ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ФИЛАТОВА ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СИСТЕМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
канд. биол. наук Г.А. Бонарцева

Москва 2019

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **6**

ВВЕДЕНИЕ **7**

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР **12**

1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ **14**

1.1. Фармакокинетические параметры 14

1.2. Классификация лекарственных форм с модифицированным высвобождением 18

2. МИКРОСФЕРЫ-ДЕПО ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЦИТОСТАТИКОВ **25**

2.1. Микросферы как перспективные системы адресной доставки цитостатиков 25

2.2 Направленная доставка цитостатиков с помощью биополимерных наночастиц. 27

2.3. Использование нано-частиц металлов в полимерных управляемых системах адресной доставки 28

2.4. Методы получения микросфер 31

2.5. Примеры получения микросфер с цитостатиками 36

2.6. Противоопухолевая эффективность биополимерных микросфер 43

3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ **44**

3.1. Доклиническое изучение токсичности (биобезопасности) противоопухолевых препаратов 46

3.2. Оценка биобезопасности и биосовместимости биополимерных систем *in vitro* на клеточных культурах 47

3.3. Исследования цитотоксического действия микросфер на клеточных культурах 48

4. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ 52

4.1. Синтетические биодеградируемые материалы 52

4.2. Природные биодеградируемые материалы — полиоксиалканоаты ... 54

4.2.1. *Открытие и исследование свойств полиоксиалканоатов 54*

4.2.2. *Учет особенностей и свойств полимеров при создании систем пролонгированного высвобождения лекарственных веществ ... 58*

4.2.3. *Преимущества полиоксиалканоатов для получения микросфер . 63*

4.2.4. *Полиоксибутират — природный биосовместимый полимер для получения микросфер 65*

4.2.5. *ПОБ и потенциал его использования в медицине 69*

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 72

1. Штамм-продуцент ПОБ 72

2. Получение микробиологического высокоочищенного ПОБ 72

3. Выделение и очистка ПОБ из биомассы 73

4. Определение молекулярной массы полимера 74

5. Определение содержания ПОБ в клетках по Зевенхаузену 75

6. Химиотерапевтические лекарственные вещества, инкапсулируемые в полимерную матрицу ПОБ 76

7. Получение микросфер из ПОБ с инкапсулированными ЛВ 76

8. Исследование контролируемого высвобождения цитостатиков из полимерных микросфер *in vitro* 78

9. Исследование деградации микросфер из ПОБ *in vitro* 78

10. Сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопии 78

11. Изучение химиотерапевтической активности микросфер при их взаимодействии с культурой клеток рака молочной железы человека линии MFC-7 79

12. Оценка острой токсичности микросфер 82

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 83

1. МИКРОСФЕРЫ С ВКЛЮЧЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ 83

1.1. Микросферы с включением наночастиц оксида железа Fe_2O_3 83

1.2 Микросферы с включением наночастиц золота..... 85

2. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СИСТЕМЫ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛВ 88

2.1. Параметры инкапсулирования и морфология микрочастиц с различными ПОЛВ..... 89

2.2. Микросферы с включением дексаметазона 89

2.3. Микросферы с доксорубицином 95

2.4. Микросферы с метотрексатом..... 99

2.5. Микросферы с паклитакселом 101

2.6. Микросферы с включением этопозида..... 106

2.7. Микросферы с хлорамбуцилом 109

3. КИНЕТИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛВ 112

3.1. Сравнительный анализ профилей высвобождения различных ЛВ..... 112

3.2. Модели кинетического профиля высвобождения..... 114

3.2.1. *Математическая модель диффузионного высвобождения ЛВ ... 114*

3.2.2. Эмпирические модели кинетического профиля высвобождения . 119

4. ДЕГРАДАЦИЯ МИКРОСФЕР С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМИ ЛВ 124

4.1. Деградация микросфер с инкапсулированными противо-опухолевыми лекарственными веществами..... 124

4.2. Гидролитическая деструкция микросфер с инкапсулированным паклитакселом 126

5. ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИОПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ЛВ 128

5.1. Исследование химиотерапевтической активности микросфер с цитостатиками на культуре ткани опухолевых клеток MFC-7 128

5.2. Результаты исследования биосовместимости микросфер с включением цитостатиков 129
5.3. Оценка биосовместимости с помощью параметра IC_{50}. 132
5.4. Оценка острой токсичности биополимерных микросфер с инкапсулированным паклитакселом *in vivo* 138

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 139

ВЫВОДЫ 141

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 142

БЛАГОДАРНОСТИ 166

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АФИ — активный фармацевтический ингредиент

БЛК — биополимерная лекарственная композиция

ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия

ЛФ — лекарственная форма

ЛВ — лекарственное вещество

ЛС — лекарственное средство

ПГА — поли-гидрокси-алканоаты

ПГлА — полигликолиды

ПЛА — поли-лактиды

ПОА — поли-окси-алканоаты

ПОБ — поли-3-оксибутират

ПОБВ — поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат

ПОЛВ — противоопухолевое лекарственное вещесво

ПКЛ — паклитаксел

СЭМ — сканирующая электронная микроскопия

ТМ — темозолимид

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Химиотерапия является обязательным этапом лечения онкологических заболеваний. Наряду с цитотоксичностью, необходимой для химиотерапии, применение цитостатиков имеет побочное токсическое действие в первую очередь на ткани, наиболее сходные с опухолевыми по скорости пролиферации (костный мозг, лимфатическая система, желудочно-кишечный тракт, репродуктивные органы), что приводит как к лечебному, так и к токсическому эффектам. Кроме того, химиотерапевтические препараты обладают узким диапазоном «широты терапевтического действия». Побочные и токсические эффекты при химиотерапии отмечаются гораздо чаще, чем при других видах лекарственной терапии. Для химиотерапевтических лекарств характерны и специфические осложнения: отсроченная токсичность, характеризующаяся скрытым (латентным) периодом в проявлении токсического действия, большим разнообразием и сложностью ее выявления; отсутствие избирательной токсичности; местно-раздражающее действие, эмбриотоксичность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность, функциональная кумуляция, нейротоксичность и иммунотоксичность. Поэтому лечение онкологических больных химиопрепартами сопровождается различными по своим проявлениям токсичными и побочными эффектами. Разработка малотоксичных лекарственных форм с контролируемым высвобождением цитостатиков позволит осуществлять длительную химиотерапию без многократного введения препарата, что должно значительно улучшить качество жизни пациента. Поэтому создание и исследование новых малотоксичных лекарственных систем с контролируемым высвобождением цитостатиков на основе природного биосовместимого полимера ПОБ является актуальным.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы являлась разработка и исследование лекарственных систем контролируемого высвобождения цитостатиков на основе природного биополимера поли-3-оксибутирата. В соответствии с целью исследования в работе решались следующие задачи: получить природный биоразлагаемый полимер ПОБ; наработать партии микросфер

с включением различных цитостатиков; провести исследование кинетики высвобождения цитостатиков из полученных микросфер *in vitro*; изучить биосовместимость и биодеструкцию полученных микросфер; оценить их цитотоксичность и химиотерапевтическое воздействие на культуре ткани опухолевых клеток рака груди человека; а также исследовать общую токсичность полученных лекарственных систем *in vivo*.

Научная новизна работы. Впервые созданы лекарственные биополимерные системы на основе поли-3-оксибутирата методом одноэтапного эмульгирования с инкапсулированными цитостатиками (дексаметазон, хлорамбуцил, этопозид, паклитаксел (ПКЛ), метотрексат, доксорубицин). Установлено, что профиль высвобождения цитостатических лекарственных веществ из микросфер соответствует динамике контролируемого высвобождения. Впервые показано, что биополимерные микросферы с инкапсулированным ПКЛ обладают меньшей токсичностью и большей эффективностью по сравнению с традиционной лекарственной формой, что доказано опытами, проведенными как на культуре клеток рака груди человека, так и в экспериментах *in vivo*. Разработан метод получения микросфер с включением нано-частиц металлов золота и железа.

Научно-практическая значимость работы. Результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания новых малотоксичных лекарственных форм этопозида и хлорамбуцила (в том числе двойной лекарственной формы) с контролируемым высвобождением. Показано, что из всех изученных микрочастиц с включением цитостатиков наиболее оптимальным кинетическим показателям отвечают микрочастицы с включением ПКЛ — основы противоопухолевого препарата Таксол. Лекарственные формы с контролируемым высвобождением ПКЛ обеспечивают уровень высвобождения ЛВ, необходимый для проявления цитостатического действия на клетки. Полученные лекарственные формы являются малотоксичными для всего организма, что создает реальные предпосылки для замены в будущем активно применяемого в медицинской практике препарата

Таксол, имеющего много побочных эффектов. Получение микросфер с включением нано-частиц металлов золота и железа может послужить основой для разработки систем направленной доставки цитостатиков, а также для диагностических целей.

Методы исследования. Микросферы с инкапсулированными цитостатиками получали с использованием метода одноэтапного эмульгирования. Молекулярную массу полимера определяли методом вискозиметрии, используя уравнение Марка-Хаувинка-Куна. Содержание цитостатика в опытном растворе определяли спектрофотометрически. Для определения степени биодеградации микросфер с ЛВ использовали микрофотографии, полученные при помощи световой микроскопии. При исследовании выживаемости опухолевых клеток молочной железы под воздействием тестируемого агента использовался стандартный МТТ-тест (колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток). При исследовании микросфер с наночастицами золота и железа использовались методы сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии.

Степень достоверности полученных результатов. Получение и исследование микросфер с инкапсулированными цитостатиками производилось с использованием современных научных методик. Кинетические характеристики высвобождения ЛВ из микросфер были получены путем аппроксимации экспериментальных данных. Результаты исследования обсуждались на семинарах лаборатории, докладывались на конференциях и публиковались в реферируемых зарубежных и отечественных изданиях.

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку данных, оформление и публикацию результатов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1) Метод одноэтапного эмульгирования позволяет получать биополимерные микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата с инкапсулированными цитостатиками: дексаметазоном, хлорамбуцилом, этопозидом, паклитакселом, метотрексатом, доксорубицином.
2) Кинетика высвобождения лекарственных веществ из биополимерных микросфер в водной среде *in vitro* на ранней стадии хорошо описывается уравнением модели диффузии по Фику.
3) Профиль высвобождения цитостатических лекарственных веществ из микросфер соответствует кинетике контролируемого высвобождения. Наиболее оптимальными кинетическими показателями пролонгированного высвобождения обладают микрочастицы с включением паклитаксела.
4) Противоопухолевая активность *in vitro* микросфер с различными ЛВ: паклитакселом, этопозидом и хлорамбуцилом зависит как от кинетики высвобождения ЛВ из микрочастиц, так и от биологической активности действующего ЛВ на опухолевые клетки линии MFC-7 *in vitro*.
5) Биополимерные микросферы с инкапсулированным ПКЛ обладают меньшей токсичностью и большей эффективностью по сравнению с традиционным препаратом Таксол.
6) В биополимерные микросферы можно также инкапсулировать наночастицы металлов: золота и железа.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на следующих конференциях:

- 1-я Международная научная школа — Нано-2009. Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах, г. Обнинск, 2009;
- International conference “Biocatalysis-2009”, 2009, Arkhangelsk;
- Научно-практической конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2010;

- III Всероссийская конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010», МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва, 2010;
- The 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Валетта, Мальта, 2010;
- The 26th Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension, 2010, New-York, USA;
- International conference MipTec, Базель, Швейцария, 2010;
- The 27th Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension, 2011, New-York, USA;
- Международная конференция, Современные достижения бионаноскопии, 2011, Москва, ФФ МГУ им. М.В. Ломоносова;
- IV Всероссийская конференция по наноматериалам «НАНО-2011», 2011, Москва;
- Всероссийская школа-семинар Научный потенциал - XXI "Композитные наноматериалы", Бекасово, МО, 2011;
- 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Стамбул, Турция, 2012;
- TechConnect World 2012 Conference and Trade Show, 2012, Santa Clara, California, USA.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 статей, 4 обзора, 13 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы (206 ссылок). В Заключении излагаются итоги выполненного исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 75 рисунков и 9 таблиц.

ГЛАВА 1
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Современная система поиска лекарственных средств опирается на достижения геномики, протеомики и биоинженерии. Успехи в этих областях сегодня позволяют создавать новые лекарства, при этом используются клеточные технологии и биомодели, высокопроизводительный скрининг и компьютерное моделирование.

