

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Конструирование носителей для депонирования лекарственных препаратов  
на основе микробных биополимеров, синтезированных  
*Cupriavidus eutrophus* В-10646

06.04.01 Биология  
06.04.01.00.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	д.б.н., профессор	Т.Г. Волова
Выпускник	<u>ББ16-01М, 041625649</u>	_____	К.В. Абанина
Рецензент	_____	к.б.н.	А.В. Муруева

Красноярск 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1 Современные носители лекарственных препаратов.....	6
1.2 Материалы для формирования лекарственных носителей .....	6
1.2.1 Синтетические материалы .....	6
1.2.2 Природные биоразрушаемые полимеры.....	8
1.2.3 Поли(3-гидроксibuтират) в качестве носителя для препаратов ....	11
1.2.4 Применение композитных материалов для формирования лекарственных носителей.....	12
1.3 Получение носителей лекарственных препаратов .....	12
1.3.1 Получение микрочастиц для депонирования препаратов .....	14
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	18
2.1 Характеристика ПЗГБ.....	18
2.2 Синтетические полимеры.....	20
2.3 Лекарственные препараты.....	20
2.4 Методы получения микрочастиц.....	21
2.4.1 Получение микрочастиц эмульсионным методом .....	22
2.4.2 Получение микрочастиц методом распылительного высушивания	24
2.5 Изучение характеристик микрочастиц .....	24
2.6 Исследование оттока лекарственных препаратов из композитных микрочастиц <i>in vitro</i> .....	26
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	28
3.1 Характеристика композитных микрочастиц .....	28
3.2 Характеристика композитных микрочастиц, нагруженных лекарственными препаратами.....	30

3.3 Исследование оттока лекарственных препаратов из композитных микрочастиц <i>in vitro</i> .....	36
3.4 Оценка лекарственной эффективности микрочастиц, нагруженных ЛВ на примере модельных микроорганизмов <i>Escherichia coli</i> .....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	46
ВЫВОДЫ.....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	50

## ВВЕДЕНИЕ

Системы контролируемой доставки лекарств (СКДЛ) предназначены для непрерывной подачи содержащихся в них веществ в течение длительного времени с заранее заданной скоростью. Контролируемая доставка препаратов особо востребована при различных инфекционных, в том числе долготекущих и системных заболеваниях[1].

Важным аспектом для создания лекарственных носителей является выбор материала, используемого в качестве матрикса. Такой материал должен обладать рядом медико-биологических и физико-механических свойств, например, таких как биосовместимость и биодegradация.

На сегодняшний день поиск и синтез новых материалов для доставки лекарственных средств, отвечающих необходимым требованиям, является перспективным направлением [2].

Синтетические материалы, как правило, более доступны для конструирования СКЛД, чем полимеры природного происхождения, но их большим недостатком является непредсказуемое взаимодействие с клетками и неконтролируемое время биодegradации в среде организма.

Биодegradируемые природные полимеры, используемые как носители лекарственных веществ (ЛВ), такие как коллаген, желатин, хитозан и полиэфиры бактериального происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА), обладают высокой биосовместимостью, постепенно разрушаются в организме и, благодаря этому, появляется возможность контролировать выход ЛВ в окружающую среду. Так же в настоящее время активно ведется разработка и исследование композитных носителей для доставки ЛВ, с целью улучшения эксплуатационных и технологических характеристик носителей, а так же для регулирования скорости высвобождения ЛВ.

Следует отметить, что при использовании традиционных лекарственных форм дозировка и концентрация лекарственных веществ в

организме не поддается контролю, что приводит к увеличению терапевтической дозы, которое влечет за собой увеличение нежелательных побочных эффектов [1, 3, 4].

Изучение новых систем доставки ЛВ с пролонгированным действием является приоритетной задачей в медицине [1, 2].

На сегодняшний день существуют различные методы, которые позволяют сконструировать матрикс для ЛВ, отвечающий всем необходимым механическим и физико-химическим свойствам.

Целью данной работы явилось конструирование и исследование носителей, в виде микрочастиц на основе поли(3-гидроксibuтирата) (ПЗГБ) в композиции с синтетическими полимерами, для депонирования лекарственных препаратов.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Получить образцы микробного биополимера, синтезируемого микроорганизмами *Cupriavidus eutrophus* В-10646;
2. Получить микрочастицы на основе поли(3-гидроксibuтирата) в композициях с полиэтиленгликолем (ПЗГБ/ПЭГ) и поли(молочно-гликолевой кислотой) (ПЗГБ/ПМГК), нагруженные лекарственными препаратами;
3. Изучить влияние метода получения на свойства микрочастиц;
4. Исследовать выход лекарственных препаратов из микрочастиц в модельную среду *in vitro*;
5. Оценить лекарственную эффективность микрочастиц, нагруженных лекарственными препаратами на примере грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Современные носители лекарственных препаратов

В последние три десятилетия проводятся интенсивные исследования полимерных систем для контролируемого высвобождения лекарственных веществ. Пролонгированное введение в организм в требуемых дозах позволяет устранить многие ограничения перорального, инъекционного, аэрозольного и других способов использования традиционных лекарственных форм. Среди подобных ограничений чаще всего встречаются повышенная токсичность и нестабильность веществ, неравномерная скорость их подачи и др. [1, 5].

Так же не менее актуальной остается проблема того, что в большинстве лекарственных препараты имеют гидрофобную структуру, что усложняет способ их доставки.

На сегодняшний день активно продолжается изучение параметров и характеристик наноконтейнеров, в которых лекарственные препараты смогут находиться в стабильном состоянии в течение необходимого времени, что так же позволит не только управлять скоростью диффузии, но и определить условия инициации диффузии препарата [6].

## 1.2 Материалы для формирования лекарственных носителей

При выборе материала для конструирования полимерных лекарственных носителей, руководствуются следующими соображениями: материал должен обладать высокой биосовместимостью и биобезопасностью, быть химически инертным, не иметь в своем составе выщелачиваемых примесей, легко синтезироваться, а в случае гидролиза (или резорбции) не образовывать токсичных соединений, так как будет контактировать с внутренней средой организма [3, 7].

### 1.2.1 Синтетические материалы

Круг синтетических материалов применяемых в биомедицине достаточно разнообразен. Одним из основных достоинств синтетических

полимеров является их стоимость, которая значительно ниже стоимости полимеров природного происхождения. Из них легко формировать трехмерные структуры, не возникает трудностей с сырьем и производством полимеров с воспроизводимыми и контролируемыми свойствами, к которым можно отнести микроструктуру и прочность [8, 9].

*ПМГК* – поли (молочно-гликолевая кислота) – сополимер на основе полигликолевой и полимолочной кислот. Является одним из наиболее популярных синтетических полимеров, используемых в качестве матриц для контролируемой доставки препаратов, а также в тканевой инженерии [3]. ПМГК является биоразлагаемым полимером, в живых организмах данный материал разлагается без образования токсичных соединений до молочной кислоты. Так же он обладает высокой механической прочностью, что обеспечивает возможность создание гибкой структуры.

Микросферы на основе ПМГК, используемые в качестве носителей для лекарственных препаратов (ЛП) способны удерживать препарат, тем самым контролируя его высвобождение и оптимизируя дозировку. В процессе высвобождения препарата носитель полностью разлагается, что исключает проблему хирургического вмешательства для удаления материала [10].

*Полиуретаны* (ПУ) – полимеры, содержащие уретановую группу. Данная группа представлена широким разнообразием уретановых полимеров, обладающих различными физическими и биологическими свойствами. Полиуретаны являются одной из основных групп полимерных материалов, которые применяются при изготовлении различных имплантатов, а также многих других изделий [41]. Большинство полиуретанов, используемых в медицинских целях, представляют собой двухфазные блоксополимеры (также называемые полиуретанами с различной жесткостью сегментов в макромолекуле).

*Полисилоксаны(силиконы)* имеют многолетнюю успешную репутацию и широко используются в медицине. Представлены группой материалов,

которая включает эластомеры, гели, смазочные вещества, пены и клеи. Силиконы являются химически очень стабильными и неактивными. Они имеют хорошие характеристики электроизоляции и низкое влагопоглощение. Силиконы относятся к материалам, предназначенным для долгосрочного использования, когда необходим эластомер и когда имеется потребность в биодолговечности и биосовместимости [42].

*Полиэтилен* является гидрофобным и биоинертным материалом. Для него характерен низкий предел текучести, что ограничивает его использование. Увеличение кристалличности и молекулярного веса ПЭ, способствует увеличению предела текучести. Полиэтилен низкой плотности (или полиэтилен высокого давления) – распространенный и доступный материал, обладающий высокой биологической инертностью, молекулярной массы 50–200 Да. Ранее широко применялся в качестве материала для эндопротезирования в челюстно-лицевой хирургии, в настоящее время применяется сравнительно редко. Полиэтилен высокой плотности имеет более высокую степень кристалличности по сравнению с предыдущим; применим для создания отдельных типов имплантатов. Полиэтилены низкой и высокой плотности легко поддаются формованию [22].

Однако большим недостатком синтетических материалов являются их непредсказуемое взаимодействие с живыми клетками и компонентами иммунной системы пациента [23], а также неконтролируемое время биодegradации в среде организма. Главные причины осложнений при использовании синтетических биодegradируемых материалов – возможные проявления негативных реакций (воспалительная и аллергическая реакции) организма на продукты деструкции, которые могут быть связаны с проявлением канцерогенности [24].

### 1.2.2 Природные биоразрушаемые полимеры

В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биодegradируемым полимерам природного происхождения [11, 12].



Получение полимеров, производство которых основано на природных возобновляемых ресурсах не зависит от добычи углеводов и является альтернативным путем [13]. Такие полимеры, как правило, обладают биосовместимостью и способностью к биодegradации в течение длительного времени, и могут быть использованы в качестве носителя для лекарственных препаратов [2, 14].

В данном разделе приведены примеры биополимеров природного происхождения, которые чаще всего используются в качестве матрикса для доставки различных биологически активных веществ.

*Альгинат* – природный линейный полисахарид, получаемый из морских водорослей, принадлежит к семейству маннуроновой и гиалуроновой кислот. Благодаря ионным взаимодействиям при добавлении двухвалентных катионов в альгинатах происходит обратимое гелеобразование. Альгинатные гели обладают высокой биосовместимостью. Альгинаты так же используют в качестве ранозаживляющего материала, в виде пленок и волокон используют для обработки ран и ожогов [25]. Альгинаты с высоким содержанием гиалуроновой кислоты широко применяются в качестве матрикса для депонирования лекарственных препаратов [22].

*Коллаген* – фибриллярный белок, наиболее распространенный белок у позвоночных, он входит в состав соединительной, костной и хрящевой тканей. Молекула коллагена состоит из трех  $\alpha$ -цепей, формирующих правозакрученную тройную спираль. Коллаген является наиболее широко используемым природным полимером для биомедицинских целей [26]. Коллаген благодаря своей биосовместимости и хорошо зарекомендовавшему себя профилю безопасности представляет собой благоприятную матрицу для доставки лекарственных препаратов к участку паталогического процесса в организме пациента. Однако, недостатком коллагена является его неконтролируемое время деградации и ограниченный срок функционирования в условиях живого организма [22].

*Желатин* получают из коллагена, натурального полимера, который является основным компонентом кожи, костей и соединительной ткани. Используется в фармацевтических препаратах, раневых повязках и клеях. Желатин обладает рядом свойств, которые позволяют рассматривать его в качестве биоматериала: биосовместимость, биоразлагаемость и биобезопасность. Как и белок, желатин имеет высокое содержание аминокислот, таких как глицин, пролин и оксипролин, что потенциально ускоряет заживление мягких тканей [27].

В отношении доставки лекарств, высоко гидрофильный желатин поглощает раствор препарата и после контакта формирует гидрогель [27]. Свободный гель матрицы способен связывать молекулы препарата и впоследствии контролировать высвобождение лекарственного средства посредством диффузии или контролируемого механизма деградации [22].

*Хитозан* – линейный биоразлагаемый сополимер, состоит из мономеров D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, различное соотношение мономеров придает ему интересные свойства. В водных средах этот поликатионный материал может взаимодействовать с отрицательно-заряженным эпителием слизистой оболочки, что позволяет использовать хитозан в качестве носителя препаратов, так как повышается биодоступность препаратов, которые могут лишь ограниченное время адсорбироваться на участке поглощения. Именно способность к биодеградации, биосовместимость и биоадгезивные свойства позволяют использовать данный полимер для доставки лекарственных препаратов [15]. Хитозан обладает антибактериальным действием, благодаря способности связывать органические водорастворимые вещества, например бактериальные токсины, ингибирует как бактериальный, так и грибковый рост [16, 17].

*Полигидроксиалканоаты (ПГА)* – относятся к классу сложных полиэфиров, природного происхождения. В состав полигидроксиалканоатов входит более 100 различных мономеров, что

делает их крупнейшей группой полимеров[11]. ПГА обладают многими свойствами, которые являются привлекательными для биомедицины, такими как высокая эластичность, прочность, термопластичность, так же они обладают высокой степенью биосовместимости [12]. Биодegradация ПГА происходит клеточным и гуморальным путями. Скорость биодegradации гораздо ниже, чем у других известных биоразрушаемых полимеров. Мономеры, образующиеся в результате резорбции ПГА, являются абсолютно безвредными для организма. Поли(3-гидроксибутират) является наиболее изученным полимером данного семейства и активно исследуется учеными разных стран в качестве материала для создания носителей лекарственных препаратов [3].

