20, № 2. – P. 437-446. Режимдоступа: <http://link.springer.com/article/1>(дата обращения: 15.12.2016).
16. Шишацкая, Е.И. и др. Исследование лекарственной эффективности доксорубицина, депонированного в наночастицы из резорбируемого Биопластотана, на лабораторных животных с солидной формой карциномы Эрлиха [Электронный ресурс] / Е.И. Шишацкая и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*.-2012.- Т. 154, с. 741-745. Режим доступа: <http://elibrary.ru/download/74129617.pdf>(дата обращения: 15.12.2016).
17. Shrivastav, Anupama Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System [Электронный ресурс] / Anupama Shrivastav et al. // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2, P. 1-12. Режимдоступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/arti>(дата обращения: 15.12.2016).
18. Pouton, C. W. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery / Pouton C. W., Akhtar S. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1996. - Vol. 18, №. 2, p. 133–162.
19. Гончаров, Д.Б. Реология растворов полигидроксиалканоатов [Электронный ресурс] / Д.Б. Гончаров, А.Г. Суковатый // *Journal of Siberian Federal University*. – Красноярск, 2016. – Т. 2, № 9. – С. 190-197. Режим доступа: <http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle>(дата обращения: 13.12.2016).
20. Arias, S. et al. Poly-3-hydroxyalkanoate synthases from *Pseudomonas*

putida U: substrate specificity and ultrastructural studies [Электронный ресурс] / S. Arias et al. // *Microbial biotechnology*. – 2008.- Vol.1, P. 170–176. Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/>(дата обращения: 13.12.2016).

21. Luef, K. P. et al. Poly(hydroxy alkanate)s in Medical Applications [Электронный ресурс] / K. P. Luef et al. // *Chem. Biochem. Eng. Q.* -2015.- vol.29, p. 287–297. Режим доступа: <http://hrcak.srce.hr/141918>(дата обращения: 13.12.2016).

22. Maestro, B. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins / B. Maestro and Sans J.M. // *Microbial biotechnology*. – 2017.- DOI: 10.1111/1751-7915.12718.

23. Kalia, V.C. et al. Bioplastics / V.C. Kalia et al. // *Microbial biotechnology*. – 2000. – p.433–445.

24. Reddy, C.K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview / C.K. Reddy C.K. et al. // *Bioresour Technology*. – 2013. – p.137–146. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2.

25. Singh, M. et al. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates / M. Singh et al. // *Microb Cell Fact.* – 2009. P.17-33.doi: 10.1186/1475-2859-8-38.

26. Kumar, P. et al. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. / P. Kumar et al. // *Biotechnol Adv.* - 2013. – vol.31 p.1543–1561. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.007.

27. Wang, Y. et al. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. / Y. Wang et al. // *Curr Opin Biotechnol.* – 2014. – p.59–65. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.001.

28. Singh, M. et al. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. / M. Singh et al. // *Microb Cell Fact.* – 2014.- Vol.2, № 5, p.8-38. doi:10.1186/1475-2859-8-38.

29. Zhao, W. Production and characterization of terpolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes phaAB. / W. Zhao, G.Q. Chen //

Process Biochem. –2007. –vol.42, p.1342–1347. doi:10. 1016/j.procbio.2007.07.006

30. Kumar, P. et al. Ecobiotechnological approach for exploiting the abilities of *Bacillus* to produce co-polymer of polyhydroxyalkanoate. / P. Kumar et al. // Indian J Microbiol. – 2014. - vol. 54, p.151–157. doi:10.1007/s12088-014-0457-9

31. Iwata, T. Strong fibers and films of microbial polyesters. / T. Iwata // Macromol Biosci. – 2007.- vol.5, p.689–701. doi:10.1002/mabi.200500066

32. Agus, B. et al. Molecular weight characterization of poly(R)-3-hydroxybutyrate synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. / B. Agus et al. // Polym Degrad Stab. – 2006. –vol.91, p.1138–1146. doi:10.1016/j.polymdegradstab

33. Билибин, А.Ю. Деструкция полимеров, ее роль в природе и современных медицинских технологиях. / А.Ю. Билибин, И.М. Зорин // Успехи химии. – Санкт-Петербург, – 2013. – Т.2, с.44-60.

34. Мышкина, В.Л. и др. Влияние условий культивирования на молекулярную массу поли-3-гидроксибутирата, синтезируемого *Azotobacter chroococcum* 76 / В.Л. Мышкина и др. // Прикладная биохимия и нанобиология - 2008. - т. 44. № 5. с. 482-486.

35. Efentakis, M. Comparative evaluation of various structures in polymer controlled drug delivery systems and the effect of their morphology and characteristics on drug release / M. Efentakis, S. Politis // Eur Polym J. – 2006. – Vol.42. – P. 1183-1195.