Главная цель модернизации российского здравоохранения – повышение доступности и качества медицинской помощи для широких слоев населения [Петров, 2011]. Онкологические заболевания занимают третье место среди социально значимых заболеваний после болезней сердечно-сосудистой системы, травм и отравлений. На сегодняшний день методы лечения онкологических заболеваний не полностью используют потенциал химиопрепаратов. Сегодняшнее состояние химиотерапии указывает на необходимость улучшения использования терапевтической эффективности цитостатиков. Современный химиотерапевтический препарат должен отвечать следующим требованиям: обладать высокой эффективностью при постоянной заранее заданной концентрации в опухоли и в тоже время проявлять низкую системную токсичность и большую продолжительность действия.

Для достижения этих условий необходимо создание систем с контролируемым высвобождением химиопрепаратов, то есть создание коньюгатов лекарственных препаратов цитостатического действия с полимерным носителем.

В настоящее время на фармацевтическом рынке преобладают формы лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением в основном импортного производства. В ряде западных стран разработаны и широко используются при лечении онкологических заболеваний лекарственные формы с контролируемым высвобождением сроком до 12 недель на основе молочной и гликолевой кислот. Однако в России производство таких препаратов отсутствует. Фармакологическая безопасность России в настоящее время оставляет желать лучшего. Всем хорошо

известна недостаточная доля продаж российских производителей на нашем собственном рынке лекарственных средств для лечения социально значимых заболеваний [Петров, 2011]. Особую актуальность представляет создание отечественных систем адресной доставки цитостатиков на основе природных биоразлагаемых полимеров. Также необходимы разработки для проведения комплексных диагностических мероприятий для выявления ранней онкопатологии.

В качестве полимерного носителя в своей работе мы использовали поли-3-оксибутират (ПОБ) — биоразлагаемый полимер природного происхождения, биосинтез которого разработан российскими учеными в институте биохимии им. А.Н. Баха РАН. К настоящему времени разработаны технические условия и регламент получения медицинского поли-3-оксибутирата, проведены санитарно-гигиенические и токсикологические испытания полимера в соответствии с требованиями Министерства Здравоохранения России, из которых следует, что полимер поли-3-оксибутират не токсичен, не обладает раздражающим и сенсибилизирующим действием, отвечает требованиям нормативной документации при фармацевтическом использовании и применим для парентерального и перорального применения.

ПОБ обладает хорошей биосовместимостью и способностью полностью разлагаться в организме человека до CO_2 и воды. В последнее время возник интерес к ПОБ, как к материалу для матричного носителя широкого спектра лекарственных веществ, в том числе цитостатического действия. Предполагается, что комплексный препарат цитостатика с полимерным носителем должен выделять в организм определенное количество лекарства в течение длительного времени, при этом должна устраняться проблема резкого повышения и снижения концентрации лекарственного вещества в крови и связанных с этим побочных реакций, и должен достигаться локальный терапевтический эффект. Постепенный выход цитостатика из биополимерной матрицы должен обеспечивать длительное поддержание необ-

ходимой концентрации действующего вещества в организме или локально в определенном органе или ткани. Тем самым будет снята необходимость дополнительного многократного введения цитостатика, будет снижена токсичность и устранены побочные эффекты химиотерапии, повышена стабильность молекулы цитостатика за счет полимерной матрицы и его эффективность за счет равномерного высвобождения из нее. Это является особенно актуальным для химиотерапии, так как цитостатические лекарственные вещества обладают высокой токсичностью, низкой стабильностью, требуют многократного введения и вызывают ряд тяжелых осложнений у пациентов.

1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

1.1. Фармакокинетические параметры

Для успешного химиотерапевтического лечения требуется создание новых форм химиопрепаратов. Целью современных разработок является получение цитостатических лекарственных форм третьего и четвертого поколений для проведения индивидуальной химиотерапии в зависимости от нужд конкретного пациента. Длительность лекарственной химиотерапии и режим дозирования зависит от целей терапии, при этом используется локальный или системный подход. Достичь оптимального высвобождения цитостатика позволяют системы контролируемого высвобождения на основе биосовместимых полимеров. Кинетика высвобождения и всасывания цитостатика из полимерной матрицы описывается в терминах фармакокинетики, так как фармакокинетика изучает процессы всасывания, распределения, метаболизма и элиминации лекарственного препарата. Длительность лечения определяется временем достижения терапевтического действия без выраженных побочных эффектов. Частота приема определяется временем, в течение которого происходит снижение эффекта после однократного приема препарата.

Целью фармакотерапии является поддержание концентрации лекарственного средства в течении всего периода лечения. В качестве примера можно рассмотреть события, происходящие после приема препарата индометацина внутрь (рис.1) [Горчакова, 2010].

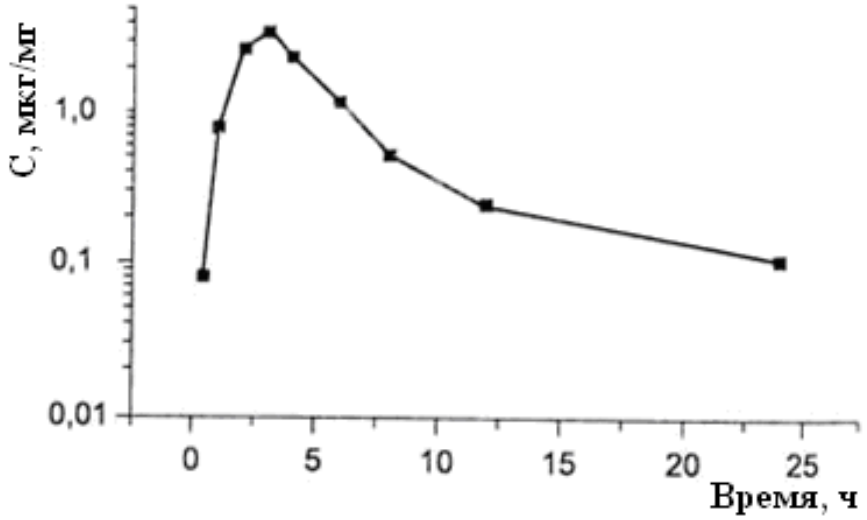


Рис. 1. Кинетика содержания индометацина в плазме крови человека после приема 50 мг препарата.

Вначале скорость его поступления в организм превышает скорость элиминации, при этом концентрация в крови и тканях возрастает, часто превышая уровень, необходимый для терапевтического действия, и иногда вызывая токсические эффекты. Затем скорость элиминации лекарственного вещества становится выше скорости всасывания, поэтому концентрация препарата, как в крови, так и тканях снижается, уменьшается проявление его действия.

Таким образом, для оптимального применения препарата необходимо иметь представление о кинетике процессов всасывания, распределения и элиминации, т.е. фармакокинетике.

Основной принцип клинической фармакокинетики заключается в том, что величины как желаемого, так и токсического эффекта являются функциями концентрации лекарственного вещества в месте его действия. Терапия становится не-

эффективной, когда концентрация препарата либо слишком низкая, что не позволяет проявиться эффекту, либо слишком высокая, что вызывает токсические осложнения. Между этими границами концентраций лежит область, обуславливающая успех терапии. Диапазон между минимальной токсической и минимальной терапевтической дозой называется терапевтическим диапазоном. Чем шире терапевтический диапазон, тем меньше вероятность возникновения осложнений при применении данного лекарственного вещества (табл. 1) [Белоусов, 2002].

Широкий терапевтический диапазон	**Узкий терапевтический диапазон**
Антациды	Антиаритмические средства
Большинство антибиотиков	Антикоагулянты и др. препараты, влияющие на свертываемость крови
Гепатопротекторы	Аминогликозидные антибиотики
Гидрофильные сердечные гликозиды	Гормоны и их синтетические аналоги
Дерматологические средства	Иммуномодуляторы, иммуносупрессанты
Диуретики	Противосудорожные препараты
Местные анестетики	Регуляторы аппетита
Большинство нестероидных противовоспалительных средств	Средства для наркоза
Обволакивающие препараты	Нейролептические препараты
Регуляторы моторики кишечника	Стимуляторы дыхания
Слабительные, сурфактанты, препараты для лечения диареи	Цитостатические препараты

Таблица 1. Примеры лекарственных препаратов с широким и узким терапевтическим диапазоном.

Наиболее важными фармакокинетическими параметрами, необходимыми для выбора режима дозирования являются минимальная токсическая концентрация — МТК и минимальная эффективная концентрация — МЭК. Доза — количество лекарственного средства, выраженное в единицах массы, объема, биологических единицах. В медицинской практике используют терапевтические (лечебные дозы) и профилактические. Терапевтические дозы разделяют на минимальные (пороговые), средние и высшие (максимальные). Кроме того, терапевтические дозы бывают разовые, суточные, курсовые, ударные, насыщающие, поддерживающие и другие [Горчакова, 2010].

На рис. 2 показана фармакокинетика двух лекарственных препаратов А и Б, содержащих одно и то же ЛВ в одной дозе. Препарат Б обладает преимуществом перед препаратом А, так как действует в течение 8 часов без превышения МТК.

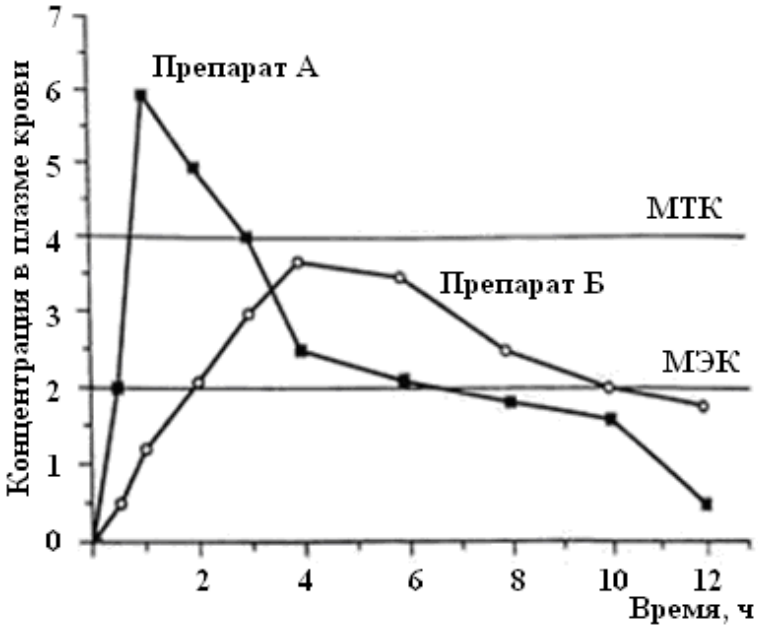


Рис. 2. Фармакокинетика двух лекарственных препаратов, содержащих одно и то же ЛВ в одной дозе: МТК — минимальная токсическая концентрация; МЭК — минимальная эффективная концентрация.

Исходя из вышесказанного, оптимизация фармакологической терапии может быть сведена к поддержанию концентрации ЛВ в заданной ткани в пределах терапевтического диапазона. Это позволяет достигнуть лечебного эффекта без развития побочного действия. Однако в большинстве случаев выявить концентрацию ЛВ в

месте действия не представляется возможным, поэтому чаще всего на практике определяют концентрацию в плазме крови. Это связано с тем, что именно концентрация лекарственного вещества в плазме крови определяет его системное действие: поступление в органы-мишени и развитие побочных эффектов. Поэтому оптимизация лечения с целью повышения эффективности терапии и снижения риска развития побочных эффектов может быть сведена к определению концентрации ЛВ в плазме крови. Следовательно, режим дозирования ЛВ должен быть подобран так, чтобы в течение лечения концентрация ЛВ в плазме крови была в пределах терапевтического диапазона [Белоусов, 2002].

Если неоспоримыми достоинствами лекарственных средств первого поколения было их быстрое действие, то препараты второго поколения отличаются от первых высокой специфичностью и более продолжительным действием, препараты третьего и четвертого поколения не оказывают побочного токсического влияния на функционирование внутренних органов. Именно к этой группе относятся лекарственные формы нового поколения с модифицированным высвобождением. Разработка и производство новых отечественных инновационных лекарственных препаратов позволят нам обеспечить фармацевтическую безопасность нашей страны [Петров, 2011].

1.2. Классификация лекарственных форм с модифицированным высвобождением

Лекарственные вещества с модифицированным высвобождением различаются по степени управления процессом высвобождения (контролируемое высвобождение, пролонгированное высвобождение).