#### 1.2.3 Поли(3-гидроксибутират) в качестве носителя для препаратов

*Поли(3-гидроксибутират) (ПЗГБ)* – полимер микробиологического происхождения, представитель семейства полиэфиров алкановых кислот (ПГА). Это стереорегулярный оптически активный полимер, обладающий высокой степенью кристаллизации [18, 19].

ПЗГБ обладает рядом свойств, таких как биосовместимость, биодegradация в течение длительного времени (сотни дней) без образования токсичных продуктов до 3-оксимасляной кислоты, которая является естественным метаболитом и присутствует в крови человека. Все вышеперечисленные свойства позволяют использовать ПЗГБ в качестве материала для получения изделий медицинского назначения, которые вступают в контакт с внутренней средой организма. Наиболее часто ПЗГБ используют в качестве полимерного носителя при создании биосовместимых и биодegradируемых терапевтических систем для пролонгированной и направленной доставки различных лекарственных веществ [13, 20].

Как показал анализ научной литературы, поли(3-гидроксибутират) - один из наиболее изученных и широко применяемых полигидроксиалканоатов [12, 9, 21]. Способность ПЗГБ к инкапсуляции и

дальнейшему пролонгированному высвобождению различных химических веществ, в том числе обладающих фармакологической активностью, позволяет использовать его для создания лекарственных полимерных систем для контролируемого высвобождения [11, 19].

#### 1.2.4 Применение композитных материалов для формирования лекарственных носителей

Композитные материалы – это материалы, состоящие из двух и более компонентов, в качестве которых могут выступать различные полимерные материалы, как синтетического, так и природного происхождения. Формирование таких материалов необходимо для улучшения механических характеристик и физико-химических свойств составляющих их компонентов. Известны различные способы получения композитных материалов [22].

На сегодняшний день композиты нашли широкое применение во многих областях, в том числе и в биомедицине [16].

При создании нового поколения полимерных систем для пролонгированной и направленной доставки лекарственных средств, с целью улучшения механических и эксплуатационных характеристик ПЗГБ, проводят его модификацию различными способами: сополимеризация с мономерами гидроксивалерата и гидроксигексаноата [12, 8]; получая смесевые композиции с другими материалами, такими как хитозан [4], модифицированные наноалмазы [21].

#### 1.3 Получение носителей лекарственных препаратов

Для того чтобы лекарственное средство начало действовать, должна произойти его абсорбция, параметры которой зависят не только от структуры и состава препарата, но и от пути его введения [28].

В последние три десятилетия проводятся интенсивные исследования полимерных носителей для контролируемого высвобождения лекарственных

веществ. Пролонгированное введение в организм в требуемых дозах позволяет устранить многие ограничения перорального, инъекционного, аэрозольного и других способов использования традиционных лекарственных форм. Среди подобных ограничений чаще всего встречаются повышенная токсичность и нестабильность веществ, неравномерная скорость их подачи и др [29].

Современная система для доставки ЛВ чаще всего состоит из лекарственного вещества и носителя, она вводится в организм пациента с целью направленного транспорта препарата к очагу паталогического процесса и его пролонгированного действия.

Основными задачами при создании лекарственных носителей являются:

- повышение биодоступности лекарственного вещества;
- обеспечение длительного оптимального терапевтического эффекта;
- обеспечение адресной доставки ЛВ к фармакологической мишени [30].

Так же следует отметить, что важным аспектом при конструировании лекарственного носителя является выбор материала, используемого в качестве матрикса. Такой материал должен обладать рядом медико-биологических и физико-механических свойств, например, таких как биосовместимость и биодеградация [31].

Применение различных биоразрушаемых композитных материалов в качестве матрикса для депонирования препаратов позволяет варьировать скорость распада матрицы, и соответственно, управлять кинетикой выхода препарата [32].

Лекарственные носители можно классифицировать по технологии создания (монолитные, резервуарные и насосные (осмотические)) [1],

механизмам высвобождения препаратов, типам используемых матриксов в качестве носителя, фармакокинетическим и терапевтическим свойствам.

В зависимости от типа используемого матрикса и метода его получения выделяют разнообразные виды лекарственных носителей, различных по форме и размерам, такие как липосомы, мицеллы, полимерные микрочастицы и 3D-матрикса.

Современным и наиболее перспективным направлением считается получение полимерных микрочастиц на основе биосовместимых и биоразлагаемых полимеров, которое тесно связано с новейшей технологией микроинкапсулирования препаратов [33].

### 1.3.1 Получение микрочастиц для депонирования препаратов

Биоразлагаемые системы на основе микрочастиц широко используются для контролируемого высвобождения препаратов в течение нескольких дней и месяцев.

Инкапсулирование биологически активных соединений в полимерный матрикс в виде микрочастиц может быть реализовано с помощью трех основных технологий – гранулирования, распыления и эмульсификации [19].

Получение микрочастиц возможно различными методами, в том числе испарением растворителя из раствора полимеров в дихлорметане [31]. При отработке технологии получения микрочастиц в качестве носителя ЛВ можно использовать различные методы, которые позволяют варьировать соотношение полимера и лекарства, типы полимеров, молекулярный вес, скорость кристаллизации, добавки [34]. Получаемые при этом частицы различаются формой, размерами, структурой поверхности [2].

#### *Эмульсионный метод получения микрочастиц*

Для получения микрочастиц в качестве микроносителей чаще всего применяют метод двухкомпонентной эмульсии вода/масло/вода (W/O/W).

Существуют и другие разновидности данного метода, например, такие как твердое вещество/масло/вода (S/O/W) или вода/масло/масло (W/O/O).

Метод двухкомпонентной эмульсии вода/масло/вода наиболее широко применяется из-за относительной простоты процесса, возможности управления параметрами во время процесса, а так же данный метод не требует дорогостоящего оборудования, что делает его более доступным.

В данном методе водный раствор препарата диспергируют в растворе полимера, который предварительно растворяют в органическом растворителе, например как показано авторами в ряде работ [35, 43] биоразлагаемые полимеры, такие как ПГБ и ПМГК можно растворить в дихлорметане или этилацетате, тем самым получив эмульсию вода/масло. Затем полученная эмульсия диспергируется в 0,5 или 1% растворе поливинилового спирта, который выступает в качестве эмульгатора, с образованием уже непосредственно двухкомпонентной эмульсии вода/масло/вода. Микрочастицы образуются при удалении органического растворителя из данной системы. Растворитель можно удалить двумя способами: либо экстракцией растворителя, либо выпариванием растворителя.

Для получения относительно однородных микрочастиц существует модифицированный метод, с использованием мембранной эмульгации, путем вытеснения первичной эмульсии через однородные поры стеклянного мембранного фильтра во внешнюю водную фазу под давлением. Использование мембранных фильтров с порами нужного диаметра позволяет регулировать размер полученных микрочастиц.

Следует отметить, что у данного метода есть свои недостатки. При получении микрочастиц, нагруженных препаратами, следует обратить внимание на то, что при испарении растворителя из системы, часть препарата выходит в водную фазу или накапливается на поверхности микрочастиц, что значительно снижает эффективность инкапсулирования препарата.

При методе твердое вещество/масло/вода лекарственный препарат диспергируют в твердом состоянии в растворе полимера с образованием первичной эмульсии. Затем твердую дисперсию вводят в раствор поливинилового спирта. При использовании данного метода затруднен процесс микронизации. Разрабатывают различные модификации данного метода, которые позволяют получить микрочастицы, с максимально высокой эффективностью инкапсулирования препаратов.

Еще одной разновидностью эмульсионного метода является метод коацервации. Данный метод представляет собой четырехступенчатый процесс, при котором первичную эмульсию помещают в вещество (нерастворитель), в котором при перемешивании полимер подвергается фазовому разделению с образованием коацерватной фазы. На следующем этапе добавляют упрочняющий агент, например гексан, который связывается с масляной фазой, затем происходит экстракция растворителя. В результате при использовании данного метода образуются плотноупакованные микрочастицы, содержащие внутри себя препарат [36].

#### *Метод распылительного высушивания*

Сущность метода распылительного высушивания заключается в быстром удалении растворителя, которое вызывает ускоренное формирование плотных гладких частиц [37]. В основе метода лежит распыление раствора полимера в специальной установке, при заранее заданных параметрах. Для проведения распылительного высушивания необходимо включить подачу газа в рабочую камеру и нагрев сушильного агента (воздух, газ), и только после стабилизации температуры можно начинать подачу раствора. Распыление раствора производится форсунками и центробежными дисками. Высушиваемый продукт с помощью форсунок рассеивается, затем попадая в рабочую камеру, он контактирует с сушильным агентом. При интенсивном массо- и теплообмене частицы высушиваемого продукта теряют влагу за короткий промежуток времени.



Высушенные частицы под действием силы тяжести оседают на дно циклонов рабочей камеры [38].

В работе [38] изучено влияние параметров процесса высушивания на свойства полученных микрочастиц на основе мальтодекстрина и гуммарабика, с инкапсулированным в них ибупрофеном.

Следует отметить, что при получении микрочастиц методом распылительного высушивания, изменение параметров рабочей установки, таких как, температура на входе в рабочую камеру и скорость подачи эмульсии позволяет на выходе получать микрочастицы разного диаметра. Так же при использовании данного метода на выход микрочастиц и их средний диаметр оказывает большое влияние молекулярная масса исходного полимера[37]. В сравнение с эмульсионным методом, использование данного метода позволяет минимизировать потери ЛВ, и повысить эффективность инкапсулирования препарата в микрочастицы, так как при распылении эмульсии происходит полное испарение растворителя и молекулы препарата либо включаются во внутреннюю полость микрочастиц, либо адсорбируются на их поверхности [11, 37].

Анализ научной литературы показал, что данный метод не получил должного внимания, и практически не используется для получения микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов, возможно, в связи с тем, что возникают трудности, связанные с необходимостью использовать полимер с молекулярной массой не более 100 кДа. В лаборатории новых биоматериалов Института Фундаментальной Биологии и Биотехнологии успешно отработаны условия получения микрочастиц, на основе ПЗГБ на распылительной установке [11], а так же показано влияние параметров установки на средний диаметр и дзета – потенциал микрочастиц [3,37].

Следует отметить, что работы, связанные с получением микрочастиц на основе ПЗГБ и на основе композитных материалов данным методом, с последующим нагружением лекарственными препаратами разного спектра действия в литературе не встречаются.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения носителей лекарственных препаратов на основе композитных материалов были использованы биоразлагаемый полимер природного происхождения – поли(3-гидроксibuтират) и биоразлагаемые синтетические полимеры: полиэтиленгликоль и поли(молочно –гликолиевая кислота) в разных процентных соотношениях.

### 2.1 Характеристика ПЗГБ

Поли(3-гидроксibuтират) (ПЗГБ) – это полиэфир гидроксимасляной кислоты, синтезируемый бактериями, один из первых среди выделенных и наиболее полно к настоящему моменту охарактеризованных полигидроксиалконоатов. ПЗГБ представляет собой бесцветное полукристаллическое гидрофобное вещество [22].

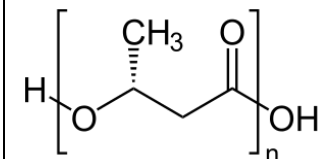
Образцы полимера были получены на базе Лаборатории новых биоматериалов Института Фундаментальной Биологии и Биотехнологии. Для получения использовали штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646, депонированный в ВКПМ.

Посевной материал исследуемого штамма получали ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Далее музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде в стеклянных колбах объемом 0.5 л при коэффициенте заполнения 0.4 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 °С и 200 rpm. Для выращивания бактерий использовали среду Шлегеля:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9.1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.025;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1 (г/л). Микроэлементы вводили по прописи Хогланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л. среды. Стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,288;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,08;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –

0,176;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,050;  $\text{NiCl}_2$  – 0,008 (г/л). . В качестве углеродного субстрата использовали фруктозу, поддерживая ее концентрацию в среде на уровне 10-13 г/л. Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Концентрацию фруктозы в среде определяли резорциновым методом. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A (США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_v$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $\text{ПД} = M_v/M_n$ ).

Полученные образцы полимера имели характеристики, представленные в таблице 1.

Таблица 2.1.1 - Характеристика поли(3-гидроксибутирата), используемого для получения носителей лекарственных препаратов

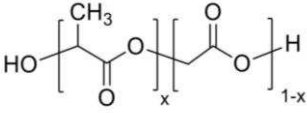
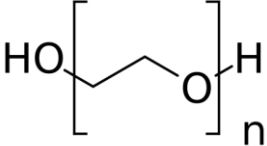
Название	Формула	мол. масса (kDa)	кристалличность (%)	$T_{\text{пл}}$ (°C)
поли(3- гидроксибутират) <b>(ПЗГБ)</b> $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$		50-70	72	168

В таблице 2.1.1 представлена характеристика низкомолекулярного гомополимера поли(3-гидроксибутирата) (ПЗГБ), который используется в работе для получения полимерных лекарственных носителей в композиции с синтетическими полимерами, которые охарактеризованы ниже.