36. Frieberg, S. Polymer microparticles for controlled drug release / S. Frieberg, X.X. Zhu // Int J Pharm. – 2004. – Vol.19. – P. 282-287.

37. Braunecker, J. The effects of molecular weight and porosity on the degradation and drug release from polyglycolide / J. Braunecker, M. Baba, G.E. Milroy et al. // Int J Pharm. – 2004. – Vol. 282. – P. 19-34

38. Baran, E.T. et al., Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. / E.T. Baran et al. // J. Microencapsulation. –2002. – vol. 19, №. 3, p.363-376.

39. Шишацкая, Е.И. Биодegradация ПГА in vivo [Электронный ресурс] / Е.И. Шишацкая // Journal of Siberian Federal University. – Красноярск, 2016. – Т. 1, № 9. – С. 21-32. Режим доступа: <http://krsk.elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle/231> (дата обращения: 15.12.2016).
40. Gangrade, N. Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: Preparation, morphology and release properties / N. Gangrade, J.C. Price // J. Microencapsulation. – 1991. – Vol. 8, P. 185-202.
41. Masood, F. Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application / F. Masood, P. Chen, T. Yasin, et al. // Mater. Sci. Engineer. C. – 2013. – Vol. 33, P. 1054–1060.
42. Park, J. et al. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. / J. Park et al. // Molecules. – 2005. - Vol. 10, № 1, pp. 146–161.
43. Li, F. et al. Microparticles with polyethylene glycol. / F. Li et al. // J. Appl. Polym. Sci. -2009. - Vol. 114, № 2, P. 818.
44. Shishatskaya, E. I. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation [Электронный ресурс] / E. I. Shishatskaya et al. // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2008. – Vol. 19, № 6, – P. 2493–2502. Режим доступа: <http://link.springer.com/article/> (дата обращения: 15.12.2016).
45. Nguyen, S. et al. Thermal Degradation of Poly(3-hydroxyalkanoates): Preparation of Well-Defined Oligomers / S. Nguyen et al. // Biomacromolecules. – 2002. – vol. 3, p. 219-224.
46. Horowitz, D.M. Methods for separation and purification of biopolymers / D.M. Horowitz, Brennan E. M. // Microbial biotechnology. – 1999. – Vol. 1, №3. – P. 76-89.
47. Nair, S.R. et al. Analysis of IL-1  $\beta$  release from cryopreserved pooled lymphocytes in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid [Электронный ресурс] / S.R. Nair et al. // Biomed Research International. - 2013. - Vol.11, №7. – P.187-198. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024208> doi: 10.1155/2013/689642 (дата обращения 15.02.2018)

48. Rouxhet, L. et al. Interactions between a biodegradable polymer, poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate), proteins and macrophages/ L. Rouxhet et al. // *Macromol. Symp.* – 1998. – Vol. 130, p. 347-366
49. Shishatskaya, E.I. et al. Evaluation of antitumor activity of rubomycin deposited in absorbable polymeric BioMed Research International microparticles / E.I. Shishatskaya et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.*-2008.-Vol. 145, №. 3, p. 358–361.
50. Shishatskaya, E. I. et al. Biocompatibility and Resorption of Intravenously Administered Polymer Microparticles in Tissues of Internal Organs of Laboratory Animals / E. I. Shishatskaya et al. // *Journal of Biomaterials Science.* – 2011. – Vol. 22, p. 2185-2203.doi:10.1163/092050610X537138
51. Shishatskaya, E.I. et al.// *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* - 2006.- vol. 17, № 5. p. 481.
52. Shishatskaya, E.I. // *Macromol. Symp.* - 2008. -vol. 269, p. 65.
53. Sevastianov, V.I. et al. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. / V.I. Sevastianov et al. // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* – 2003. – vol. 14, p. 1029–1042.
54. Nobes, G. A. R. et al. Polyhydroxyalkanoates: materials for delivery systems / G. A. R. Nobes et al // *Drug Delivery.* –1998. – vol. 5, №. 3, p. 167–177.
55. Sri. S.J. et al. Microencapsulation: a review. / Sri. S.J. et al. // *Int J Pharma Bio Science.*- 2012.- Vol. 3, №1, P.509-531.
56. Orts, W. J. et al. Poly(hydroxyalkanoates): biorefinery polymers with a whole range of applications / W. J. Orts et al. // *Canadian Journal of Chemistry.* - 2014.- vol. 86, №. 6, p. 628–640.
57. Gould, P. L. et al. Polymers for biodegradable medical devices. Hydroxybutyrate-valerate copolymers as non-disintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms / P. L. Gould et al. // *International Journal of Pharmaceutics.* - 1997.- vol. 38, p. 231–237.
58. Beisl, S. et al. Lignin from Micro- to Nanosize: Production Methods [Электронныйресурс] / S. Beisl et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – vol. 18, №6, p.