Контролируемое высвобождение. Лекарственные формы с контролируемым высвобождением обладают следующими признаками [Коржавых, 2003]:

- должен быть определен вид математической зависимости количества высвободившегося лекарственного вещества от параметров, влияющих на процесс высвобождения (отличие от пролонгированных лекарственных форм);

- лекарственное вещество высвобождается согласно фармакокинетической рациональной скорости;
- на скорость высвобождения не влияют или влияют незначительно физиологические условия (*pH* и ферментный состав желудочно-кишечных жидкостей и др.), так что она определяется свойствами самой системы и может быть теоретически предсказана с достаточной точностью.

Пролонгированное высвобождение. Пролонгированные лекарственные формы замедляют высвобождение лекарственного вещества, обеспечивая увеличение продолжительности его действия.

К пролонгированным лекарственным формам предъявляются следующие требования [Коржавых, 2003]:

- концентрация лекарственного вещества по мере высвобождения из препарата не должна подвергаться значительным колебаниям и должна быть в организме оптимальной в течение определенного периода времени;
- вспомогательные вещества, введенные в лекарственную форму, должны полностью выводиться из организма или инактивироваться;
- способы пролонгирования должны быть простыми и доступными в исполнении и не должны оказывать отрицательного воздействия на организм.

Конечная цель лекарственных форм длительного действия — это улучшение лечебного эффекта за счет поддержания постоянного уровня концентрации препарата в плазме. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением должны обеспечивать высвобождение препарата с кинетикой первого или нулевого порядка. Полимерные системы адресной доставки ЛВ предполагают их доставку в определенный орган с определенной скоростью [Pillai, 2001].

Полимерные системы адресной доставки позволяют доставлять лекарство в течение продолжительного времени непосредственно к месту воздействия. Полимерные системы используют для поддержания уровня концентрации лекарства, ослабления побочных эффектов, снижения дозировки и частоты приема лекарства,

а также для стабилизации лекарственных препаратов с малым временем полураспада *in vivo* [Whittlesey, 2004]. Полимерные системы, контролирующие высвобождение ЛВ с коротким временем полураспада, значительно продлевают их действие с минимальными флуктуациями уровня и сниженным риском интоксикации [Berkland, 2002].

Принцип работы системы доставки с контролируемым высвобождением лекарств заключается в управлении кинетики их высвобождения путем регулирования свойств полимерной матрицы. Необходим также учет и кинетических характеристик самого лекарства [Robinson, 1987; Kanamala, 2016].

В итоге, полимерные лекарственные формы гарантируют постоянную концентрацию препарата в крови, что улучшает его терапевтическое действие [Pillai, 2001]. В идеале транспортная система доставки препарата должна обеспечить медленное усвоение лекарства тканями организма. Этому условию отвечают кинетические профили высвобождения первого или нулевого порядка, т. е. сюда мы можем отнести пролонгированные формы или формы с контролируемым высвобождением. На рис. 3 показаны графики высвобождения лекарства, полученные при сравнении трех форм препаратов: традиционная лекарственная форма — кривая 1, лекарственная форма с пролонгированным высвобождением — кривая 2, лекарственная форма с контролируемым высвобождением — кривая 3.

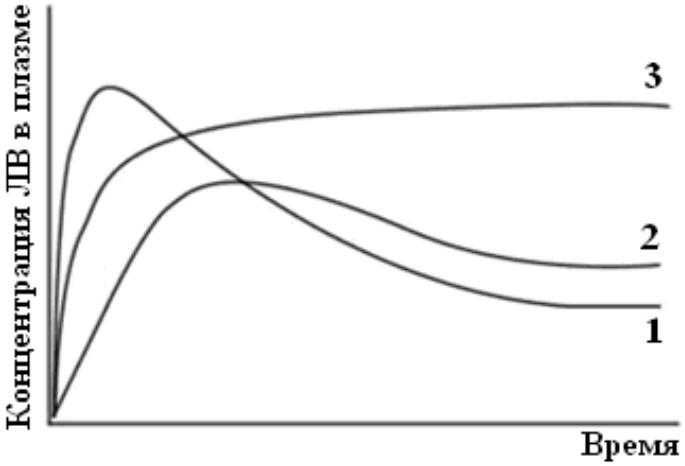


Рис. 3. Графики высвобождения лекарства: 1 — в традиционной лекарственной форме, 2 — в пролонгированной лекарственной форме, 3 — в лекарственной форме с контролируемым высвобождением.

Препарат в традиционной лекарственной форме (обычная таблетка) обеспечивает единичное и кратковременное высвобождение лекарства. В противоположность системам контролируемого высвобождения, в традиционных лекарственных формах скорость высвобождения препарата не контролируется [Frieberg, 2004]. Традиционные лекарственные формы представляют собой препарат, диспергированный в растворимых вспомогательных веществах. Препарат быстро высвобождается из лекарственной формы, при этом концентрация экспоненциально снижается до тех пор, пока не поступает следующая доза. Следовательно, концентрация в плазме и ткани меняется со временем волнообразно и необходимый для лечения уровень поддерживается лишь приблизительно [Ainaoui, 2002].

Лекарственные формы с пролонгированным высвобождением также обладают взрывным эффектом (высокой скоростью высвобождения ЛВ на первом этапе), хотя и менее значительным, чем традиционные лекарственные формы. Концентрация препарата в крови не может долго удерживаться на одном уровне и постепенно начинает снижаться. Такие препараты обладают кинетикой высвобождения первого порядка. Лекарственные системы с контролируемым высвобождением исключают скачки уровней концентраций препарата в крови, поддерживают постоянную терапевтическую концентрацию в течение длительного времени, в результате обеспечивается стойкий фармакологический эффект. Эти препараты имеют кинетический профиль нулевого порядка.

Лекарственные формы, пролонгированные и с контролируемым высвобождением, позволяют лекарствам с коротким уровнем полураспада высвобождаться с минимальными колебаниями в течение длительного промежутка времени и потенциально более низким уровнем токсичности [Berkland, 2002; Masood, 2016]. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением имеют ряд преимуществ, так как позволяют добиться равномерной скорости подачи ЛВ, оставаясь в пределах терапевтического коридора (рис. 4).

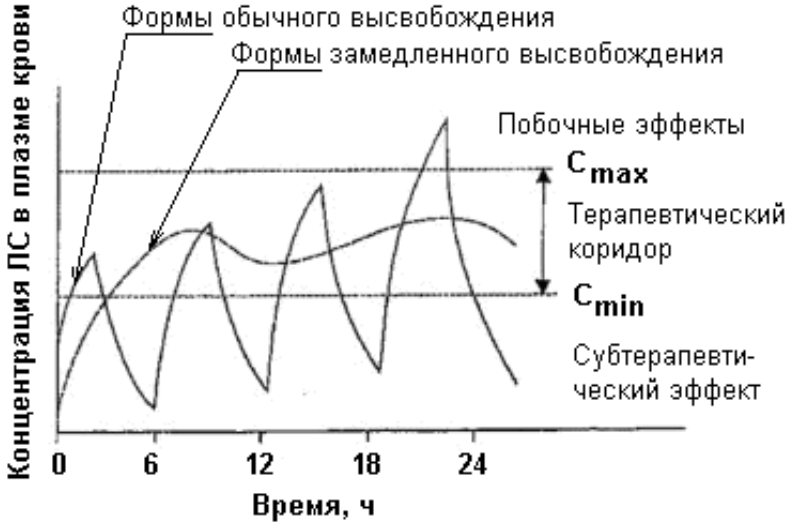


Рис. 4. Сравнительные кривые концентраций АФИ (активного фармацевтического ингредиента) в плазме крови после 4-кратного приема препарата ЛС (лекарственного средства) обычного высвобождения и 1-кратного приема препарата ЛС с контролируемым высвобождением.

Пути введения лекарственных форм. В зависимости от пути введения лекарственные формы с модифицированным высвобождением подразделяются на лекарственные формы депо и лекарственные формы ретард.

Лекарственные формы депо (от франц. depot — склад, откладывать) — это модифицированные лекарственные формы для инъекций и имплантаций, обеспечивающие создание в организме запаса лекарственного средства и его последующее медленное высвобождение.

Лекарственные формы депо, вводимые в кровоток, попадают в определённую тканевую среду, в которой они накапливаются, в отличие от изменяющейся среды желудочно-кишечного тракта. Преимуществом является то, что их можно вводить с более продолжительными интервалами (иногда до недели). В данных лекарственных формах замедление всасывания, как правило, достигается применением трудно растворимых соединений ЛВ (соли, эфиры, комплексные соединения), химической модификацией — например, микрокристаллизация, помещением ЛВ в вязкую среду (масло, воск, желатин или синтетическая среда), использованием систем доставки — микросферы, микрокапсулы, липосомы.

Современная номенклатура лекарственных форм депо включает [Коржавых, 2003]:

- инъекционные формы: раствор масляный, суспензию депо, суспензию масляную, суспензию микрокристаллическую, суспензию микронизированную масляную, суспензии инсулинов, микрокапсулы для инъекций, микросферы для инъекций;
- имплантационные формы: таблетки депо, таблетки подкожные, капсулы подкожные (капсулы депо), пленки интраокулярные, терапевтические системы глазные и внутриматочные.

Лекарственные формы ретард (от лат. retardo — замедлять, tardus — тихий, медленный) — энтеральные пролонгированные лекарственные формы, обеспечивающие создание в организме запаса лекарственного средства и его последующее медленное высвобождение. Применяются преимущественно перорально.

В зависимости от технологии получения различают лекарственные формы ретард двух принципиальных типов:

- лекарственные формы ретард резервуарного типа
- лекарственные формы ретард матричного типа.

Формы резервуарного типа представляют собой ядро, содержащее лекарственное вещество, и полимерную (мембранную) оболочку, которой определяется скорость высвобождения. Резервуаром может быть единичная лекарственная форма (таблетка, капсула) или лекарственная микроформа, множество частиц которой образует конечную форму.

Формы ретард матричного типа содержат полимерную матрицу, в которой распределено лекарственное вещество, и часто имеют вид обычной таблетки.

Микросферы для инъекций.

Разрабатываемые в данной работе микросферы для инъекций по современной номенклатуре относятся к лекарственным формам депо с модифицированным высвобождением.

Системы на основе микрокапсул и микросфер ЛФ с модифицированным высвобождением могут быть представлены единой системой из множественных микросфер или микрокапсул. Каждая микросфера или микрокапсула представляет собой матриксную или резервуарную мини-систему, содержит ЛВ и полимер, контролирующий скорость высвобождения ЛВ.

Необходимо подчеркнуть значимость разработки лекарственных систем на основе микросфер для инъекций. Такие лекарственные формы имеют огромное преимущество в лечении социально значимых заболеваний, например, таких как шизофрения, так как позволяют более активно использовать инъекционные лекарственные средства для поддерживающего лечения. С этой целью применяют глубокие внутримышечные инъекции нейролептиков. Кроме того, значительное внимание уделяется разработке противотуберкулезных полимерных лекарственных форм с контролируемым высвобождением рифампицина [Kassab, 1997; Tomoda, 2005]. Ведутся исследования по инкапсулированию в микросферы антибиотиков, таких как гентамицин [Li, 2005], тетрациклин [Sendil, 1999], криптофлоксацин [Dillen, 2004], амоксициллин [Xu, 2008], пефлоксацин [Andreopoulos, 2000], хлоргексидин [Yue, 2004] и др.

Разрабатываются полимерные лекарственные формы с контролируемым высвобождением противовоспалительных препаратов индометацина [Roy, 1992; Uchida, 2002] и ибупрофена [Siegel, 1989].

Ведутся исследования по разработке систем доставки и переноса генов, а также ДНК-вакцин [Singh, 2002; Dunne, 2003; Kumar, 2004; Cai, 2005]. Уже существуют пролонгированные лекарственные формы доставки гормонов для решения различных эндокринологических проблем — таких как диабет, репродуктивные дисфункции, проблемы роста [Buntner, 1998; Carino, 1999; Jeon, 2006]. Однако на нашем фармацевтическом рынке инъекционные лекарственные системы на основе микросфер представлены импортными производителями.

2. МИКРОСФЕРЫ-ДЕПО ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЦИТОСТАТИКОВ

2.1 Микросферы как перспективные системы адресной доставки цитостатиков

Микросферы включают в свою полимерную матрицу химиотерапевтические лекарственные вещества, которые медленно высвобождаются в течение длительного периода времени. Полимерный матрикс обеспечивает защиту цитостатика и позволяет неустойчивым молекулам ЛВ в сохранности достигать локального участка воздействия. Неоспоримым преимуществом является то, что многократная доза химиотерапевтического лекарственного вещества может быть введена с помощью одной единственной инъекции.