## 2.2 Синтетические полимеры

Для получения композитных лекарственных носителей совместно с ПЗГБ так же были использованы синтетические биоразлагаемые полимеры, основные характеристики которых представлены в таблице 2.

Таблица 2.2.1 - Характеристика полимеров, используемых для создания композитных материалов с ПЗГБ

Название	Формула	мол.масса (kDa)	Производитель
Поли(молочно-гликолевая кислота) (ПМГК)		19	«ACROS», Германия
Полиэтиленгликоль (ПЭГ)		35	«SIGMA», США

## 2.3 Лекарственные препараты

Для депонирования в полимерные микрочастицы были выбраны препараты разного фармакологического действия: противотуберкулезный препарат – рифампицин, антибактериальный препарат широкого спектра действия – цефтриаксон и цитостатический противоопухолевый препарат – 5-фторурацил.

**Рифампицин** – полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, обладающий противотуберкулезной активностью, подавляет действие ДНК-зависимой РНК-полимеразы у микобактерий туберкулеза. Препарат обладает высокой гепатотоксичностью и является мощным индуктором цитохрома Р-450 [44].

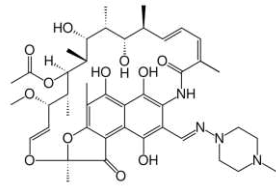
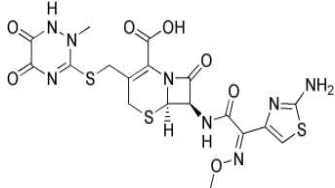
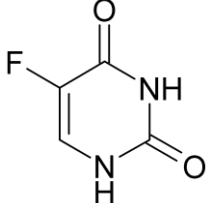
**Цефтриаксон** – антибиотик широкого спектра действия группы цефалоспорины III ( $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$ ). Цефтриаксон угнетает транспептидазу, нарушает биосинтез мукопептида клеточной стенки бактерий. Имеет

широкий спектр действия (бактерицидное), стабилен в присутствии большинства бета-лактамаз [1].

**5-Фторурацил** – цитостатический противоопухолевый препарат, ингибирует процесс деления клеток путём блокирования синтеза ДНК (вследствие угнетения активности фермента тимидилатсинтетазы) и образования структурно несовершенной РНК [39].

Основные характеристики лекарственных препаратов представлены в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 – Лекарственные препараты, депонированные в микрочастицы

название препарата	Формула	растворимость в воде	мол.масса (кDa)	Производитель
Рифампицин		практически нерастворим в воде	823	ЗАО «БРЫНЦАЛОВ-А», Россия
Цефтриаксон		50 мг/мл	661,6	ОАО «СИНТЕЗ», Россия
5-фторурацил		Малорастворим	130,08	«SIGMA», Китай

#### 2.4 Методы получения микрочастиц

Для получения микрочастиц предварительно подготовили растворы полимеров и лекарственных веществ в дихлорметане. Для этого смесь полимеров ПГБ/ПЭГ или ПГБ/ПМГК с разным процентным соотношением 25:75, 50:50 и 75:25 растворяли в дихлорметане в соотношении 10:1, (100 мг

полимера в 10 мл дихлорметана при получении микрочастиц эмульсионным методом).

Для нагружения микрочастиц лекарственными препаратами была выбрана концентрация – 10 % от массы полимера. При нагружении цефтриаксоном, предварительно подготовили его водный раствор, для этого 10 мг препарата растворили в 0,5 мл дистиллированной воды, затем гомогенизировали эмульсию с помощью ультразвука "Sonicator -S3000". В случае с 5-Фторурацилом, 10 мг препарата предварительно растворяли в 1 мл метанола, затем переносили в раствор полимеров. Для нагружения микрочастиц рифампицином, 12,45 мг препарата (10 мг активного вещества) добавляли непосредственно в раствор полимеров.

#### 2.4.1 Получение микрочастиц эмульсионным методом

При получении микрочастиц эмульсионным методом использовали метод двухкомпонентной "вода-масло". Заранее приготовленный раствор (полимер/дихлорметан) в соотношении 100/10 вносили в 100 мл 0,5 % раствора поливинилового спирта (ПВС) и перемешивали с помощью высокоскоростного гомогенизатора (*Heidolph*, Германия) в течение 5 минут, на скорости 24000 об/мин. Затем полученную эмульсию (вода/масло) механически перемешивали с определенной скоростью ( ~ 650 об/мин) на магнитной мешалке до полного испарения растворителя в течение суток.

Полученные микрочастицы собирали центрифугированием (11000 об/мин), промывали 4 раза дистиллированной водой и лиофильно высушивали.

Для получения микрочастиц, нагруженных рифампицином использовали метод двухкомпонентной «вода-масло» эмульсии. Для этого в раствор полимер/дихлорметан в соотношении 100/10 добавляли 12,45 мг рифампицина, затем полученную суспензию переносили в 100 мл 0,5 % раствора ПВС при постоянном перемешивании с помощью высокоскоростного гомогенизатора (*Heidolph*, Германия), после чего

оставляли эмульсию перемешиваться еще в течение 5 минут, на скорости 24000 об/мин. После этого полученную эмульсию (вода/масло) механически перемешивали с определенной скоростью ( ~ 650 об/мин) на магнитной мешалке до полного испарения растворителя в течение суток.

Полученные микрочастицы собирали центрифугированием (11000 об/мин), промывали 4 раза дистиллированной водой и лиофильно высушивали. При сборе микрочастиц, оставшийся супернатант отбирали для дальнейшего определения в нем остаточной концентрации препарата и оценки эффективности инкапсулирования препарата в микрочастицы.

При получении микрочастиц, нагруженных цефтриаксоном и 5-фторурацилом использовали метод трехкомпонентной «вода-масло-вода» эмульсии. Для этого в раствор полимер/дихлорметан в соотношении 100/10 добавили 0,5 мл водного раствора цефтриаксона. В случае с 5-фторурацилом в раствор полимер/дихлорметан добавляли 1 мл метанола с растворенным в нем препаратом. Затем полученную суспензию вносили в 100 мл 0,5% раствора ПВС, при постоянном перемешивании с помощью высокоскоростного гомогенизатора (*Heidolph*, Германия), после чего оставляли суспензию перемешиваться еще в течение 5 минут, на скорости 24000 об/мин. После этого, полученную эмульсию механически перемешивали с определенной скоростью ( ~ 650 об/мин) на магнитной мешалке до полного испарения растворителя в течение суток.

Полученные микрочастицы собирали центрифугированием (11000 об/мин), промывали 4 раза дистиллированной водой и лиофильно высушивали.

При сборе микрочастиц, оставшийся супернатант отбирали для дальнейшего определения в нем остаточной концентрации препарата и оценки эффективности инкапсулирования препарата в микрочастицы.

#### 2.4.2 Получение микрочастиц методом распылительного высушивания

Для получения микрочастиц методом распылительного высушивания использовали лабораторную установку «Mini Spray Dryer B-290» (*Buchi, Швейцария*).

Микрочастицы получали согласно рекомендуемой методике производителя [40] при заданных параметрах. Величина аспиратора (поток газа в системе) была максимальной и составила 100 %, скорость подачи раствора – 1,5 мл/мин, температура на входе в систему составила 75 °С.

Для получения микрочастиц, содержащих лекарственные препараты, параметры установки были аналогичными.

Для получения микрочастиц 400 мг чистого ПЗГБ, или композицию полимеров ПЗГБ/ПЭГ в соотношении 50:50, ПЗГБ/ПМГК – 25:75 растворяли в 40 мл дихлорметана, затем добавляли предварительно подготовленный раствор лекарственного вещества (0,5 мл водного раствора 40 мг цефтриаксона, 40 мг 5-фторурацила, растворенного в 1 мл метанола), полученную суспензию с помощью ультразвука "Sonicator -S3000" доводили до гомогенного состояния. В случае с рифампицином 49,8 мг (40 мг активного вещества) чистого препарата добавляли непосредственно в раствор полимера. Далее полученную суспензию полимер/ЛВ/дихлорметан пропускали через распылительную сушилку.

#### 2.5 Изучение характеристик микрочастиц

Выход микрочастиц рассчитывали по формуле (1), в процентах от исходной массы полимер

$$B = \frac{M_{\text{ч}}}{M_{\text{п}}} * 100\%, \quad (1)$$

где  $M_{\text{ч}}$  – масса микрочастиц, мг;

$M_{\text{п}}$  – исходная масса полимера, мг.

Средний диаметр и размерное распределение микрочастиц определяли на анализаторе частиц *ZetasizerNano ZS (Malvern, Великобритания)*, с использованием метода динамического светорассеивания.



Для изучения стабильности микрочастиц были проведены измерения дзета – потенциала, т.к. данная величина определяет степень и характер электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами дисперсионной системы, а так же является одним из определяющих параметров, влияющих на стабильность этой системы [45]. Дзета-потенциал (поверхностный заряд) микрочастиц определяли с помощью анализатора частиц *Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания)*.

Морфологические характеристики композитных микрочастиц, нагруженных препаратами изучали по СЭМ-изображениям, полученным с применением сканирующей электронной микроскопии на микроскопе *S-5500 (Hitachi, Япония)*. Напыление образцов платиной проводили в установке *K575XD Turbo (Emitech, Англия)*.

Для определения эффективности инкапсулирования препарата в микрочастицы, полученные эмульсионным методом, остаточную концентрацию препарата измеряли в супернатанте.

Для определения ЭИ препаратов в микрочастицы, полученные на распылительной сушилке 3 мг микрочастиц растворяли в 3 мл дихлорметана и помещали раствор на сутки на шейкер. Для диффузии гидрофильных препаратов (цефтриаксон и 5-фторурацил) к раствору добавляли 3 мл дионизированной воды.

Концентрацию препаратов определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра «*Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies*».

Расчеты проводили по формуле (2), с учетом исходной и остаточной концентрации препарата в эмульсии.

$$\text{ЭИ} = \frac{M_{\text{исх}} - M_{\text{ост}}}{M_{\text{исх}}} * 100\%, \quad (2)$$

где  $M_{\text{исх}}$  – исходная масса препарата, мг;

$M_{\text{ост}}$  – масса препарата, не включенного в микрочастицы, мг.

## 2.6 Исследование оттока лекарственных препаратов из композитных микрочастиц *in vitro*

Микрочастицы, нагруженные лекарственными препаратами предварительно стерилизовали УФ-излучением в течение 60 минут.

Для исследования кинетики оттока препаратов в стерильные пробирки, содержащие 10 мл стерильного сбалансированного фосфатно-солевого буфера (СФБ) помещали по 10 мг микрочастиц, с 10 %-ным содержанием препарата.

Эксперимент проводили в трех повторностях, в течение 14 суток. Пробирки с образцами экспонировались в термостате при температуре 37 °С.

Содержание лекарственных препаратов в модельной среде (СФБ) определяли спектрофотометрированием с помощью спектрофотометра «Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies», при определенной длине волны, которая является оптимальной для каждого препарата (5-фторурацил – 270 нм; цефтриаксон – 240 нм; рифампицин – 475 нм).

Соответствие оптической плотности и количества препарата диффундированного в модельную среду определяли с помощью калибровочного графика.

## 2.7 Оценка лекарственной эффективности микрочастиц, нагруженных ЛВ на примере модельных микроорганизмов *Escherichia coli*.

Исследование лекарственной эффективности полимерных микрочастиц, нагруженных цефтриаксоном и рифампицином проводили диско-диффузионным методом, в модельной культуре грамотрицательных микроорганизмов *Escherichia coli*.

Данный метод основан на диффузии препарата из полимерного носителя в плотную питательную среду в результате чего возникает ингибирование роста культуры и образование зоны лизиса. В качестве контрольного образца был использован коммерческий диск (с содержанием препарата 0,005 мг для рифампицина, и 0,03 мг для цефтриаксона). Для

проведения оценки лекарственной эффективности были подготовлены суспензии микрочастиц, нагруженных ЛВ в физиологическом растворе в объеме 300 мкл.

Для проведения исследования питательную среду Мюллер-Хинтона (Biorad, Франция) растворили в дистиллированной воде согласно инструкции, подготовили для стерилизации. Автоклавирование питательной среды и чашек Петри проводили при 1 А и 121 °С в течение 30 минут. После автоклавирования чашки Петри поместили в стерильный ламинарный шкаф для розлива и застывания питательной среды. В каждую чашку Петри вносили по 25 мл расплавленной питательной среды, так чтобы после застывания образовался слой около 4 мм. Для посева подготовили инокулят, содержащий порядка  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл, соответствующий стандарту мутности по МакФарланду. Инокуляцию на застывший агаризованный слой проводили с помощью стерильных ватных тампонов, равномерными штриховыми движениями, поворачивая чашку Петри под углом 90°. Через 15 минут в середине чашки Петри вырезали лунки в агаре диаметром 0,5 см, куда вносили суспензию микрочастиц. Аппликацию контрольных дисков проводили стерильным пинцетом в середину чашки Петри на поверхность агара. По окончании чашки Петри помещали в термостат, где инкубировали при 37 °С в течение суток. По истечению времени проводили замеры зон лизиса и оценивали лекарственную эффективность носителей.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследований с применением метода распылительного высушивания и эмульсионного метода были получены микрочастицы на основе ПЗГБ в композиции с синтетическими биоразлагаемыми полимерами ПЗГБ/ПЭГ и ПЗГБ/ПМГК в процентном соотношении 25:75, 50:50 и 75:25 соответственно.