1244-1281.Режимдоступа: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1244/htmdoi:10.3390/ijms18061244> (датаобращения 10.03.2018)

59. Xiaoting, Y. et al. Bioresponsive Materials for Drug Delivery Based on Carboxymethyl Chitosan/Poly( $\gamma$ -Glutamic Acid) Composite Microparticles [электронныйресурс] /Y. Xiaoting et al. // *Mar. Drugs.*- 2017.-Vol. 15, №5, P.127-144. Режимдоступа:<http://www.mdpi.com/1660-3397/15/5/127> (датаобращения 12.03.2018)

60. Fredenberg, S. et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-a review [Электронныйресурс] / S. Fredenberg et al. // *Int. J. Pharm.* – 2012. – Vol. 415, p. 34–52. Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049> (дата обращения 10.01.2018)

61. Mader, K. et al. Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy [Электронныйресурс] / K. Mader et al. // *Journal of Biomaterials.*- 1996.- Vol. 17, p. 457–461. Режим доступа: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89664-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89664-5) (дата обращения 15.02.2018)

62. Yu, Z. et al. Controlled drug release to the inner ear: Concepts, materials, mechanisms, and performance [Электронныйресурс]/ Z. Yu et al. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – Vol. 9, p. 327- 343. Режим доступа: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-343> (дата обращения 11.02.2018)

63. Chen, L. et al. Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery / L. Chen et al. // *Biomacromolecules.*-2009.- Vol. 10, p. 3327-3334.

64. Chen, L. et al. In vitro study of the release properties of soy-zein protein microspheres with a dynamic artificial digestive system. / L. Chen et al // *J Agric Food Chem.*-2010.- Vol. 8, p.9861-9867.

65. Zhang, Y. et al. Design, fabrication and biomedical applications of zein-based nano/micro-carrier systems / Y. Zhang et al. // *International Journal of Pharmaceutics.*-2016.-Vol. 513, P. 191-210.

66. Yulu, W. et al. Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process / W. Yulu, et al. // *J Supercrit Fluids*. – 2004.- Vol.28, p.85–99.
67. Fages, J. et al. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology/ J. Fages et al. // *Powder Technology*. 2013.- Vol.11, p.219–226.
68. Ginty, P. et al. Drug delivery goes supercritical / P. Ginty et al. // *Materials Today*. – 2013.- vol. 8, p. 42–48.
69. Ke, W. et al. Precipitation of a biodegradable polymer using compressed carbon dioxide as anti-solvent / W. Ke et. al. // *J Supercrit Fluids*. – 2013. - vol. 46, p. 211–216.
70. Thote, A. Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release / A. Thote, R. Gupta // *Nanomedicine*. – 2008.- Vol.1, p.85–90.
71. Зернов, А.Л. и др. Наночастицы из низкомолекулярного поли-(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания / А.Л. Зернов и др. // *Российские нанотехнологии*. - 2017. – Т. 12, №3, с. 84-90.
72. Nishikawa, M. et al. Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes / M. Nishikawa et al. // *J Contr Release*. - 2005. – Vol.10, №3 p.101-108.
73. Gursel, I. et al. In vitro antibiotic release from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods / I. Gursel et al. // *Journal of Microencapsulation*.-2015.- vol. 19, №. 2, p. 153–164.
74. Lemoine, D. Polymeric nanoparticles as the delivery system for influenza virus glycoproteins / D. Lemoine, V. Preat // *Journal of Controlled Release*.-1998.- vol. 54, p.15-27.
75. Song, C. X. et al. Formulations and characterisation of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery / C. X. Song et al. // *Journal of Controlled Release*. -1997. - vol.43, p.197-212.

76. Gibaud, S. et al. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) / S. Gibaud et al. // Journal of Controlled Release. -1998.- vol.52, p.131-139.

77. Valko, M. et al. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko et al. //Curr Med Chem. – 2015. – Vol. 12, №10, p. 1161–208.

78. Campos, E. et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications / E. Campos et al. // European Polymer Journal.- 2013.- Vol. 49, p. 2005-2021.

79. Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер //БИНОМ, Лаборатория занятий. 2011.– с. 560.

80. Зернов, А.Л. и др. Микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка / А. Л. Зернов и др. //Современные технологии в медицине. – 2015.– Т. 7, №4, с. 50-57.doi: 10.17691/stm2015.7.4.06

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской  
программы



подпись      инициалы, фамилия

« 18 » июля 20 18 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Сравнительная оценка различных способов получения микрочастиц из низко- и высокомолекулярных фракций полигидроксиалканоатов

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 - Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель



проф., д.б.н.

Е.И. Шишацкая

Выпускник



А.И. Калуцкая

Рецензент



гл. науч. сотр., д.б.н.

В.С. Бондарь

Красноярск 2018