Микросферы могут вводиться перорально и инъекционно [Kipper, 2002]. Лекарственное вещество заключается в матрицу полимера, которая позволяет проникнуть препарату через поры, сформированные во время уплотнения сферы. Дозой высвобождения химиотерапевтического лекарственного препарата можно управлять с помощью варьирования молекулярного состава полимера и отсюда связанных с ним физических и химических свойств системы доставки «лекарство – полимер». В частности, регулирование числа гидрофильных и гидрофобных областей в молекулярной цепи полимера путем введения сополимеров позволяет управлять высвобождением препарата [Berkland, 2002]. Однако, большое количество гидрофильных областей может привести к начальному взрывному эффекту, во время которого существенная часть химиотерапевтического инкапсулированного лекарства может быть высвобождена [Salman, 2003]. Такой процесс нежелателен для химиотерапии, поскольку препарат не сможет осуществлять процесс длительного высвобождения и такой взрывной эффект может привести к увеличению токсичности препарата [Hatefi, 2002].

Размер микросфер также является детерминирующим фактором высвобождаемой дозы препарата. Крупные сферы имеют тенденцию высвобождать инкапсу-

лированное лекарственное вещество медленнее, чем меньшие по размеру микросферы. Доза высвобождения ЛВ уменьшается с увеличением диаметра сферы из-за уменьшения в соотношении «поверхности к объему» с увеличением размера частицы. Варьирование размера микросфер позволяет достигать желательной дозы высвобождения. Также высвобождением ЛВ можно управлять, смешивая микросферы различного размера [Kipper, 2002].

Другим параметром, влияющим на скорость высвобождения, является молекулярная масса полимера. Так, низкомолекулярные полимеры образуют пористые микросферы, которые быстро высвобождают препарат. Микросферы из высокомолекулярного полимера более плотные и дают более медленный профиль высвобождения. Желательную терапевтическую дозу высвобождения можно моделировать, комбинируя микросферы на основе полимеров разных молекулярных масс. Таким образом, учитывая вышеприведенные факторы, можно создавать системы контролируемого высвобождения на основе микросфер, которые способны уменьшить колебания концентрации цитостатика в крови по сравнению с традиционным препаратом. Микрокапсулированная форма дозирования химиопрепарата требует меньшей частоты введения, обеспечивает устойчивый профиль высвобождения и приводит к уменьшению уровня токсичности и отрицательных воздействий.

Для создания химиотерапевтических лекарственных систем с контролируемым высвобождением необходимым требованием является их биосовместимость и биобезопасность для организма. Время деградации полимерных микросфер колеблется от нескольких дней до нескольких лет и определяется кристалличностью, молекулярной массой и гидрофобностью мономера. Поэтому, изменяя эти физические свойства, можно изменять степень доступа воды к эфирным группам, и, следовательно, управлять скоростью деградации.

Лекарственные системы с контролируемым высвобождением характеризуются прежде всего определённым видом математической зависимости количества высвободившегося лекарственного вещества от параметров, влияющих на процесс высвобождения. Описывая кинетику высвобождения, инкапсулированного химио-

терапевтического лекарственного вещества, можно выделить три стадии высвобождения: на первой стадии наблюдается взрывной эффект — высвобождение с высокой скоростью, на второй стадии происходит относительно медленное равномерное высвобождение и на заключительной третьей стадии происходит быстрое высвобождение, приводящее к полному выходу цитостатика.

Существуют два основных механизма, посредством которых может осуществляться высвобождение ЛВ из биополимерных систем: диффузия и деградация. Диффузия осуществляется через поры полимера, а также между молекулярными цепями полимера. Первая стадия высвобождения (взрывной эффект) происходит за счет диффузионного механизма [Brannon-Peppas, 1997]. Вторая стадия происходит за счет двух механизмов, находящихся в равновесии: диффузии и деградации полимера, при которой происходит уменьшение его молекулярной массы и, как следствие, повышение мобильности диффундирующего через полимер ЛВ. Деградация большинства биоразлагаемых полимеров осуществляется за счет гидролиза в объеме полимера и за счет неспецифической ферментативной биодеструкции. На поздних сроках высвобождения деградация играет решающую роль, так как высвобождение ЛВ с относительно равномерной скоростью из биополимерной системы происходит благодаря деградации. Третья стадия высвобождения происходит за счет быстрой деградации полимера, потерявшего свою механическую стабильность, и выхода оставшегося ЛВ [Wada, 1995; Husmann, 2002; Faisant, 2006].

2.2 Направленная доставка цитостатиков с помощью биополимерных наночастиц

Следует отметить, что в настоящее время в фармакологии принято считать наночастицами, частицы до 100 нм диаметром, а субмикрочастицами — до 300 нм, т.к. их физико-химические и биологические свойства уже при этих размерах существенным образом изменяются. Полимерные суб- и наночастицы обладают новыми уникальными свойствами, такими как способность к преодолению физиологических барьеров (например, эпителиальной базальной мембраны), повышенная вса-

сываемость слизистыми оболочками бронхов, носоглотки, ротовой полости и желудка, облегченная способность к проникновению через клеточную мембрану как путем эндоцитоза, так и через мембранные каналы, невосприимчивость иммунными клетками (макрофагами, лимфоцитами), и как следствие всего перечисленного, суб- и наночастицы придают повышенную биодоступность инкапсулированным ЛВ [Brigger, 2002; Gu, 2007; Masood, 2016]. Однако в некоторых случаях возможна и пассивная направленная доставка цитостатиков — за счет изменения свойств эндотелия. В то время как эндотелиальные клетки существующих кровеносных сосудов в нормальных тканях обладают низкой проницаемостью, кровеносные сосуды внутри опухоли высокопроницаемые — что позволяет попадать внутрь опухоли биополимерным системам большого диаметра. Данный подход позволяет осуществлять пассивную направленную доставку противоопухолевых препаратов к опухоли.

С целью получения систем направленной доставки ЛВ к опухолевым клеткам, к поверхности биополимерных наночастиц пришивают различные лиганды направленного действия: антитела к опухолевым маркерам (например, рецептор эпидермального ростового фактора-2), аптомеры, лектины, гиалуроновую кислоту, фолиевую кислоту. Для того, чтобы ковалентно пришить лиганды используют сополимеры полиэфиров с полиэтилен-гликолем [Mo, 2005; Cheng, 2007; Yadav, 2007; Sun, 2008]. Сами противоопухолевые ЛВ также можно ковалентно пришить к биополимерным наночастицам [Yoo, 2004].

2.3. Использование наночастиц металлов в полимерных управляемых системах адресной доставки

С помощью полимеров возможно соединение ЛВ с молекулами железа в одной лекарственной системе. Это позволяет с помощью магнитного поля доставлять лекарство непосредственно в область поражения.

Магнитно-управляемые ферро-магнитные полимерные наночастицы являются потенциальным переносчиком химиотерапевтического агента к органу-мишени. Поэтому системы управляемой доставки цитостатиков на основе композитных наночастиц способны снизить побочные эффекты и повысить эффективность

химиопрепарата. Иллюстрацией этому является работа корейских ученых отделения химической и биомолекулярной инженерии Сингапура [Hu, 2006]. Ими были синтезированы и исследованы на цитотоксичность *in vitro* магнитные нано-частицы с включением тамоксифена на основе полилактида. Тамоксифен является главным из широко используемых лекарственных средств и единственным химиотерапевтическим лекарством, используемым в профилактике онкологических заболеваний яичников у здоровых женщин с высоким риском этой патологии. Тамоксифен действует как анти-эстроген с помощью связывания эстрогенных рецепторов. Тамоксифен-эстроген-рецепторный комплекс связывается с ДНК и блокирует определенную последовательность транскрипции мРНК [Cameron, 1997]. В связи с этим тамоксифен широко и успешно используется при онкопатологии яичников. Однако тамоксифен также имеет и побочные эффекты и важнейшим побочным эффектом системного воздействия тамоксифена является увеличение риска рака эндометрия матки. Другими побочными эффектами являются возникновение рака печени, легочная эмболия, венозный тромбоз, ретинопатология и др. [de Lima, 2003].

Увеличение риска возникновения рака эндометрия матки оказалось связано с повышением дозировки тамоксифена. Другие побочные эффекты тамоксифена могут быть связаны с его активным метаболизмом и ассимиляцией в различных тканях организма [Kisanga, 2004]. Поэтому негативные побочные эффекты химиотерапии могут быть минимизированы с помощью уменьшения лекарственной концентрации тамоксифена в других органах и тканях организма. Следовательно, было бы логичным в этом случае применить адресную химиотерапию. С помощью воздействия внешнего магнитного поля магнитные лекарственные частицы были доставлены к органу-мишени и на протяжении длительного времени поддерживали высокую концентрацию химиотерапевтического агента в тканях органа-мишени, без появления побочных эффектов в других здоровых органах и в целом организме. В этой работе были синтезированы композитные наночастицы средним размером 200 нм. Супермагнетические свойства обеспечивались с помощью Fe_3O_4 наноча-

стиц диаметром 6 нм, инкапсулированными в полилактидный матрикс. Эффективность инкапсулирования для тамоксифена и Fe_3O_4 наночастиц составила 60 и 80% соответственно (рис.5) [Hu, 2006].

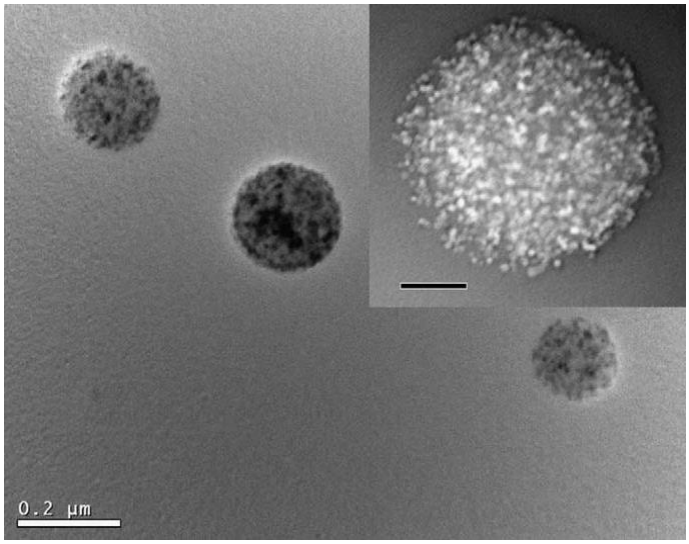


Рис. 5. Наночастицы с включением оксида железа Fe_3O_4.
Сканирующая электронная микроскопия.

Полученные композитные наночастицы были инкубированы с клеточной культурой MFC-7 в течение 4 часов. После этого была проведена оценка морфологии клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 6) [Hu, 2006].

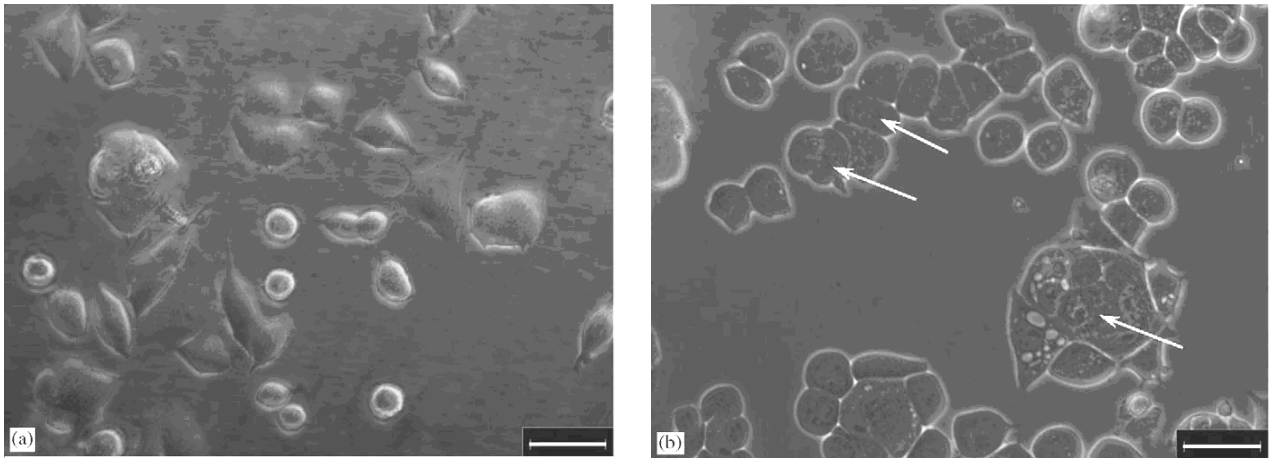


Рис. 6. Клеточная культура MFC-7 до и после 4 часов инкубации с наночастицами. Фазово-контрастная микроскопия.