#### 3.1 Характеристика композитных микрочастиц

Изучены и проанализированы свойства полученных микрочастиц, такие как средний диаметр, дзета-потенциал и показатель полидисперсности.

Таблица 3.1.1 – Выход микрочастиц на основе композитных материалов

полимер	соотношение (%)	выход микрочастиц, (%)	
		эмульсионный метод	метод распылительного высушивания
ПЗГБ	-	48	19
ПЗГБ/ ПЭГ	25:75	15	44,5
	50:50	39	51
	75:25	36	43
ПЗГБ/ ПМГК	25:75	56,3	37,5
	50:50	75	10
	75:25	77	65

Как показано в таблице, на выход микрочастиц оказывает влияние метод получения и состав полимерной композиции. Например, для микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ при получении микрочастиц эмульсионным методом процентный выход микрочастиц оказался выше, чем у микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания. В случае микрочастиц, на основе ПЗГБ/ПМГК наоборот, при получении микрочастиц эмульсионным методом процентный выход оказался ниже, чем при получении микрочастиц на распылительной сушилке. Так максимальный

процентный выход микрочастиц наблюдался для композиции ПЗГБ/ПЭГ при соотношении 50:50, а в случае с ПЗГБ/ПМГК при соотношении 75:25.

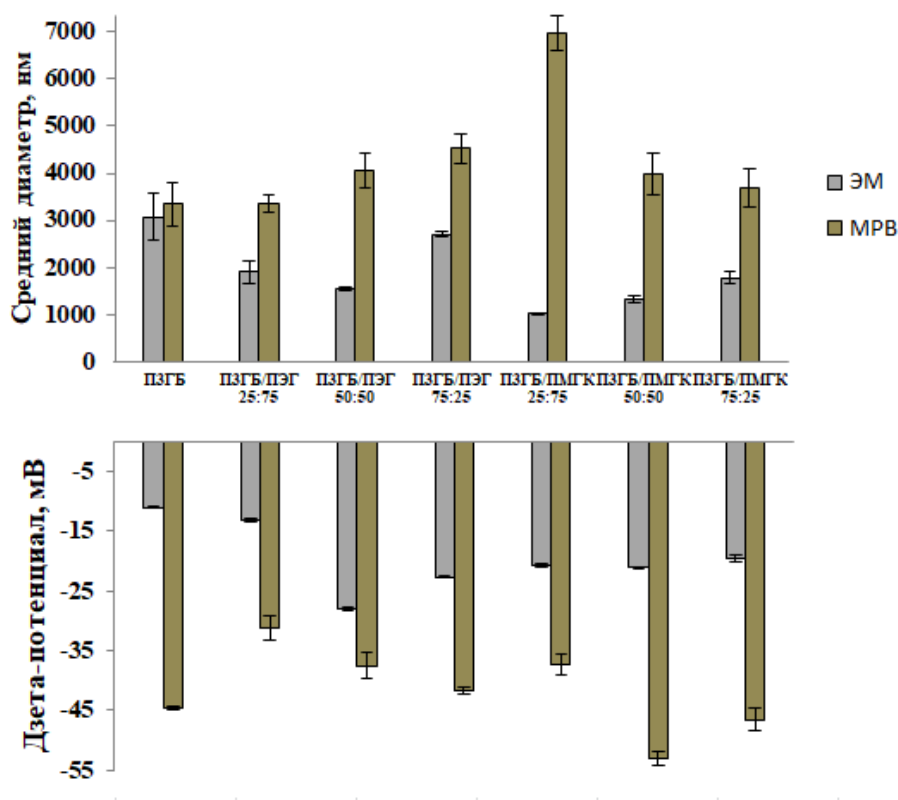


Рисунок – 3.1.1 Средний диаметр и дзета-потенциал композитных микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания (МРВ) и эмульсионным методом (ЭМ)

Значения дзета-потенциала микрочастиц изменялись в зависимости от метода получения и так же от процентного соотношения полимеров в композиции. Так, минимальное значение дзета-потенциала характерно для микрочастиц на основе ПЗГБ/ПМГК (50:50), полученных методом распылительного высушивания и составляет  $-53,0 \pm 1,1$  мВт. Показано существенное влияние метода изготовления на значения среднего диаметра микрочастиц. Образцы, полученные методом распылительного высушивания, имеют более крупный размер, в сравнении с образцами, которые были получены эмульсионным методом. Так например, для микрочастиц на основе ПЗГБ/ПМГК в соотношении 25:75, полученных эмульсионным методом

средний диаметр составил  $1030 \pm 29,3$  нм, при получении методом распылительного высушивания –  $6966 \pm 358,2$  нм.

На основании проведенного анализа свойств и характеристик полученных микрочастиц, для нагружения лекарственными препаратами и дальнейшего исследования были выбраны образцы на основе композиции полимеров ПЗГБ/ПЭГ в процентном соотношении 50:50 и на основе ПЗГБ/ПМГК в соотношении 25:75. Данные микрочастицы имели высокий процентный выход, при изготовлении эмульсионным методом 39 % и 56,3 % соответственно, при использовании метода распылительного высушивания процентный выход микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ составил 51 %, для микрочастиц на основе ПЗГБ/ПМГК – 37,5 %.

### 3.2 Характеристика композитных микрочастиц, нагруженных лекарственными препаратами

Методом распылительного высушивания и эмульсионным методом получена серия микрочастиц на основе ПЗГБ, ПЗГБ/ПМГК (75:25) и ПЗГБ/ПЭГ (50:50), нагруженных рифампицином, цефтриаксоном и 5-фторурацилом. Процентное соотношение полимеров в композиции обусловлено полученными ранее результатами, описанными в пункте 3.1.

На рисунках 3.2.1 – 3.2.3 представлены микрочастицы с 10%-ным содержанием лекарственных препаратов. Не зависимо от выбранного лекарственного препарата, полученные микрочастицы гетерогенны по размерам, и имеют сферическую форму.

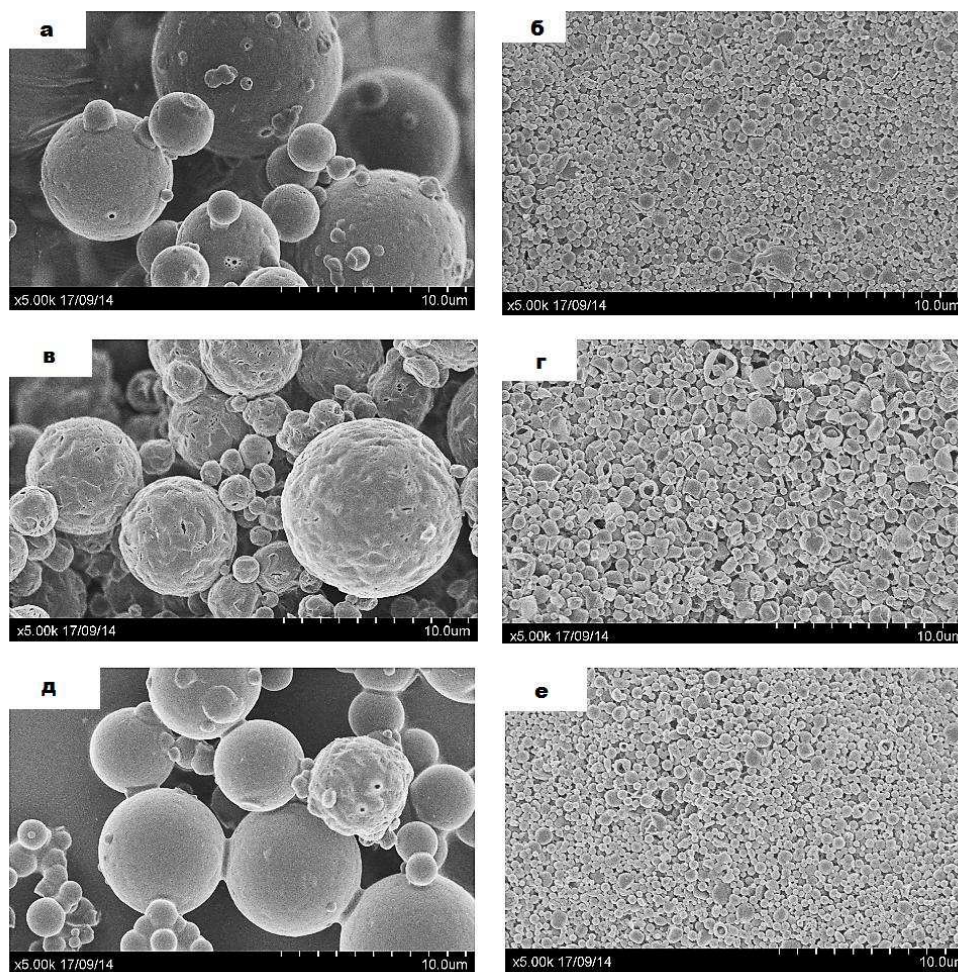


Рисунок 3.2.1 – СЭМ-снимки микрочастиц, нагруженных цефтриаксоном (а,б –ПЗГБ, в,г – ПЗГБ/ПЭГ, д,е – ПЗГБ/ПМГК; а,в,д – метод распылительного высушивания, б,г,е – эмульсионный метод).

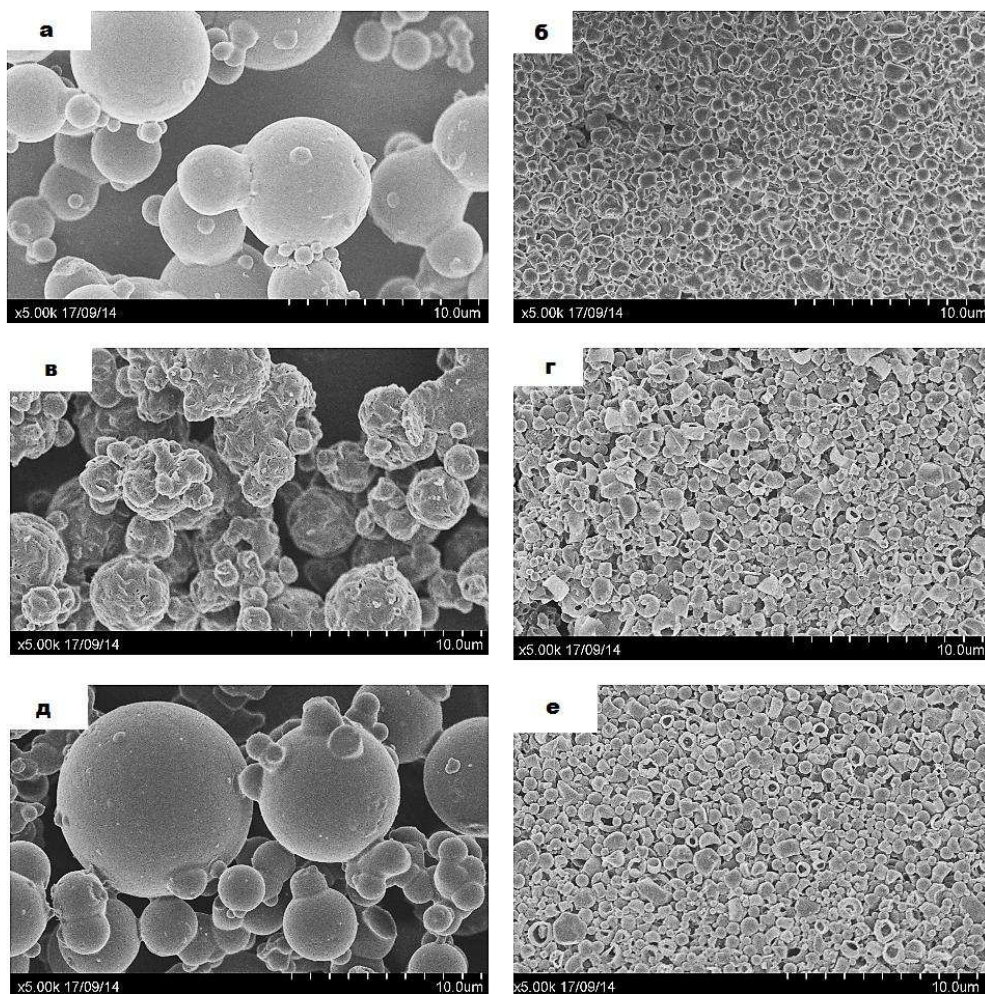


Рисунок 3.2.2 – СЭМ-снимки микрочастиц, нагруженных рифампицином (а,б –ПЗГБ, в,г – ПЗГБ/ПЭГ, д,е – ПЗГБ/ПМГК; а,в,д – метод распылительного высушивания, б,г,е – эмульсионный метод).