Исследование цитотоксичности показало, что после инкубации клеточной культуры MFC-7 с композитными наночастицами в течение 4 часов количество убитых клеток составило 80% (рис. 7) [Hu, 2006].

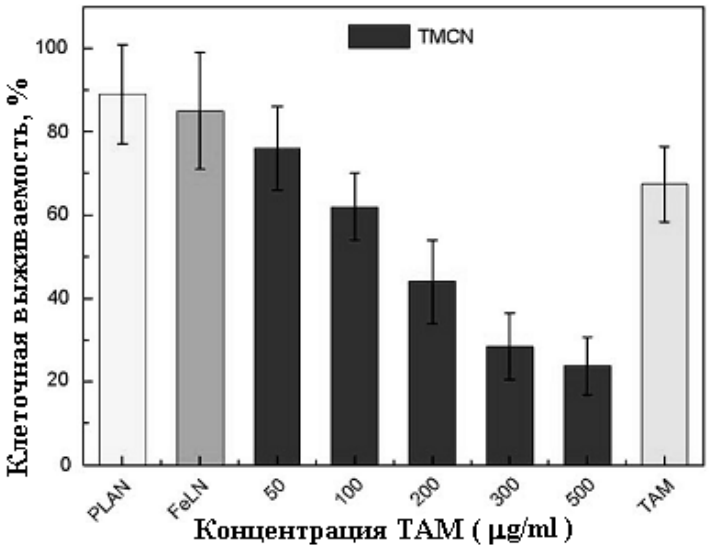


Рис. 7. Цитотоксичность различных концентраций тамоксифена (TAM).

Эти результаты показали, что тамоксифен-полимерные магнитные наночастицы имеют хороший потенциал для адресной доставки тамоксифена.

Исследования в области адресной доставки химиотерапевтических лекарств становятся все шире [Naito, 2018]. В противоположность системной химиотерапии, полимерные частицы обеспечивают высокую локальную концентрацию химиотерапевтического вещества, и требуют применения только 50 или 20% от обычной дозировки. В клиниках Сан-Диего (США) успешно прошли клинические испытания с использованием различных химиотерапевтических агентов [Rudge, 2000; Rudge, 2001].

2.4. Методы получения микросфер

Диаметр и морфология микросфер зависят как от метода получения микросфер, так и от использования различных добавок к основному полимеру. Иллюстрацией этого может быть работа корейских ученых. Сотрудниками института ис-

следования материалов и биоинженерии (Сингапур) были изготовлены микросферы с включением паклитаксела в полилактид-гликолида с помощью сухой технологии рассеивания — техники, которая широко применяется для приготовления фармацевтических и биологических субстанций [Mu, 2001]. Эта техника применима как для гидрофильных, так и для гидрофобных полимеров. Более того, система адресной доставки на основе полимерных микросфер, изготовленная с помощью этой методики, потенциально может использоваться для оральной доставки лекарственных веществ. Для изготовления полилактид-гликолидных (PLGA) микросфер использовались такие добавки, как ПВА (PVA), желатин (Gelatin), ДПФХ (дипальмитоилфосфатидилхолин, DPPC) и холестерол (Cholesterol) для повышения эффективности инкапсулирования паклитаксела. Диаметр и морфология полученных микросфер изменялись в зависимости от применения добавок (рис. 8, 9) [Mu, 2001].

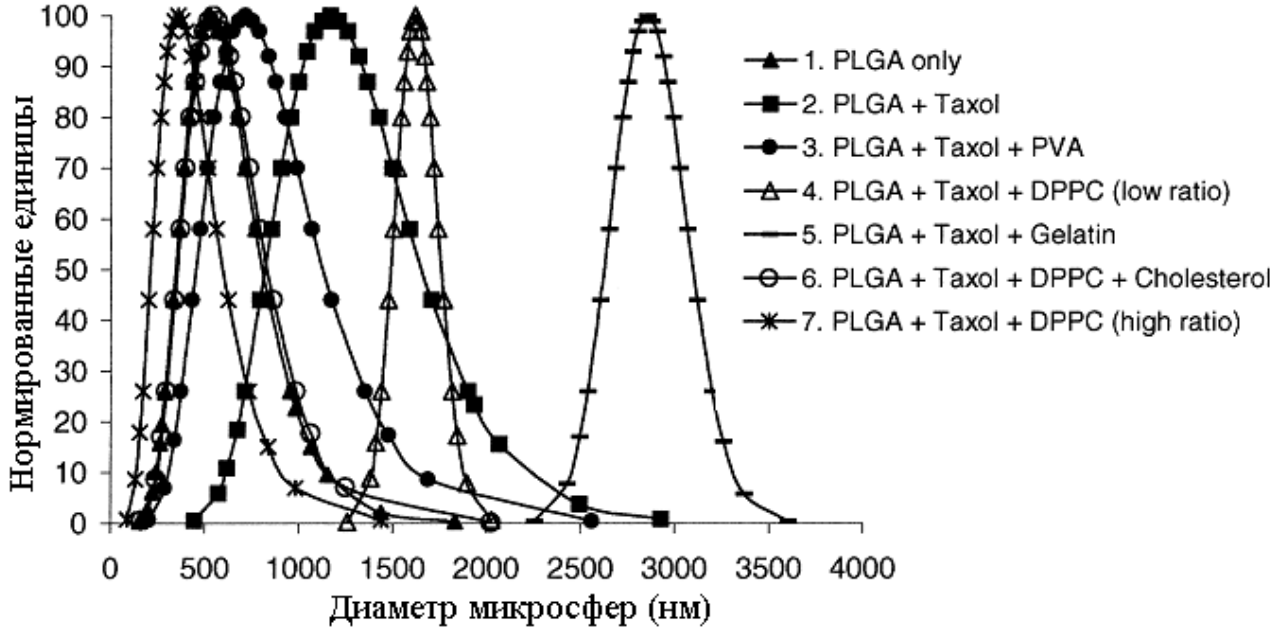


Рис. 8. Зависимость величины диаметра микросфер с включением паклитаксела от варьирования состава полимерной матрицы.

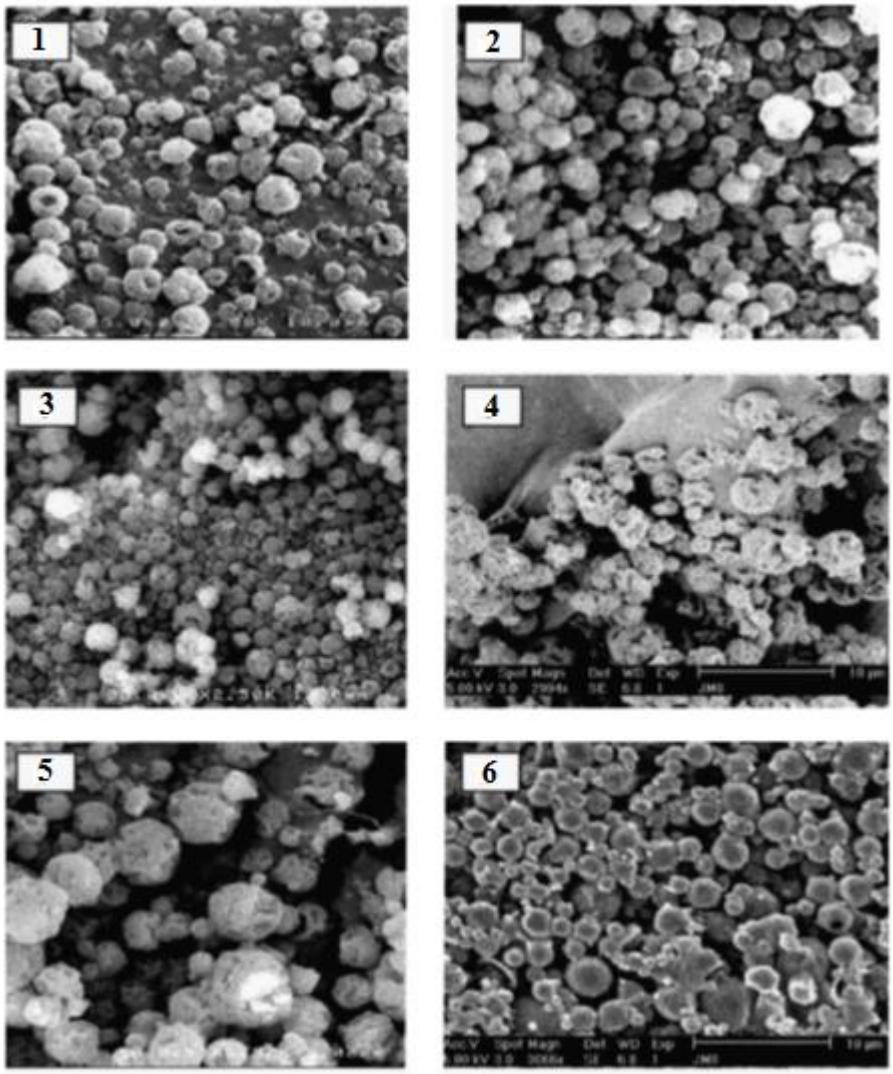


Рис. 9. Морфология различных типов микросфер с включением паклитаксела в зависимости от состава полимерной матрицы:

(1) только полилактид-гликолид;

(2) полилактид-гликолид + паклитаксел;

(3) полилактид-гликолид + паклитаксел + поливиниловый спирт;

(4) полилактид-гликолид + паклитаксел + ДПФХ;

(5) полилактид-гликолид + паклитаксел +желатин;

(6) полилактид-гликолид + паклитаксел + ДПФХ + холестерол.

Разные методы приготовления микросфер позволяют решить различные технологические задачи. Так, при нестабильности действующего лекарственного ве-

щества, т.е. при коротком времени полураспада его молекулы, эффективен быстрый метод приготовления микросфер, называемый эвапорацией. Так, ученые Венского института фармацевтических технологий (Австрия) с помощью эвапорации синтезировали полилактид-гликолидные микросферы с включением камптотезина (СПТ) — известного как ингибитор топоизомеразы, используемого благодаря своей химиотерапевтической активности для лечения многих онкозаболеваний человека [Ertl, 1999]. СПТ был выделен в 1966 году из дерева Camptotheca acuminata и вызвал большой интерес благодаря проявленной высокой цитотоксической активности, выявленной против ряда экспериментальных опухолей *in vitro* и *in vivo*. Однако было обнаружено, что СПТ обладает низкой биодоступностью. Известно, что в сыворотке человека время полураспада молекулы СПТ составляет 12 минут [Burke, 1993]. Поэтому возникла идея разработать систему направленной доставки для СПТ химиотерапии. На фотографии (рис. 10) мы видим полилактид-гликолидные микросферы, приготовленные с помощью метода эвапорации [Ertl, 1999]. Микросферы были высушены, заморожены жидким азотом и лиофилизированы.

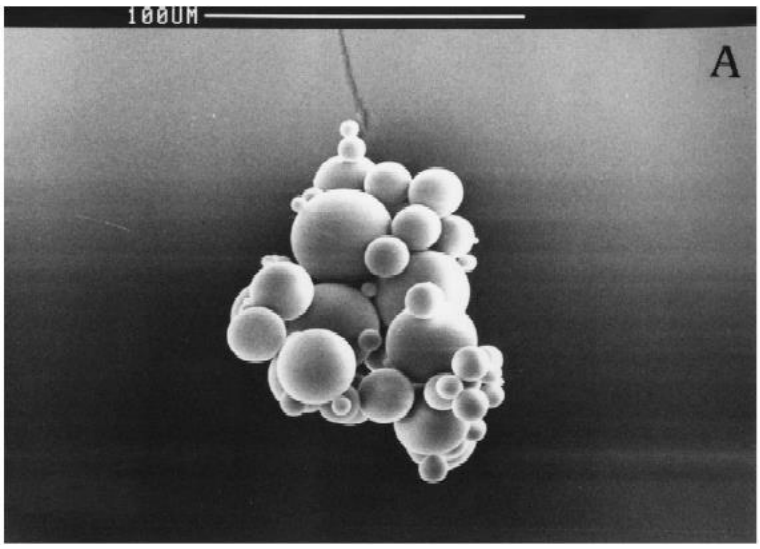


Рис. 10. Фотография микросфер, содержащих 1,2 % СПТ (СЭМ).