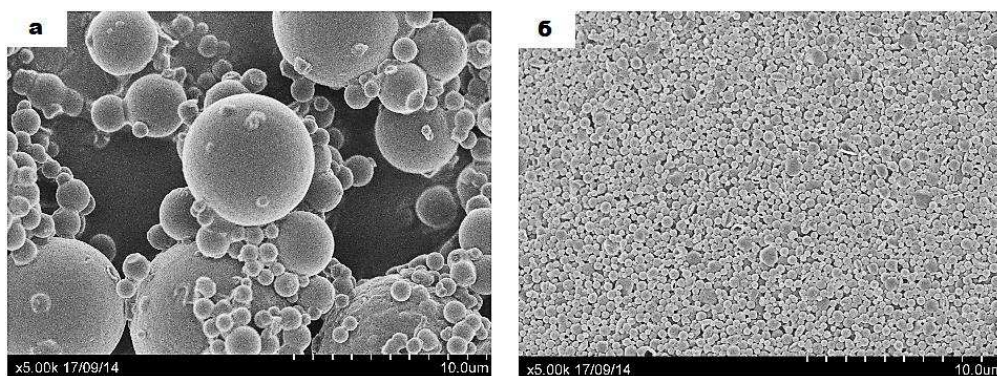


Рисунок 3.2.3 – СЭМ-снимки микрочастиц на основе ПЗГБ/ПМГК, нагруженных 5-фторурацилом (а – метод распылительного высушивания, б– эмульсионный метод).



Как показано при измерении среднего диаметра (табл 3.1.1), в зависимости от метода получения значительно отличается размер микрочастиц. Как мы можем видеть на рисунках, образцы, полученные методом распылительного высушивания, имеют более крупный размер, в сравнении с образцами, которые были получены эмульсионным методом.

Так же, на рисунках 3.2.1-в и 3.2.2-в, видно, как добавление ПЭГ в композицию с ПЗГБ оказывает влияние на структуру поверхности микрочастиц, делает ее более шероховатой и пористой.

Изучены и проанализированы свойства полученных микрочастиц, такие как средний диаметр, дзета-потенциал и показатель полидисперсности, рассчитан процентный выход микрочастиц, полученные результаты представлены ниже.

Таблица 3.2.1 – Выход композитных микрочастиц, нагруженных лекарственными препаратами

Препарат	соотношение полимеров	выход микрочастиц, (%)	
		эмульсионный метод	метод распылительного высушивания
ЦЕФ	ПЗГБ	71	85,7
	ПЗГБ/ПЭГ 50:50	56	65
	ПЗГБ/ПЛГА 75:25	77	64,5
РФП	ПЗГБ	87	70
	ПЗГБ/ПЭГ 50:50	62	68
	ПЗГБ/ПЛГА 75:25	63	69
5-ФТУ	ПЗГБ	74	77
	ПЗГБ/ПЭГ 50:50	48	58
	ПЗГБ/ПЛГА 75:25	72	91

Как видно из таблицы 3.2.1, выход микрочастиц зависит от состава полимерной композиции, наименьший выход характерен для микрочастиц

на основе ПЗГБ/ПЭГ, независимо от включаемого препарата, это может быть обусловлено гидрофильностью полиэтиленгликоля.

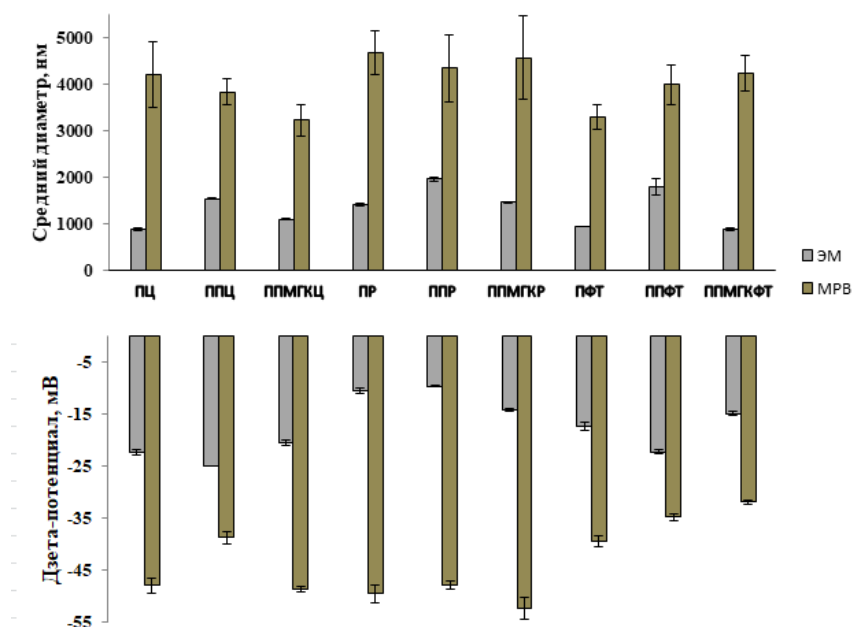


Рисунок 3.2.1 – Средний диаметр и дзета-потенциал композитных микрочастиц, нагруженных лекарственными препаратами (ПЦ – ПЗГБ/цефтриаксон, ППЦ – ПЗГБ/ПЭГ/цефтриаксон, ППМГКЦ – ПЗГБ/ПМГК/цефтриаксон; ПР – ПЗГБ/рифампицин, ППР – ПЗГБ/ПЭГ/рифампицин, ППМГКР – ПЗГБ/ПМГК/рифампицин; ПФТ – ПЗГБ/5-фторурацил, ППФТ – ПЗГБ/ПЭГ/5-фторурацил, ППМГКФТ – ПЗГБ/ПМГК/5-фторурацил).

Как видно на рисунке 3.2.1 на изменение среднего диаметра и дзета – потенциала микрочастиц, нагруженных ЛВ, оказывает влияние состав полимерной композиции, инкапсулированный препарат и метод получения. Так, например, значения среднего диаметра для микрочастиц, нагруженных рифампицином, независимо от метода получения и полимерного состава, оказались самыми высокими. Показано, что при изготовлении методом распылительного высушивания средний диаметр микрочастиц на основе ПЗГБ, нагруженных рифампицином составил  $4680 \pm 478,9$  нм, при использовании эмульсионного метода при получении микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ, нагруженных рифампицином –  $1966 \pm 33,5$  нм.

Если провести сравнительный анализ всех характеристик, приведенных выше, то можно увидеть, что метод получения оказывает влияние на поверхностный заряд микрочастиц и средний диаметр. Так микрочастицы, полученные методом распылительного высушивания, имеют более низкие значения дзета-потенциала, и более крупный размер.

С использованием спектрофотометра, были проведены измерения оптической плотности супернатанта и в дальнейшем по формуле (2) рассчитана эффективность инкапсулирования (ЭИ) лекарственных препаратов в композитные микрочастицы, данные представлены в таблице 3.2.2. Независимо от полимерного состава микрочастиц и химической природы, включаемого препарата, процент включения в микрочастицы, полученные методом распылительного высушивания, во всех случаях оказался выше, это может быть обусловлено адсорбцией молекул препарата на поверхности микрочастиц, при распылительном высушивании, а так же вымыванием препаратов вовремя перемешивания эмульсии, при изготовлении микрочастиц эмульсионным методом.

Таблица 3.2.2 – Эффективность инкапсулирования ЛВ в композитные микрочастицы

Препарат	соотношение полимеров	ЭИ, %	
		ЭМ	МРВ
ЦЕФ	ПЗГБ	26	50,6
	ПЗГБ/ПЭГ 50:50	30,5	47
	ПЗГБ/ПЛГА 75:25	30,7	65,1
РФП	ПЗГБ	13	34,8
	ПЗГБ/ПЭГ 50:50	5,45	28,9
	ПЗГБ/ПЛГА 75:25	2,85	12,5
5-ФТУ	ПЗГБ	29,5	42,1
	ПЗГБ/ПЭГ 50:50	23,03	54,3
	ПЗГБ/ПЛГА 75:25	39	65,7

### 3.3 Исследование оттока лекарственных препаратов из композитных микрочастиц *in vitro*

Исследована кинетика высвобождения включенных препаратов в модельной среде (СФБ, рН 7,4).

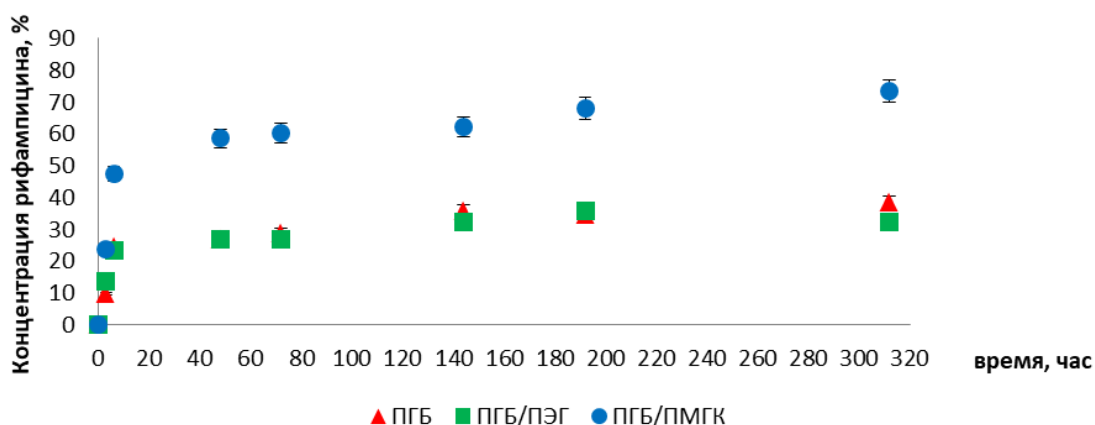


Рисунок 3.3.1 – Кривые высвобождения рифампицина из микрочастиц, полученных эмульсионным методом

Как показано на рисунке 3.3.1 диффузия препарата из микрочастиц в течение эксперимента проходила равномерно. Резкое повышение концентрации препарата в среде наблюдалось через 6 часов после начала эксперимента, в последующие часы изменения концентрации были незначительными. Лучше всего препарат выходил из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПМГК, суммарный выход к концу эксперимента составил  $73,41 \pm 3,67$  %. Менее интенсивный отток препарата наблюдался из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПЭГ, суммарный выход составил  $38,69 \pm 1,93$  % и  $32,37 \pm 1,62$  % соответственно.

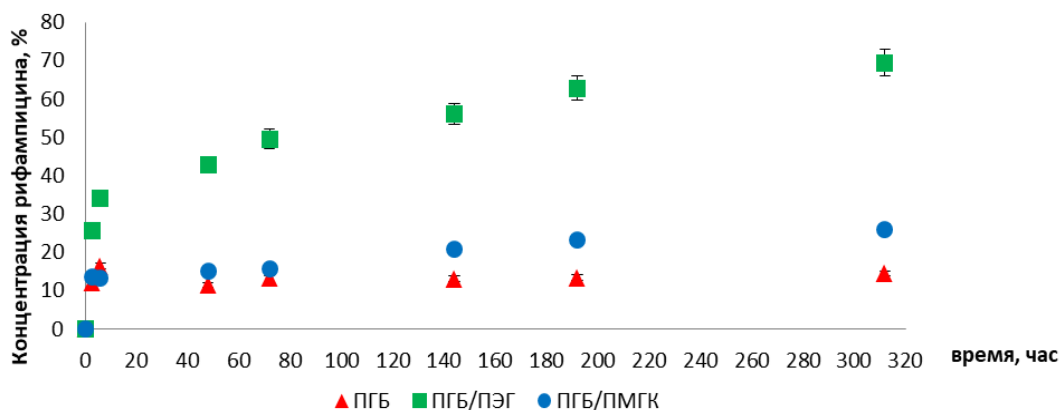


Рисунок 3.3.2 – Кривые высвобождения рифампицина из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания

Кривые высвобождения рифампицина имеют одинаковый характер, резкое повышение концентрации препарата в среде для всех композиций наблюдался через 6 часов после начала эксперимента (рисунок 3.3.2), в дальнейшем концентрация препарата изменялась незначительно. Максимальный выход наблюдался для микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ, к концу эксперимента суммарный выход препарата составил  $69,46 \pm 3,47 \%$ .

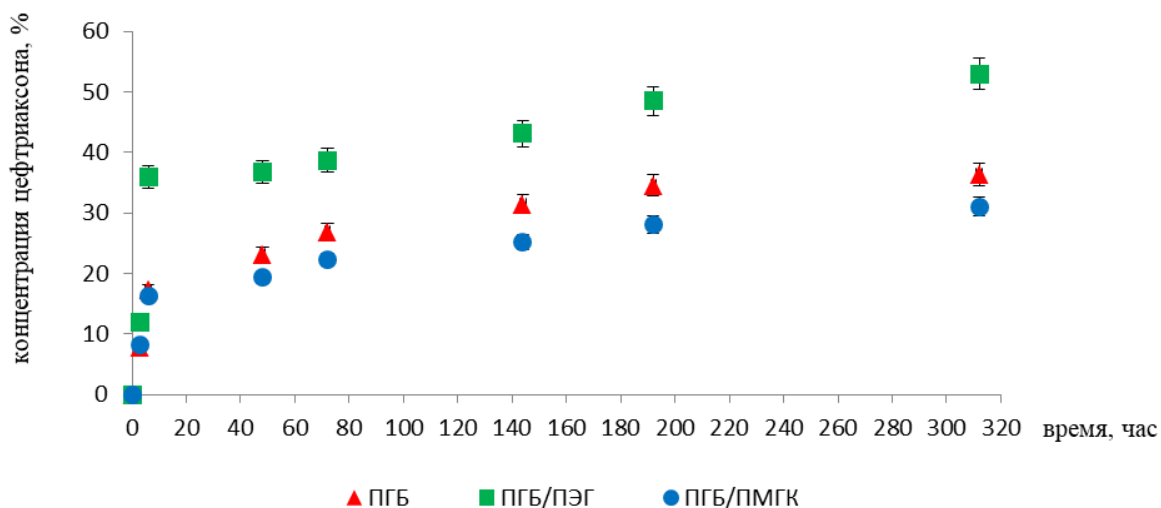


Рисунок 3.3.3 – Кривые высвобождения цефтриаксона из микрочастиц, полученных эмульсионным методом

На рисунке 3.3.3 представлены кривые высвобождения антибактериального препарата цефтриаксон из полимерных микрочастиц в модельную среду *in vitro*. Резкое повышение концентрации препарата в среде наблюдается в первые сутки, независимо от полимерного состава

микрочастиц. Лучше всего препарат высвобождался из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ, к концу эксперимента суммарная концентрация препарата в среде составила  $52,95 \pm 2,76$  %. Из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ в композиции с ПМГК препарат выходил практически в равной концентрации, суммарный выход составил  $36,32 \pm 1,82$  % и  $31,03 \pm 1,55$  % соответственно.