Эффективность инкапсулирования, достигнутая этим методом, составила от 78% до 99%. Благодаря полимерному матриксу также удалось стабилизировать молекулу СПТ Это показали результаты проведенного контроль-релиза, откуда

видно, что постоянный высокий уровень высвобождения поддерживается более 160 часов (рис. 11) [Ertl, 1999].

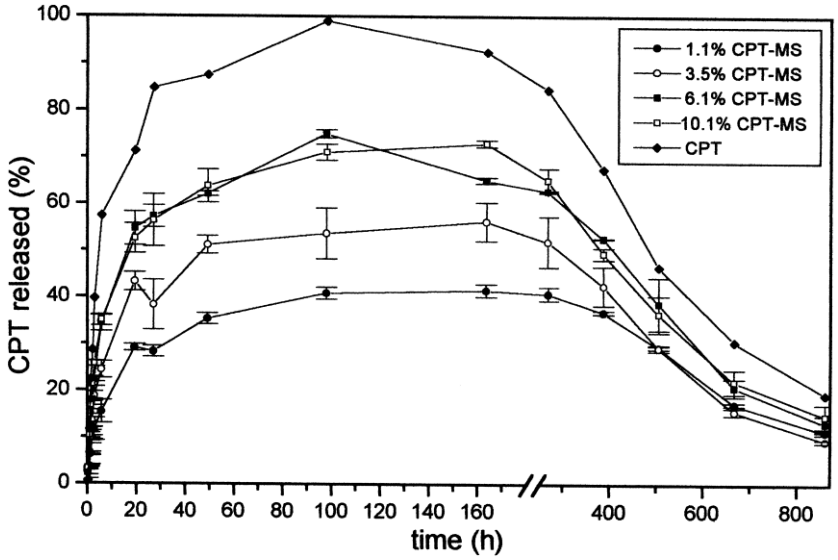


Рис. 11. Высвобождение СПТ из полилактид-гликолидных микросфер.

Другим примером увеличения биодоступности и повышения стабильности микросфер путем применения метода эвапорации является работа французских ученых университета Ангерса [Painbeni, 1998]. В этой работе метод эвапорации был использован для создания микросфер с включением BCNU (бисхлорэтил-нитрозомочевина) в целях использования их в качестве интракраниальных имплантов с контролируемым высвобождением (рис. 12).

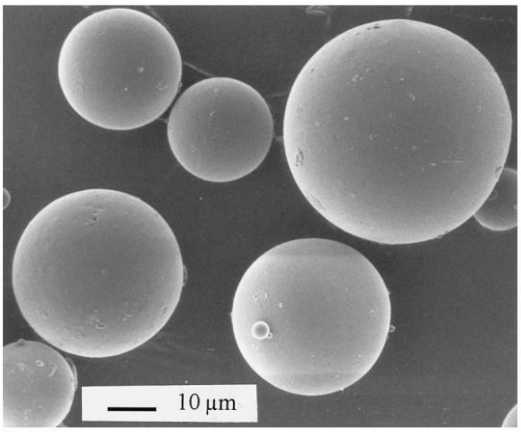


Рис. 12. Микрофотография 22,2 % BCNU-содержащих полилактид-гликолидных микросфер (СЭМ).

Главной проблемой в лечении опухолей мозга часто является неспособность химиотерапевтических агентов проникать в мозг из-за наличия гематоэнцефалического барьера. Системы направленной доставки на основе полимеров могут быть имплантированы в мозг и локально высвобождать лекарства в течение длительного промежутка времени. Имплантация в мозг полимерных систем контролируемого высвобождения вызывает усиление воздействия на опухоль [Brem, 1995]. В работе английских ученых была продемонстрирована биосовместимость и биодеградабельность полилактид-гликолидных микросфер, имплантируемых в мозговую ткань [Menei, 1993].

Исследователями был использован такой химиотерапевтический агент, как BCNU, так как он обладает антинеопластической активностью, но имеет короткое время полураспада. Метод эвапорации позволил стабилизировать молекулу BCNU и использовать метод адресной доставки. Благодаря полимерному матриксу удалось добиться, что BCNU, инкапсулированная в микросферах. оставалась стабильной на протяжении 6 месяцев при $T = -18\,^{\circ}\mathrm{C}$ и в течение 3 месяцев при $T = +4\,^{\circ}\mathrm{C}$.

Таким образом, метод эвапорации позволяет решить такие трудные для химиотерапии задачи, как увеличение стабильности и повышение биодоступности.

2.5 Примеры получения микросфер с цитостатиками

Во всем мире активно идет поиск новых лекарственных химиотерапевтических форм пролонгированного действия на основе биоразлагаемых полимеров. Однако в основном это формы на основе полилактидов.

Так, учеными национального университета Сингапура были созданы полимерные микросферы на основе полилактид-гликолида, содержащие норкантаридин, предназначенные для химиоэмболизации опухолей печени [Liu, 2006].

Испанские ученые создали микросферы, содержащие композит полилактидов и полилактид-гликолидов с включением химиотерапевтического лекарственного вещества флуороцил, которые показали хороший цитотоксический эффект. Более

того, оценивая через два месяца состояние микросфер, исследователями было обнаружено, что содержание полилактидов и полигликолидов в микросферах было одинаково, однако через 3 месяца содержание полилактид-гликолидов к полилактидам составило 75:25, что говорит об ускоренной биодеградации полилактидов по сравнению с полилактид-гликолидами [Sastre, 2007].

Японскими учеными университета Киматото были синтезированы микросферы на основе полимолочной кислоты, содержащие гидрохлорид акларубицина. Данные микросферы воздействовали на гепатоцеллюлярную карциному *in vitro*. Эксперименты проводились также и на людях. Однако в этих экспериментах был отмечен высокий первоначальный взрывной эффект и продолжительность высвобождения составила всего 72 часа [Ichihara, 1989].

В лаборатории фармакологических исследований отделения фармакологических наук Сагара (Индия) совместно с институтом ядерной медицины Нью Дели (Индия) удалось создать и охарактеризовать наночастицы из полилактидов с гиалуроновой кислотой, инкапсулированные доксорубицином [Yadav, 2007]. Ими был синтезирован полимер: гиалуроновая кислота-полиэтиленгликоль-полилактид-гликолид. На основе этого полимера были изготовлены наночастицы с включением доксорубицина. Также на основе другого полимера монометокси-полиэтилен-гликоля были изготовлены наночастицы с включением доксорубицина. Два вида наночастиц были исследованы в экспериментах по высвобождению доксорубицина. Высвобождение доксорубицина происходило при *pH* 7,4 с использованием диализной мембраны. Тканевая реакция была проверена на мышах Эрлиха. Мышам внутривенно делали инъекции доксорубициновых наночастиц. Результаты показали, что полимер, содержащий гиалуроновую кислоту, позволяет высвобождать доксорубицин более равномерно в течение более длительного промежутка времени (увеличивает длительность высвобождения на 15% до 180 часов). Авторы делают выводы, что уникальные биологические и биохимические свойства комплекса биополимера с гиалуроновой кислоты позволяют создавать дополнительное депо для переноса лекарственных веществ [Yadav, 2007].

Ученые пытаются разработать полимерные наночастицы с включением цитостатиков для лечения онкозаболеваний [Kanamala, 2016]. Наночастицы обладают уникальными свойствами, позволяющими успешно решать различные задачи. Диаметр человеческой клетки 10-20 мкм. Размер клеточных органелл колеблется от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров. Наночастицы могут взаимодействовать с биомолекулами клеточной поверхности, а также внутри клетки с органеллами и биомолекулами, изменяя поведение и биохимические свойства этих биомолекул.

Отличным примером использования уникальных свойств наночастиц является работа корейских ученых отделения химии и биомолекулярного инжиниринга национального института Сингапура [Dong, 2005]. Им удалось создать полилактид-гликолидные-монтморилонидные наночастицы для оральной доставки химиотерапевтического лекарства паклитаксела. Однако такой цитостатик, как паклитаксел не является орально биодоступным, так как практически не всасывается в желудочно-кишечном тракте. Обнаружено, что оральная биодоступность паклитаксела составляет менее 1%. Это происходит вследствие того, что паклитаксел элиминируется с помощью цитохрома P450. Поэтому исследуются возможные композиции для оральной доставки паклитаксела и других химиотерапевтических лекарств. Главная идея состояла в том, чтобы применить ингибиторы цитохрома P450, такие, например, как циклоспорин А. Однако ингибиторы также элиминируются из тела. Более того, большинство ингибиторов цитохрома P450 имеют побочные эффекты. В связи с этим возникла идея применения полимерных наночастиц благодаря их способности к адгезии. Наночастицы из биодеградируемых полимеров с включением цитостатиков представляют собой химиотерапевтическое инженерное микроустройство. Путем адгезии и абсорбции на клеточной мембране наночастицы проникают внутрь клетки и таким образом ускользают от узнавания системой цитохромов P450. Возрастает их химиотерапевтическая эффективность и уменьшаются побочные эффекты паклитаксела. Инкапсулированный цитостатик выходит из на-

ночастиц посредством контролируемого высвобождения. В зависимости от индивидуальных нужд каждого пациента может быть достигнуто специфическое фармакокинетическое высвобождение. Способность наночастиц содержащих паклитаксел к адгезии исследовалась на клеточной культуре двух человеческих линий: Caco-2 и HT-29 с помощью флуоресцентной спектроскопии. Размер наночастиц определялся с помощью лазерной световой сканирующей микроскопии и составил порядка 30 нм (рис. 13) [Dong, 2005]. Исследования показали, что наличие в полимерном химиотерапевтическом микроустройстве такого компонента, как монтмориллонит, способно значительно увеличить адгезию и усилить захват клетками наночастиц.

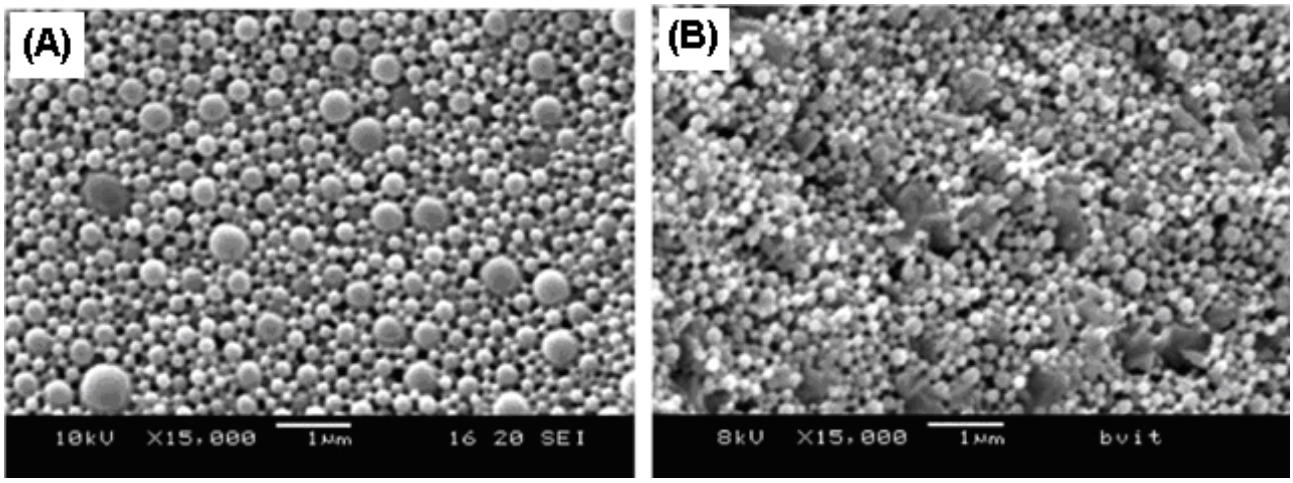


Рис. 13. Микрофотография паклитаксел-содержащих наночастиц на основе смеси полимеров полилактидгликолида с монтмориллонитом.

Ученые отделения фармакологии Загазигского Университета (Египет) совместно со школой фармацевтики Гарвардского Университета Вашингтона (США) создали биодеградируемые микросферы с включением анастрозола для лечения рака яичников [Zidan, 2006]. Многие онкопатологии яичников являются эстрогензависимыми и могут быть стимулированы под воздействием эстрогена. Лечение включает уменьшение уровня эстрогенов с помощью использования антиэстрогенов и противоопухолевых агентов. Анострозол является нестероидным ингибито-

ром эстрогенов в дозировке 1 мг орально 1 раз в день. Методом эмульсии-экстракции были получены биодеградируемые микросферы на основе полилактидгликолида с включением Анострозола. Анализ дифференциальной сканирующей калориметрии показал, что Анострозол существует в микросферах в качестве аморфной или частично кристаллизованной массы. Результаты контроль релиза также подтвердили, что использование полилактид-гликолидных частиц с включением анострозола может быть альтернативным методом для продолжительной химиотерапии при лечении онкопатологий яичников [Zidan, 2006].

Ученым отделения химического инжиниринга национального университета Сингапура удалось создать полимерное устройство с контролируемым высвобождением на основе двухслойных микрочастиц с включением Этанидазола (рис. 14) [Yip, 2003].

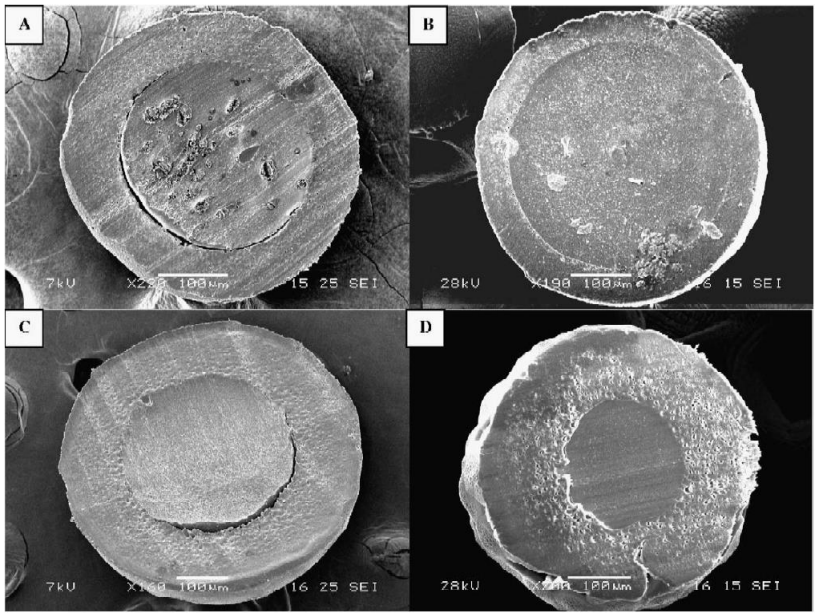


Рис. 14. Микрофотография двухслойных микросфер, разрезанных поперек (сканирующая электронная микроскопия). (A) – этанидазол содержащие микросферы, полилактиды-полигликолиды (2:1); (B) – чистые микросферы, полилактиды-полигликолиды (1:1); (C) – чистые микросферы, полилактиды-полигликолиды (2:1); (D) – чистые микросферы, полилактиды-полигликолиды (2,5:1)

Данное полимерное устройство отвечает следующим характеристикам: увеличивает инкапсулированную эффективность Этанидазола; имеет профиль высвобождения, соответствующий различным этапам радиационного облучения во время радиотерапии — берст-эффект в первые 10 часов, затем медленная и постоянная фаза высвобождения и в конце быстрая фаза деградации; деградационный профиль устройства по времени совпадает с временем достижения общей дозы, получаемой за период радиотерапии, равной 25 кГр (рис. 15).

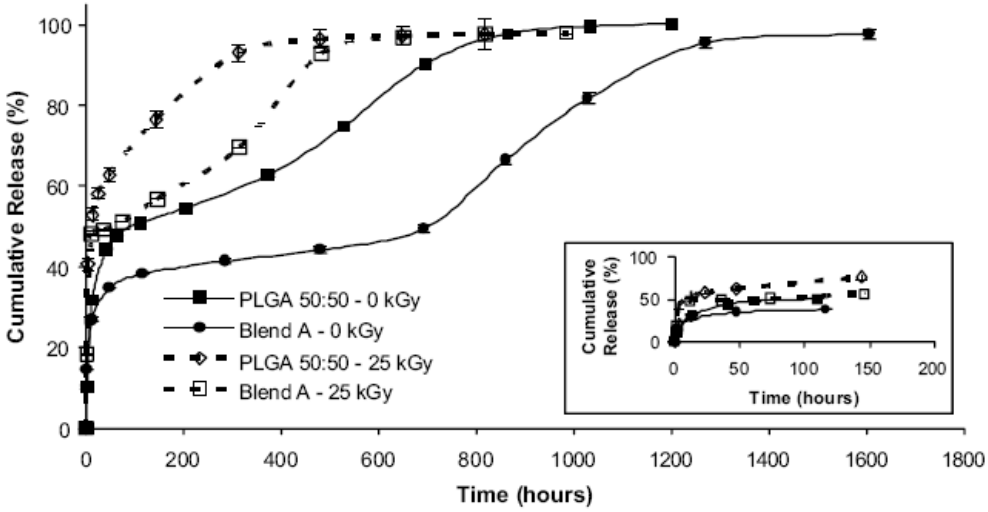


Рис. 15. Профили высвобождения этанидазола из полилактид-гликолидных микросфер, синхронизированные с дозами облучения при проведении лучевой терапии.

В России также проводится немало исследований, направленных на поиск новых форм полимерных химиотерапевтических препаратов. Так, ученым из Томска [Антипов, 2009] удалось создать малотоксичную магниточувствительную форму липосом с включением цисплатина, и доказать, что синтезированный композит вызывает сокращение аденокарциномы Эрлиха.

Пример создания препарата направленной адресной доставки показали калужские специалисты [Белый, 2009]. Так, для лечения внутриглазных новообразований ими был предложен метод введения липосом, содержащих различные химиотерапевтические препараты в задний отрезок глаза.

Специалисты московского института Биоорганической химии разработали метод введения мышам липосом, содержащих липофильные коньюгаты метотрексата для лечения Т-лимфолейкоза [Водовозова, 2009].

В научном онкоцентре им. Блохина проводится стандартизация вновь созданных химиотерапевтических лекарственных форм, а также последовательная передача их на доклинические, клинические исследования и внедрение препаратов в производство. Специалистами этого центра разработана методика получения иммунолипосом с включением цитостатических препаратов доксорубицина, тиосенс и лизомустина и доказан их цитостатический эффект на клеточную линию Зуркат ЛД50 [Григорьева, 2009]. Также в этом учреждении созданы термолипосомы с включением цитостатика доксорубицина, которые отличаются повышенной агрегационной устойчивостью, благодаря подобранному оптимальному весовому соотношению препарат/липиды. Также ими было изучено влияние криопротекторов для повышения стабильности липосом при замораживании и лиофилизации (известно, что после замораживания происходит вытекание цитостатика из липосом) [Тазина, 2009].

Институт химического разнообразия предлагает для лечения онкологических заболеваний использование наноразмерного полимерного комплекса паклитаксела размером, не превышающим 50 нм. В серии экспериментов наноразмерный полимерный комплекс был апробирован и подтвердилось улучшение фармакологических свойств по сравнению с традиционной формой [Соснов, 2009].

Учеными Черновицкого университета (Украина) была разработана липосомальная форма метиламин-урацила. В качестве модели новообразования использовали карциному Герена крыс. Выявилось, что использование данной липосомальной формы проявляет цитостатическое действие даже на терминальной стадии онкогенеза [Марченко, 2009].

Специалистами института по изысканию новых антибиотиков им. Гаузе (Москва) удалось создать форму доксорубицина, ассоциированную с полибутилцианоакрилатными наночастицами. Такая форма доксорубицина, по сравнению с

традиционной, изменила его токсикологический профиль. Так, гастроинтестинальная и гематотоксичность усилились, в то время как кардио и тестикулярная токсичность ослабела [Трещалин, 2009].

Успехи российских ученых внушают оптимизм в лечение онкологических заболеваний. Однако, в основном создаются липосомальные формы цитостатиков, что не очень удобно в использовании. Химиотерапия часто требует длительного лечения и поэтому стабильность лекарственных препаратов здесь играет решающую роль. В этом плане создание микросферных форм могло бы дать более значимые результаты чем использование липосом.

2.6. Противоопухолевая эффективность биополимерных микросфер

Биополимерные системы на основе микросфер и наносфер с цитостатиками были исследованы с целью использования для терапии различных онкологических заболеваний. Было показано, что введение биополимерных микросфер с инкапсулированными ПОЛВ приводит к поддержанию терапевтической концентрация противоопухолевых ЛВ в плазме крови в течение 10-20 суток [Ichihara, 1989; Singh, 1997; Machida, 2000; Sastre, 2007].

Было показано, что микросферы из сополимера полимолочной и полигликолевой кислот с инкапсулированным норкантаридином или акларубицином при введении в кровеносный сосуд, снабжающей кровью опухоль печени с целью хемоэмболизации, демонстрируют большую эффективность в подавлении роста опухоли, чем водный раствор ЛВ или чистые биополимерные микросферы [Ichihara, 1989; Liu, 2006]. Была показана также перспективность использования микросфер с камптотецином для лечения рака легких, т.к. при внутривенном введении микросферы аккумулируются в легких [Huo, 2005]. Была продемонстрирована эффективность микросфер с инкапсулированными метотрексатом и паклитакселом при пролонгированном подавлении роста опухоли внутрибрюшинной саркомы у мышей и крыс [Singh, 1997; Liggins, 2001].

Опубликованные на сегодняшний день исследования показывают, что единственная инъекция биополимерной системы, коньюгированной с доксорубицином,

по эффективности сравнима с каждодневными инъекциями свободного доксорубицина. В качестве опухолевых моделей *in vivo* использовались клеточные линии лимфомы мышей EL4, имплантированных подкожно. Препараты вводят внутрь опухоли на 7-10 день при размере опухоли примерно 2 мм^2. Лечение проводится на 10 и 11 день после имплантации опухоли. Контрольным группам мышей вводят либо фосфатно-солевой буфер в соответствующем объеме (не более 100 мкл) или свободный противоопухолевый препарат. Размер опухоли уменьшался в течение более 12 дней после единственной инъекции биополимерной системы, коньюгированной с доксорубицином [Yoo, 2004].

В других исследованиях использовались крысы-самцы породы Wistar. В качестве опухолевой модели использовалась глиома 9-L, имплантированная внутрибрюшинно. Раствор паклитаксела (100 мг 30% раствора в микросферах 35-105 мкм) в биополимерных системах вводился также внутрибрюшинно однократно сразу после введения опухолевых клеток. Противоопухолевый эффект оценивали при гистологическом исследовании брюшины по наличию канцероматоза. Как показал анализ, ни одна крыса, которой не проводилось противоопухолевое лечение, не прожила более 4 недель. Оценка брюшной полости показала присутствие видимых опухолей и опухолевых узлов в брюшине животных. При лечении животных паклитакселом, коньюгированным в биополимерные системы, не обнаружено видимых проявлений опухоли и опухолевых узлов, асцит также отсутствовал [Liggins, 2001].

Таким образом, биополимерные системы показали высокую эффективность лечения опухолей, имплантированных внутрибрюшинно.

3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Разработка новых методов лечения онкологических заболеваний является одной из задач здравоохранения. Особое место занимает создание и внедрение в медицинскую практику высокоэффективных лекарственных препаратов. Современное лечение онкологических больных включает применение противоопухолевой

химиотерапии. Широкое использование химиотерапии значительно повысило возможности успешного лечения злокачественных опухолей, злокачественных системных заболеваний крови и кроветворных органов. Но, несмотря на то, что противоопухолевая терапия имеет уже большую историю и значительные успехи, проблема создания эффективных нетоксичных или малотоксичных препаратов до сих пор не решена. На сегодняшний день не создано ни одного противоопухолевого препарата, который был бы безопасен в рекомендуемых для клинического применения дозах. Проявления токсичности или побочного действия противоопухолевых лекарств так или иначе лимитируют их практическое использование. Это положение связано с особенностями биологического действия противоопухолевых препаратов. Противоопухолевые лекарственные средства относятся к одним из самых биологически активных фармакологических средств, и это, наряду, с принципом цитотоксичности, заложенным в основе химиотерапии, определяет их повреждающее действие в первую очередь на ткани, наиболее сходные с опухолевыми по скорости пролиферации (костный мозг, лимфатическая система, желудочно-кишечный канал, репродуктивные органы), что приводит к близкой сопряженности лечебного и токсичного эффектов. Противоопухолевые препараты, как правило, обладают узким диапазоном «широты терапевтического действия».