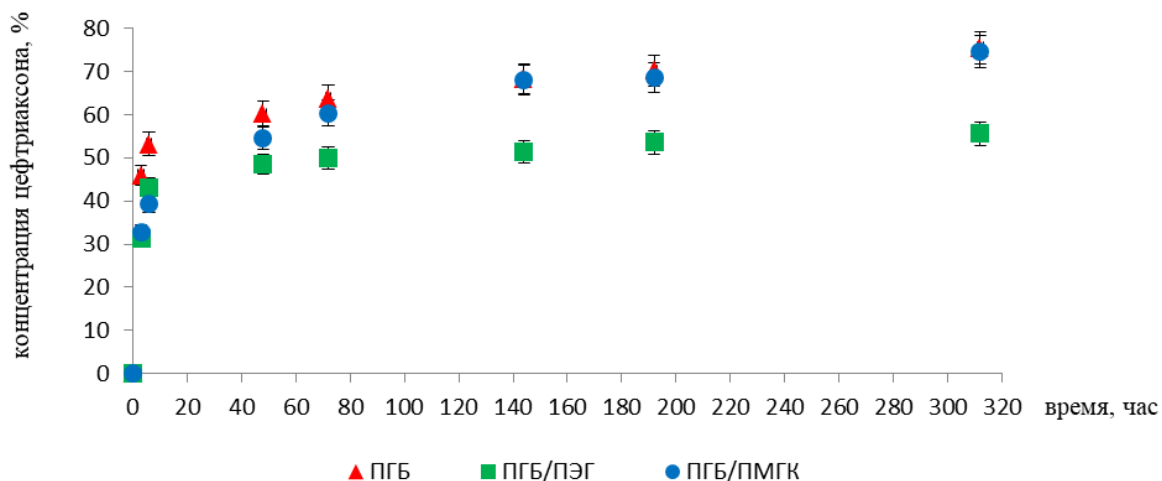


Рисунок 3.3.4 – Кривые высвобождения цефтриаксона из микрочастиц, Полученных методом распылительного высушивания

Как показано на рисунке 3.3.4 кривые высвобождения цефтриаксона в модельную среду имеет одинаковый равномерный характер и спустя 48 часов с начала эксперимента выходят на плато. Следует отметить, что из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПМГК, полученных методом распылительного высушивания препарат выходил в раной концентрации независимо от полимерного состава микрочастиц. Так, суммарный выход цефтриаксона к концу эксперимента для микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПМГК составил  $75,43 \pm 3,77$  % и  $74,61 \pm 3,63$  % соответственно.

Следует отметить, что отток цефтриаксона из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ, полученных эмульсионным методом, происходил значительно быстрее, чем из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПМГК. При получении микрочастиц методом распылительного высушивания наоборот, из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ препарат диффундировал в модельную среду медленнее, чем из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПМГК, к концу эксперимента выход препарата в модельную среду составил  $55,54 \pm 2,7$  %.

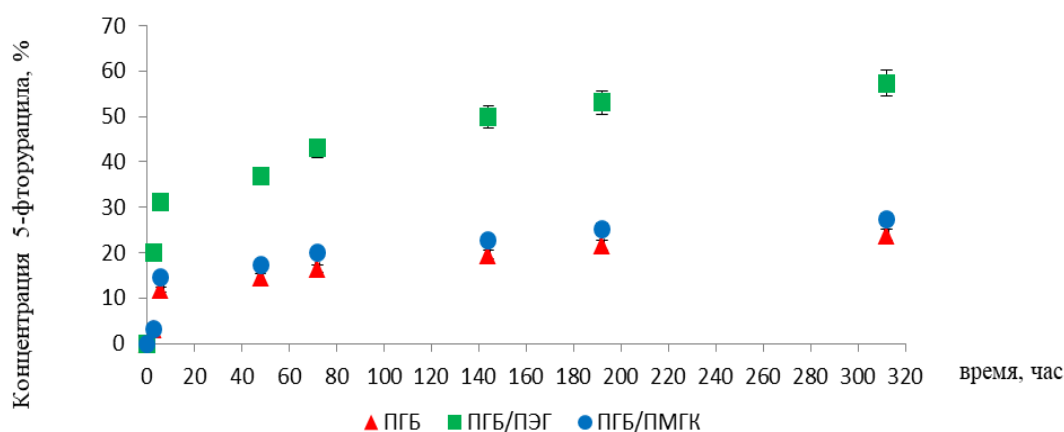


Рисунок 3.3.5 – Кривые высвобождения 5-фторурацила из микрочастиц, полученных эмульсионным методом

Противоопухолевый цитостатический препарат 5-фторурацил в течение всего эксперимента диффундировал в модельную среду равномерно (показано на рисунке 3.3.5). Резкое повышение концентрации препарата в среде наблюдается спустя 6 часов с начала эксперимента, в дальнейшем изменения концентрации незначительны, кривые выходят на плато. Максимальный выход препарата наблюдался из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ и к концу эксперимента составил  $57,27 \pm 2,86$  %. Для микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПМГК, как и в случае с цефтриаксоном, наблюдался равномерный отток препарата в модельную среду, он составил  $23,87 \pm 1,2$  % и  $27,38 \pm 1,4$  % соответственно.

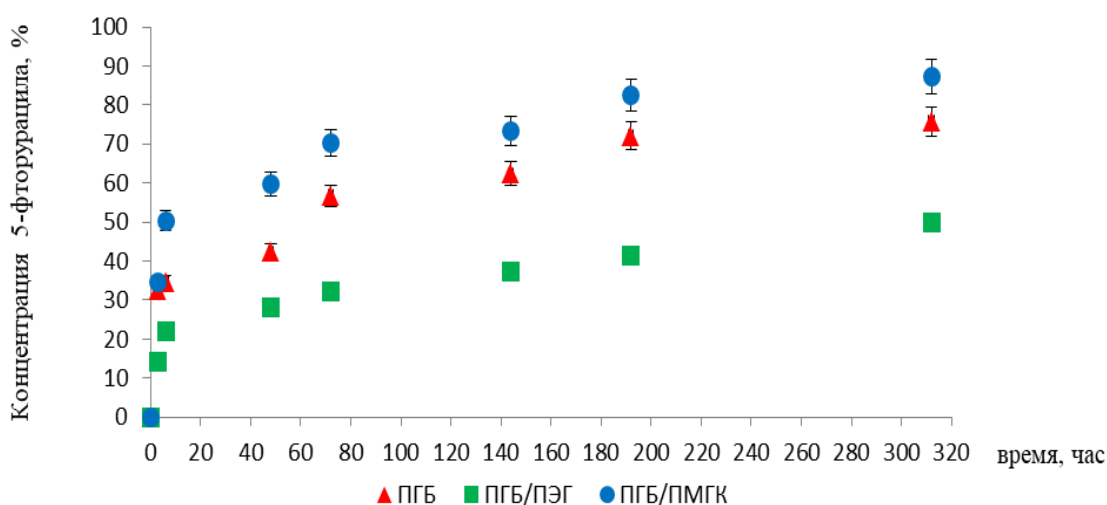


Рисунок 3.3.6 – Кривые высвобождения 5-фторурацила из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания

Высвобождение 5-фторурацила из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания в течение всего эксперимента происходило равномерно (рисунок 3.3.6). Интенсивнее препарат выходил из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПМГК, к концу эксперимента суммарный выход в модельную среду составил  $87,27 \pm 4,36$  %. Из микрочастиц на основе ПЗГБ так же наблюдался высокий процент высвобождения 5-фторурацила –  $75,69 \pm 3,78$  %. Суммарный выход препарата из микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ к концу эксперимента составил  $49,82 \pm 2,49$  %.

Из полученных данных видно, что выход лекарственных препаратов из микрочастиц зависит как от полимерного состава носителя, так и от метода получения. Суммарный выход лекарственных препаратов в модельную среду из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания в среднем в пять-десять раз выше суммарного выхода из микрочастиц, полученных эмульсионным методом, независимо от содержащегося в них препарата. Возможно, это связано с тем, что основная часть лекарственных препаратов при распылительном высушивании адсорбировалась на поверхности микрочастиц. Однако, следует отметить, что и процент включенного препарата при получении микрочастиц методом распылительного высушивания оказался выше.

#### 3.4 Оценка лекарственной эффективности микрочастиц, нагруженных ЛВ на примере модельных микроорганизмов *Escherichia coli*.

На модельной культуре микроорганизмов была проведена оценка лекарственной эффективности полученных микрочастиц, нагруженных цефтриаксоном и рифампицином в сравнении с коммерческими дисками. Была подготовлена суспензия микрочастиц, так чтобы концентрация высвободившегося препарата спустя сутки была равной таковой в коммерческом диске.



В ходе эксперимента показана высокая лекарственная эффективность исследуемых микрочастиц, нагруженных рифампицином и цефтриаксоном в отношении условно-патогенной культуры микроорганизмов *E.coli*.

Полученные результаты представлены в таблице 3.4.1 и на рисунках 3.4.1 – 3.4.4.

Таблица 3.4.1 – Диаметр зон ингибирования роста микроорганизмов *E. coli*

лекарственный препарат	Образец	концентрация препарата	зоны ингибирования, мм	
			ЭМ	МРВ
Рифампицин	коммерч.диск	0,005 мг	9,9 ± 0,5	
	ПЗГБ	0,3 мг/мл	26 ± 1,3	28 ± 1,4
	ПЗГБ/ПЭГ		21 ± 1,05	32 ± 1,6
	ПЗГБ/ПМГК		22 ± 1,1	27 ± 1,35
Цефтриаксон	коммерч.диск	0,03 мг	27 ± 1,35	
	ПЗГБ	1,8 мг/мл	0	43 ± 2,1
	ПЗГБ/ПЭГ		23 ± 1,15	44 ± 2,2
	ПЗГБ/ПМГК		0	42 ± 2,1

Следует отметить, что на лекарственную эффективность данных носителей оказывает влияние метод получения микрочастиц. Как видно из таблицы 3.4.1 зоны ингибирования роста микроорганизмов *E. coli*, образовавшиеся в результате выхода рифампицина и цефтриаксона из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания по диаметру больше, чем зоны, образовавшиеся в результате выхода препарата из микрочастиц, полученных эмульсионным методом.

Это обусловлено тем, что из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания препарат выходит быстрее, что было показано, при исследовании оттока рифампицина и цефтриаксона из микрочастиц *in vitro*.

Так же, показано на примере микрочастиц, полученных эмульсионным методом на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПМГК, нагруженных цефтриаксоном, из которых в течение эксперимента препарат выходил медленнее, в сравнении с

микрочастицами на основе ПЗГБ/ПЭГ, ингибирования роста микроорганизмов не произошло.

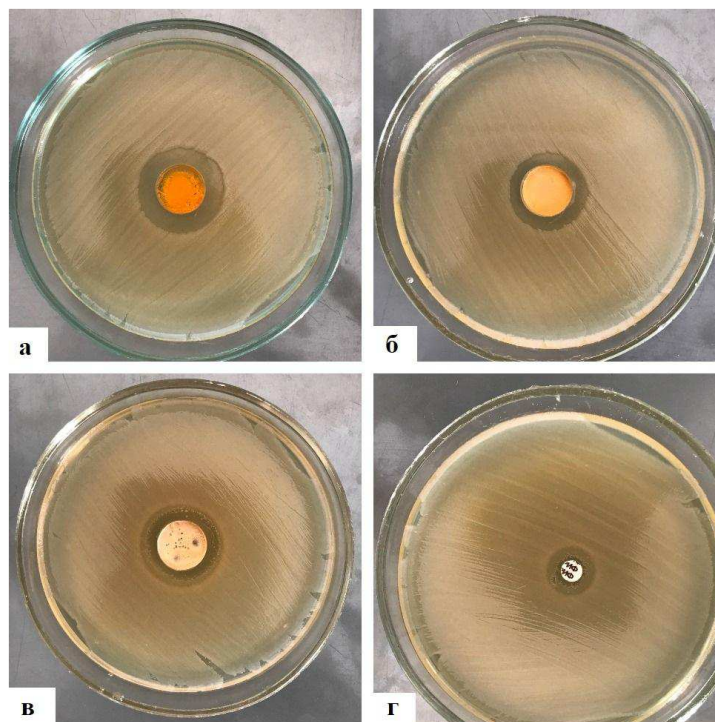


Рисунок 3.4.1 – Зоны ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, образованные в результате высвобождения рифампицина из микрочастиц, полученных эмульсионным методом (а – ПЗГБ; б – ПЗГБ/ПЭГ; в – ПЗГБ/ПМГК; г – коммерческий диск.)

Зоны лизиса, образованные в результате высвобождения рифампицина из микрочастиц, полученных эмульсионным методом, имеют четкие и ровные края (рисунок 3.4.1). Значения диаметра зон говорят о высокой чувствительности микроорганизмов к микрочастицам, содержащим рифампицин. Следует отметить, что зона лизиса в случае с коммерческим диском практически отсутствует –  $9,9 \pm 0,5$  мм (г).

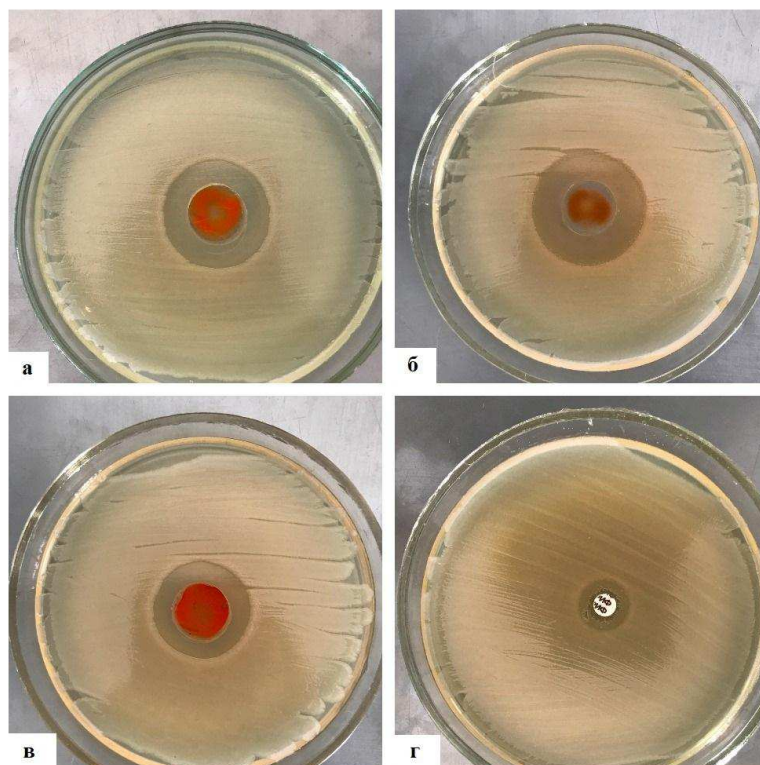


Рисунок – 3.4.2 Зоны ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, образованные в результате высвобождения рифампицина из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания (а – ПЗГБ; б – ПЗГБ/ПЭГ; в – ПЗГБ/ПМГК; г – коммерческий диск.)

Как показано на рисунке 3.4.2 зоны ингибирования роста, образованные в результате высвобождения рифампицина из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания, имеют четкую округлую форму. Значения диаметра зон ингибирования свидетельствует о чувствительности *E. coli* к данным микрочастицам.

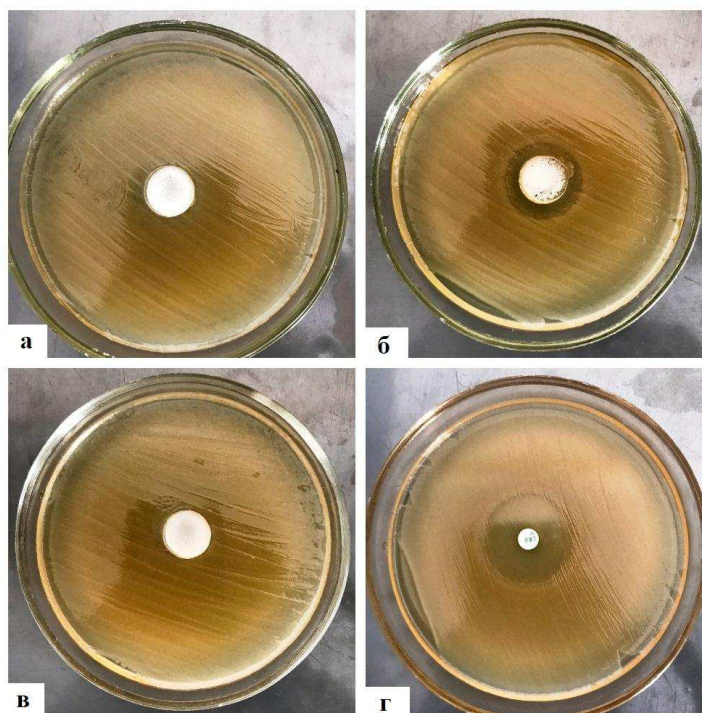


Рисунок 3.4.3 – Зоны ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, образованные в результате высвобождения цефтриаксона из микрочастиц, полученных эмульсионным методом (а – ПЗГБ; б – ПЗГБ/ПЭГ; в – ПЗГБ/ПМГК; г – коммерческий диск)

В результате высвобождения цефтриаксона из микрочастиц, полученных эмульсионным методом (рисунок 3.4.3) зона ингибирования роста образовалась только в случае микрочастиц на основе ПЗГБ/ПЭГ (б) и составила  $23 \pm 1,15$  мм, что свидетельствует о чувствительности микроорганизмов к данным микрочастицам. Для микрочастиц на основе ПЗГБ (а) и ПЗГБ/ПМГК (в) зоны ингибирования роста отсутствуют, скорее всего, это связано с тем, что концентрация вышедшего цефтриаксона из микрочастиц была ниже МПК.

Для коммерческого диска наблюдается зона ингибирования роста округлой формы с четкими краями диаметром  $27 \pm 1,35$  мм.

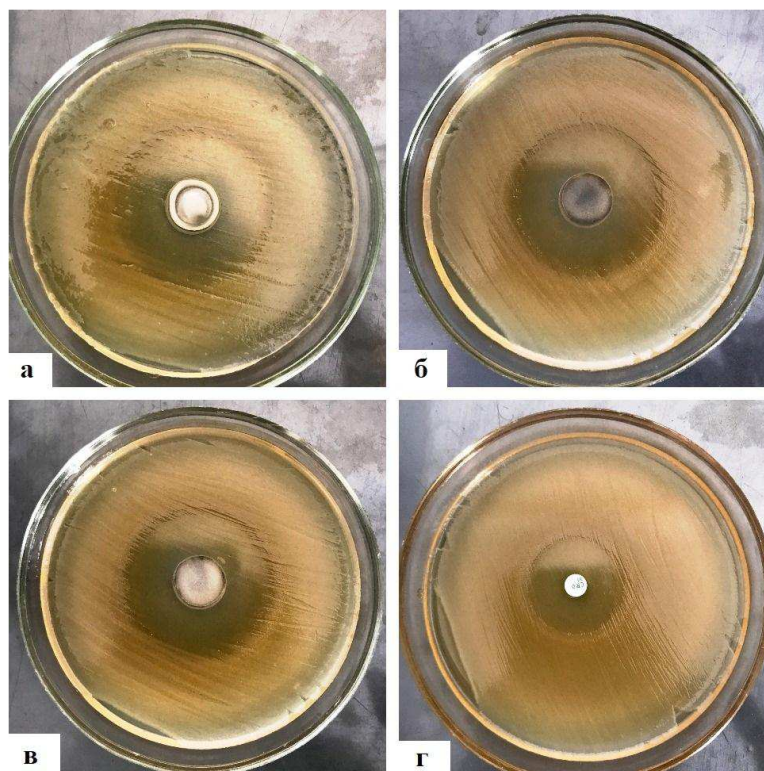


Рисунок 3.4.4 – Зоны ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, образованные в результате высвобождения цефтриаксона из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания (а – ПЗГБ; б – ПЗГБ/ПЭГ; в – ПЗГБ/ПМГК; г – коммерческий диск)

Как показано на рисунке 3.4.4 в результате высвобождения цефтриаксона из микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания, образовались зоны ингибирования роста микроорганизмов *E. coli*, диаметр которых свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизмов к данным микрочастицам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена конструированию полимерных лекарственных носителей в виде микрочастиц из композитных материалов, на основе природного поли(3-гидроксibuтирата) и биоразлагаемых синтетических полимеров, с использованием эмульсионного метода и метода распылительного высушивания.

В данной работе в сравнительном аспекте изучены и описаны характеристики полимерных микрочастиц, исследовано влияние метода получения и состава композитного материала на процентный выход, средний диаметр, показатель полидисперсности и дзета-потенциал полученных микрочастиц.

На основе проведенного анализа было показано, что микрочастицы на основе ПЗГБ/ПЭГ в процентном соотношении 50:50 и ПЗГБ/ПМГК (75:25) имели более высокие показатели выхода микрочастиц и значения дзета-потенциала, в сравнении с таковыми у композитов с другим процентным соотношением компонентов. В связи с этим, данные составы композитов были выбраны для получения микрочастиц, нагруженных лекарственными препаратами и проведения дальнейших исследований. Получены микрочастицы, нагруженные лекарственными препаратами разного фармакологического действия: цефтриаксон, рифампицин и 5-фторурацил (10% от массы композита). Изучены и проанализированы их свойства, а также проведены исследование оттока препаратов из полученных микрочастиц *in vitro* и оценка лекарственной эффективности носителей, нагруженных цефтриаксоном и рифампицином на модельной культуре условно-патогенных микроорганизмов *E. coli*. Показана эффективность действия и перспективность данных микрочастиц в качестве пролонгированной лекарственной формы, позволяющей донести необходимую концентрацию препарата в определенное место. Полученные данные о влиянии метода изготовления на средний диаметр микрочастиц, позволяют варьировать

данный параметр, при необходимости получения микрочастиц определенного размера.

По результатам данной работы подготовлена и направлена статья в рецензируемый журнал «Drying technology».

## ВЫВОДЫ

1 Синтезированы образцы микробного биополимера - ПЗГБ; сконструированы микрочастицы на его основе и в композиции с ПЭГ и ПМГК.

2 Оработана техника получения микрочастиц эмульсионным методом и методом распылительного высушивания на лабораторной установке «Mini Spray Dryer B-290» (*Buchi, Швейцария*).

3 В ходе работы получена серия полимерных микрочастиц диаметром от  $1030 \pm 29,3$  до  $6966 \pm 358,2$  нм и дзета-потенциалом от  $-53,0 \pm 1,1$  до  $-13,1 \pm 0,4$  мВт на основе композитных материалов ПЗГБ/ПМГК и ПЗГБ/ПЭГ, с различным процентным соотношением компонентов (25:75, 50:50, 75:25)

4 Установлено существенное влияние метода получения на размер и поверхностный заряд микрочастиц. Так, средний диаметр и дзета потенциал микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания, был в 2 раза больше, по сравнению с микрочастицами, полученными эмульсионным методом.

5 Показано, что состав композитного материала оказывал влияние на процентный выход микрочастиц: с увеличением содержания ПЗГБ в композиции ПЗГБ/ПЭГ и ПЗГБ/ПМГК увеличивался процентный выход микрочастиц, независимо от метода получения.

6 Получена серия микрочастиц на основе ПЗГБ, ПЗГБ/ПМГК (75:25) и ПЗГБ/ПЭГ (50:50), нагруженных рифампицином, цефтриаксоном и 5-фторурацилом.

7 Изучены и проанализированы свойства полученных микрочастиц: размер (от  $889,8 \pm 23,2$  до  $4680 \pm 478,9$  нм), размерное распределение и дзета-потенциал (от  $-52,4 \pm 2,2$  до  $-10,5 \pm 0,6$  мВт). Оценена эффективность инкапсулирования лекарственных препаратов, показано, что



процент включения препарата в микрочастицы, полученные методом распылительного высушивания, оказался выше такового для микрочастиц, полученных эмульсионным методом.

7 Проведены исследования оттока лекарственных препаратов из микрочастиц в модельную среду (СФБ – рН 7,4). Показано влияние метода получения микрочастиц и состава композиции на выход препарата.

8 На примере культуры *E. coli* показано, что микрочастицы, нагруженные рифампицином или цефтриаксоном, в концентрации равной таковой в коммерческом диске или превышающей ее, ингибируют рост микроорганизмов, образуя зоны лизиса не менее  $21 \pm 1,05$  мм.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Леонова, М. В. Новые лекарственные формы и системы доставки лекарственных средств: особенности пероральных лекарственных форм. Часть 1 / М. В. Леонова // Лечебное Дело.– 2009. – №2.

2. Соснов, А. В. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц/ А. В. Соснов, Р. В. Иванов, К. В. Балакин, Д. Л. Шоболов, Ю. А. Федотов, Ю. М. Калмыков // Качественная клиническая практика: новые лекарственные средства и технологии.– 2008. – №2.

3. Муруева, А. В. Получение резорбируемых микрочастиц, содержащих цитостатический препарат, методом распылительного высушивания и исследование их свойств / А. В. Муруева, А. М. Шершнева // Научный журнал Сибирского Федерального Университета, Биология. – 2016. – Т. 9. – №1. – С. 75 – 87.

4. Иорданский, А. Л. Диффузионные и структурные характеристики композиций на основе полигидроксипропаноата и хитозана для направленного транспорта лекарственных веществ. Часть 2 //А. Л. Иорданский, Е. Л. Иванцова, Р. Ю. Косенко, Ю. Н. Зернова, С. З. Роговина, А. Г. Филатова, К. З. Гумаргалиева, С. Н. Русанова, О. В. Стоянов, Г. Е. Заиков, J. Pielichowski // Высокомолекулярные соединения. – 2012. – Сер. А. – Т. 54. – №2. – С. 162 – 164.

5. Леонова, М. В. Новые лекарственные формы и системы доставки лекарственных средств: особенности пероральных лекарственных форм. Часть 2 / М. В. Леонова // Лечебное Дело.– 2009. – №3.

6. Мешалкин, Ю. П. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии (обзор) / Ю. П. Мешалкин, Н. П. Бгатова // Научный журнал Сибирского Федерального Университета, Биология. – 2008. – №3. – С. 248 – 268.

7. Ahnfelt, E. In vitro Release Mechanisms of Doxorubicin From a Clinical Bead Drug-Delivery System / E. Ahnfelt, E. Sjogren, P. Hansson, H. Lennernas // Journal of Pharmaceutical Science. – 2016. – № 105. – P. 3387 – 3398. [doi.org/10.1016/j.xphs.2016.08.011](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.08.011)

8. Li, W. Preparation and characterization of PHBV microsphere/45S5 bioactive glass composite scaffolds with vancomycin releasing function / W. Li, Y. Ding, R. Rai, J. A. Roether, D. W. Schubert, A. R. Boccaccini // Material Science and Engineering C. – 2014. – № 41. – P. 320 – 328. [doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.052](https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.052)

9. Francis, L. Multi-functional P(3HB) microsphere/45S5 Bioglass – based composite scaffolds for bone tissue engineering / L. Francis, D. Meng, J. C. Knowles, I. Roy, A. R. Boccaccini // Acta Biomaterialia. – 2010. – № 6. – P. 2773 – 2786. [doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.054](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.054)

10. Palazzo, F. Development of a spray-drying method for the formulation of respirable microparticles containing ofloxacin-polladium complex / F. Palazzo, S. Giovagnoli, A. Schobben, P. Blasi, C. Rosi, M. Ricci // International Journal of Pharmaceutics. – 2013. – № 440. – P. 273 – 282. [doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.045](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.045)

11. Шершнева, А. М. Конструирование микрочастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки / А. М. Шершнева, Е. И. Шишацкая // // Научный журнал Сибирского Федерального Университета, Биология. – 2014. – Т. 7. – № 2. – С. 195 – 208.

12. Peng, Q. A rapid-acting insulin formulation based on a phospholipid complex loaded PHBV nanoparticles / Q. Peng, Z-R. Zhang, T. Gong, G-Q. Chen, X. Sun // Biomaterials. – 2012. – № 33. – P. 1583 – 1588. [doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.072](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.072)

13. Иванцова, Е. Л. Структура и пролонгированный транспорт в системе биodeградируемый полимер поли (R-гидроксibuтират) –

лекарственное вещество / Е. Л. Иванцова, Р. Ю. Косенко, А. Л. Иорданский, С. З. Роговина, Э. В. Прут, А. Г. Филатова, К. З. Гумаргалиева, С. П. Новикова, А. А. Берлин // Высокомолекулярные соединения. – 2012. – Сер. А. – Т. 54. – №2. – С. 215 – 223.

14. Mahajan, H. S. Preparation, characterization and pulmonary pharmacokinetics of xyloglycan microspheres as dry powder inhalation / H. S. Mahajan, S. A. Gundare // Carbohydrate Polymers. – 2014. – № 102. – P. 529 – 536. [doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.036](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.036)

15. Mesquita, P. C. Physicochemical aspects involved in methotrexate release kinetics from biodegradable spray-dried chitosan microparticles / P. C. Mesquita, A. R. Oliveira, M. F. F. Pedrosa, A. G. Oliveira, A. A. Silva-Junior // Journal of Physics and Chemistry of Solids. – 2015. – № 81. – P. 27 – 33. [doi.org/10.1016/j.jpics.2015.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jpics.2015.01.014)

16. Yang, C-H. Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle-chitosan composite microparticles for antibacterial applications / C-H. Yang, L-Sh. Wang, S-Y. Chen, M-C. Huang, Y-H. Li, Y-C. Lin, P-F. Chen, J-F. Shaw, K-S. Huang // International Journal of Pharmaceutics. – 2016. – № 510. – P. 493 – 500. [doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.010)

17. Trows, S. Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug / S. Trows, R. Sherlie // Powder Technology. – 2016. – № 292. – P. 223 – 231. [doi.org/10.1016/j.powtec.2016.01.042](https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.01.042)

18. Шершнева, А. М. Исследование электрокинетического потенциала микроносителей для лекарственных препаратов из резорбируемых полимеров «Биопластотан» / А. М. Шершнева, А. В. Муруева, Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова // Биофизика. – 2014. – Т. 59. – №4. – С. 684 – 691.

19. Горева, А. В. Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров оксиалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов / А. В. Горева, Е. И. Шишацкая,

Т. Г. Волова, Э. Дж. Сински // Высокомолекулярные соединения. – 2012. – Сер. А. – Т. 54. – №2. – С. 224 – 236.

20. Зернов, А. Л. Микрокапсулы из поли (3- гидроксипропиридата) для пролонгированного высвобождения белка / А. Л. Зернов, Е. А. Иванов, Т. К. Махина, В. Л. Мышкина, О. В. Самсонов, А. В. Феофанов, А. В. Волков, Ю. В. Гажва, А. А. Мураев, В. М. Рябова, К. В. Шайтан, С. Ю. Иванов, Г. А. Банарцева, А. П. Бонарцев // GTM: Оригинальные исследования. – 2015. – Т. 7 – №4.

21. Бондарь, В. С. Конструирование композиционных материалов на основе наноалмазов и разрушаемых биополимеров / В. С. Бондарь, А. П. Пузырь, А. В. Горева, А. Е. Буров // Научный журнал Сибирского Федерального Университета, Биология. – 2013. – Т. 6. – № 2. – С. 163 – 174.

22. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: учебно-электронный курс / Т.Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П.В.Смирнов – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009.

23. Malafaya, P. V. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications / P. V. Malafaya, G. A. Silva, R. L. Reis // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2007. – P. 207–233.

24. Канюков, В. Н. Материалы для современной медицины: учеб.пособие / В. Н. Канюков, А. Д. Стрекаловская, В. И. Килькинов, Н. В. Базарова – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. – 113с.

25. Гажва, Ю. В. Разработка и исследование *invivo* и *invitro* костно-пластического материала на основе композиции гидроксиапатита, поли-3-оксибутирата и альгината натрия / Ю. В. Гажва, А. П. Бонарцев, Р. Ф. Мухаметшин, И. И. Жаркова, Н. В. Андреева, Т. К. Махина, В. Л. Мышкина, А. Е. Беспалов, А. Л. Зернов, и др. // GTM: Разработка и исследование нового костно-пластического материала. – 2014. – Т.6. - №1. – С. 6-13.

26. Velema J. Biopolymer-Based Biomaterials as Scaffold for Tissue Engineering / J. Velema, D. Kaplan // *BiochemEngin/ Biotechnol.* – 2006. – Vol. 102. – P. 187-238.

27. Shi M. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate/gelatin/antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering/ M. Shi, J. D. Kretlow, P. P. Spicer, Y. Tabata, N. Demian, M. E. Wong, F. K. Kasper, A. G. Mikos // *Journal of Controlled Release* – 2011. – P. 196–205.

28. Белоусов, Ю. Б. Клиническая фармакология / Ю. Б. Белоусов, В. Г. Кулес, В. К. Лепехин, В. И. Петров. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 976 с.

29. Лившиц, В. А. Микросферы из поли(3-гидроксibuтирата) для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ / В. А. Лившиц, А. П. Бонарцев, А. Л. Иорданский, Е. А. Иванов, Т. А. Махина, В. Л. Мышкина, Г. А. Бонарцева // *Высокомолекулярные соединения.* – 2009. – Сер. Б. – Т. 51. - № 7. – С. 1243–125.

30. Ивонин, А. Г. Направленный транспорт лекарственных средств: современное состояние вопроса и перспективы / А. Г. Ивонин, Е. В. Пименов, В. А. Оборин, Д. А. Девришов, С. Н. Копылов // *Известия Коми научного центра УрО РАН. Выпуск 1(9) – Сыктывкар, 2012.*

31. 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.

32. Emanuel, N. A lipid-and-polymer-based novel local drug delivery system—BonyPid: From physicochemical aspects to therapy of bacterially infected bones / N. Emanuel, Y. Rosenfeld, O. Cohen, Y. H. Applbaum, D. Segal, Y. Barenholz // *Journal of Controlled Release.* – 2012.

33. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая – Красноярск. Издательство «Красноярский писатель». – 2011. – 392 с.
34. Shi M. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control / M. Shi, J. D. Kretlow, A. Nguyen, S. Young, L. S. Baggett, M. E. Wong, F. K. Kasper, A. G. Mikos // *Biomaterials*, 31. – 2010.
35. Feng, K. Novel antibacterial nanofibrous PLLA scaffolds / K. Feng, H. Sun, M. A. Bradley, E. J. Dupler, W. V. Giannobile, Peter X. Ma // *Journal of Controlled Release*. – 2010.
36. Ye, M. Issue in long-term protein delivery using biodegradable microparticles / M. Ye, S. Kim, K. Park // *Journal of Controlled Release*. – 2010.
37. Шершнева, А. М. Полимерные микрочастицы на основе полигидроксиалканоатов: получение, характеристика, применение : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Шершнева Анна Михайловна. – Красноярск, 2015. – 149 с.
38. Сеница, Е. А. Технология получения микрочастиц на основе самоэмульгирующихся систем в псевдооживленном слое и распылительной сушкой : дис. ... канд. техн. наук : 05.17.08 / Сеница Евгения Александровна. – Москва, 2015. – 208 с.
39. Blanco, M. D. 5-Fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers/ Blanco M.D., Blanco R.L., Sastre C., Teljon N., Olmo R., Teljor M. // *Characterization and drug release*. – *Journal of Microencapsulation*. – 2005. – 22 (6). – P. 671–682.
40. Arpagaus C., Schafroth N. Spray dried biodegradable polymers as target material for controlled drug delivery / Best@Buchi. Information Bulliten, Shitzerland. – 2007. – Vol. 46. – P. 8.
41. Новое антибактериальное покрытие на основе смеси полиуретана с поли- L – лактидом: доклад национальной академии

наук Беларуси / Д. В. Тапольский [и др.] . – Беларусь. – 2013. – Т.57.№ 4.

42. Абдуллин, И. Ш. Плазменная модификация полимерных мембран для медицины / И. Ш. Абдуллин, Р. Г. Ибрагимов, О. В. Зайцева, В. В. Парошин // Вестник Казанского Технологического Университета. – 2013. – Т.16. – 11-16 с.

43. Kassab, A. Ch. Rifampicin carrying polyhydroxybutirate microspheres as a potential chemoembolization agent / A. Ch. Kassab, K. Xu, E. B. Denkbas, Y. Dou, S. Zhao, E. Piskin // Polymer Edition. – Journal of Biomaterials Science. – 1997. – Vol. 8. – No. 12. – PP. 947-961.

44. Государственный стандарт качества лекарственного средства. ФС – 42 - . – Министерство здравоохранения Российской Федерации.

45. Подколотная, О. А. Пути поступления наночастиц в организм млекопитающих, их биосовместимость и клеточные эффекты / О. А. Подколотная, Е. В. Игнатьев, Н. Л. Подколотный, Н. А. Колчанов // Успехи современной биологии. – 2012. – Т.132, №1.– 3-15 с.

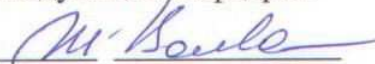
46. Formulation and Pharmacokinetics of Self-Assembled Rifampicin Nanoparticles Systems for Pulmonary Delivery / J. C. Sung [etc.]. – Journal of Pharmaceutical Research. – 2009. – Vol. 26. – No. 8. – PP. 1847-1855.



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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



подпись      инициалы, фамилия

« 18 » июня 20 18 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Конструирование носителей для депонирования лекарственных препаратов  
на основе микробных биополимеров, синтезированных  
*Cupriavidus eutrophus* B-10646

06.04.01 - Биология

06.04.01.00.01 – Микробиология и биотехнология

Научный

руководитель



подпись, дата

д.б.н., профессор

Т. Г. Волова

инициалы, фамилия

Выпускник

ББ16-01М,

041625649

номер группы,

зачетной

книжки



подпись, дата

К.В. Абанина

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

к.б.н.

А. В.

Муруева

инициалы, фамилия

Красноярск 2018