Как следствие сказанного, побочные и токсические эффекты у противоопухолевых препаратов отмечаются гораздо чаще, чем при других видах лекарственной терапии. При этом для противоопухолевых лекарств характерны и специфические осложнения: отсроченная токсичность, характеризующаяся скрытым (латентным) периодом в проявлении токсического действия, большим разнообразием и сложностью ее выявления; отсутствие избирательной токсичности; местно-раздражающее действие, эмбриотоксичность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность, функциональная кумуляция, нейротоксичность и иммунотоксичность. Поэтому лечение онкологических больных химиопрепаратами сопровождается различными по своим проявлениям токсичными и побочными эффектами.

Особенности токсического побочного действия противоопухолевых препаратов, их вариабельность и сложность выявления требуют специфических методических подходов к их доклиническому токсикологическому изучению. Обоснованность и целесообразность таких подходов определяется также эволюцией токсикологических требований к аналогичным фармакологическим средствам за рубежом.

3.1. Доклиническое изучение токсичности (биобезопасности) противоопухолевых препаратов

Целью доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества является установление характера и выраженности его повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности.

Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение общетоксического действия и исследование специфических видов токсичности (аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность, мутагенность, канцерогенность).

Изучение общетоксического действия позволяет решить следующие задачи:

- определить переносимые и токсические дозы фармакологического вещества.
- выявить наиболее чувствительные к изучаемому фармакологическому веществу органы и системы организма, характер и степень патологических изменений в них, а также исследовать обратимость вызываемых повреждений.
- изучить зависимость токсикологических эффектов от дозы длительности применения фармакологического вещества.

Соответственно этим задачам исследование общетоксического действия подразделяется на два этапа:

- изучение «острой» токсичности фармакологического средства при однократном или дробном введении через короткие (не более 3-6 часов) интервалы в течение суток.
- изучение «хронической» токсичности при повторном длительном введении (продолжительность введения определяется предполагаемым курсом клинического применения).

3.2. Оценка биобезопасности и биосовместимости биополимерных систем *in vitro* на клеточных культурах

Микросферы с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ (ПОЛВ) эффективно подавляют рост опухолевых клеток в течение длительного времени. Подавление пролиферации опухолевых клеток было показано для различных клеточных культур: рака печени [Liu, 2006], глиомы C6 [Lina, 2005; Zhang, 2007], 4T1 [Defail, 2006], MDA-MB 435 S [Gupte, 2004], LNCaP клеток рака простаты [Gryparis, 2007], MCF-7 клеток рака груди [Nguyen, 2008]. Причем в случае пролонгированного подавления роста опухолевых клеток (от 12 часов до 4 суток) биополимерные системы были значительно более эффективны по сравнению с водным раствором ПОЛВ: ПОЛВ в традиционной лекарственной форме подавляет рост клеток не более 12 часов, а биополимерные микросферы с инкапсулированным ПОЛВ подавляют рост до 4 суток. В течение более длительного срока подавление роста опухолевых клеток продемонстрировать затруднительно, т.к. срок их культивирования ограничен [Gupte, 2004; Zhang, 2007]. Была показана также эффективность биополимерных наносфер при подавлении роста опухолевых клеток [Nemati, 1996; Fonseca, 2002; Nguyen, 2008], продемонстрирована эффективность микросфер и наносфер на основе полимолочной и полимолочной-когликолевой кислот с инкапсулированными норкантаридином [Liu, 2006], темозоломидом [Zhang, 2007], доксорубицином [Nemati, 1996; Defail, 2006], паклитакселом [Fonseca, 2002; Gupte, 2004], тамоксифеном [Nguyen, 2008], цисплатином [Gryparis, 2007].

В данной работе оценка биобезопасности и биосовместимости биополимерной системы *in vitro* на клеточных культурах была разработана на основе существующего стандарта РФ ("Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)", нормативный документ РД 64-126-91), стандарта US Food@Drug Administration (FDA) (номативный документ "Guideline for the Format and Content of the Nonclinical Pharmacology/Toxicology Section of an Application", февраль 1987) и литературных источников [Gupte, 2004; Lina, 2005; Liu, 2006; Zhang, 2007]. Также использовались рекомендации по проведению доклинических исследований безопасности и эффективности, разработанные ФГБУ «Научный

центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития России [Миронов, 2012].

3.3. Исследования цитотоксического действия микросфер на клеточных культурах

Чтобы оценить цитотоксический эффект микросфер, инкапсулированных цитостатиками, применяется метод клеточных культур. Этот метод представляет собой обработку клеточной культуры раствором с цитостатиком или суспензией микрочастиц с инкапсулированным цитостатиком. Через определенные промежутки времени проводят оценку воздействия лекарственного препарата. Определяют цитотоксичность методом качественной и количественной оценки.

Качественная оценка: рассматривают клетки в микроскоп, чтобы оценить изменения, например, изменение общей морфологии, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Отклонение от нормальной морфологии регистрируют в отчете об исследовании описательно (например, не обнаружено, небольшие изменения, средние и очень значительные) или цифрами (0, 1, 2, 3).

Количественная оценка: измеряют количество погибших клеток, замедление роста клеток, пролиферацию клеток или образование колоний. Число клеток, количество белка, высвобождение ферментов, высвобождение витальной окраски, изменение подвижности клеток или другой измеряемый параметр, который может быть количественно оценен при помощи объективных средств.

Так, корейские ученые фармакологического отделения национального университета Сингапура оценили *in vitro* химиотерапевтическую активность полилактидгликолидных наночастиц с инкапсулированным паклитакселом и изопропилмиристатом [Mo, 2005]. Диаметр наносфер составил 331 нм, эффективность включения паклитаксела — 61%. Для оценки кинетики высвобождения был проведен контроль-релиз в фосфатном буфере при 37 °С. В первые 5 часов релиза наблюдался берст-эффект и происходил выход 32% паклитаксела. В последующие 115 часов шло медленное высвобождение. Для оценки цитотоксического эффекта полученные наносферы инкубировали с клетками А549. Цитотоксический эффект оценивали после 5 и 24 часов инкубации (рис. 16) [Mo, 2005].

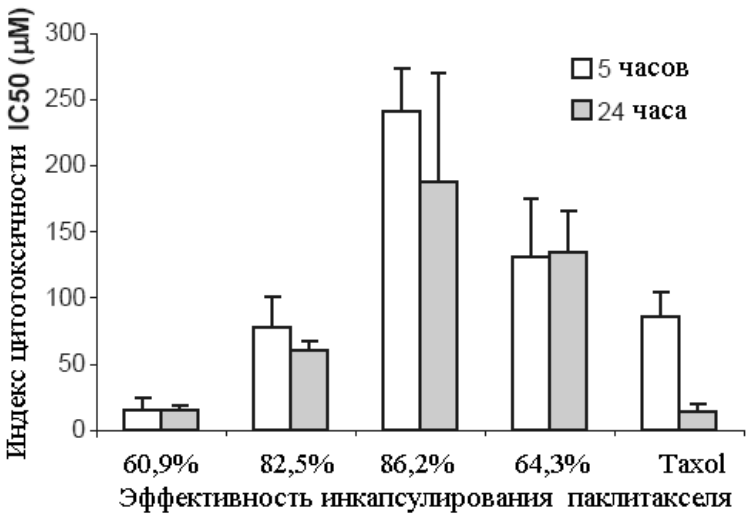


Рис. 16. Цитотоксическое действие полилактид-гликолидных наночастиц, содержащих паклитаксел в различной концентрации, показанное на клеточной культуре A549. Время инкубации5 часов и 24 часа.

Так, при инкубации с клетками A549 после 5 часов инкубации цитотоксический эффект не наблюдался, а появился только после 24 часов.

Учеными отделения фармакологических наук Университета Филадельфии были получены и изучены микросферы на основе полилактид-гликолида, содержащие паклитаксел, 5-флуорацил, а также совместно и паклитаксел, и 5-флуорацил (рис. 17). Кроме того, также оценена их сравнительная цитотоксичность [Gupte, 2004].

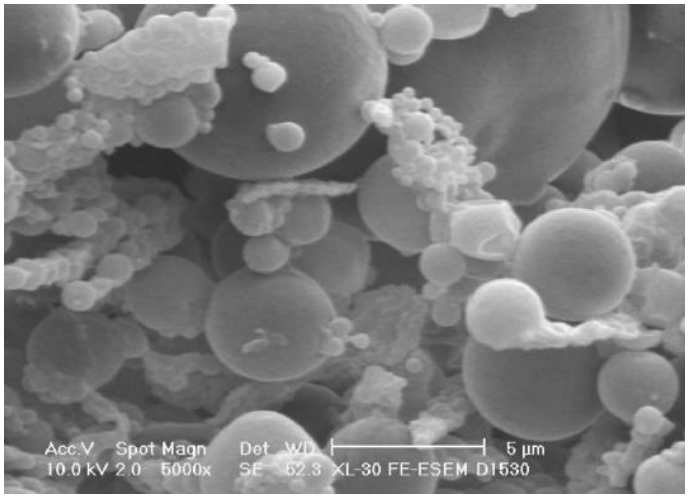


Рис. 17. Микросферы на основе полилактид-гликолида с включением 5-флуорацила и паклитаксела (СЭМ).

Исследования проводили на клеточной линии МДА-МВ 435S. Исследователи получили высокую эффективность инкапсулирования паклитаксела — до 90% в обоих случаях — с инкапсулированием только паклитаксела или совместно с 5-флуорацилом. Однако эффективность инкапсулирования 5-флуорацила была меньше и составила 19%, но повышалась при совместном инкапсулировании с паклитакселем и составила 30%. Оценка цитотоксической активности показала, что из трех видов микросфер наибольшей цитотоксичностью обладают сферы с включением как паклитаксела, так и 5-флуорацила, так как комбинация лекарственных веществ наиболее активна в отношении разных фаз клеточного цикла (рис. 18, [Gupte, 2004]).

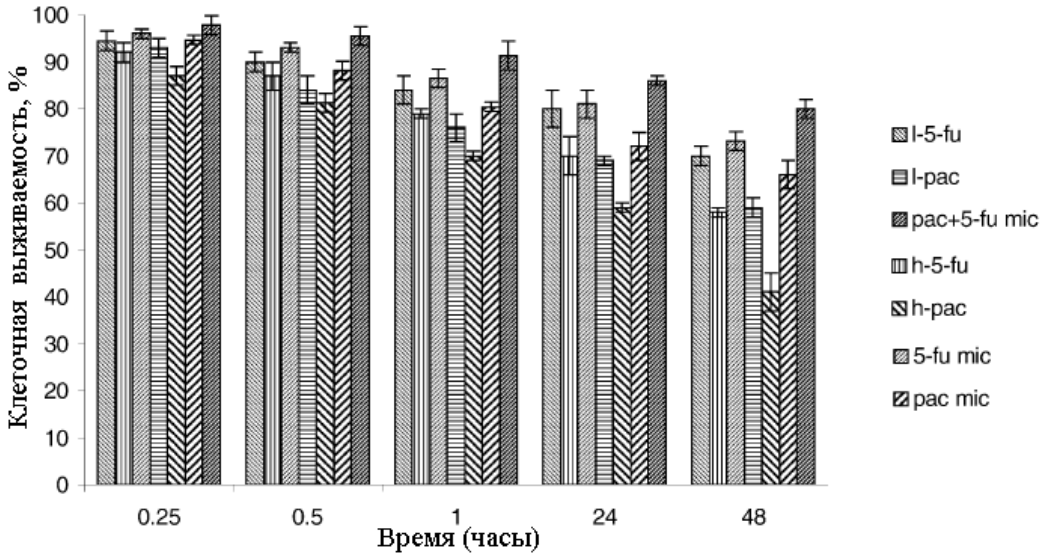


Рис. 18. Клеточная выживаемость на различных этапах клеточного цикла после обработки микросферами с включением паклитаксела и 5-флуорацила.

Китайские ученые отделения фармакологии 2 медицинского университета Шанхая для оценки цитотоксической эффективности использовали метод Фрочнея [Zhang, 2007]. Ими были созданы микросферы с включением темозолимида (ТМ) на основе полилактид-гликолида для использования против клеточной линии глиомы С6 *in vitro*. Главным фактором, лимитирующем интракраниальный уровень системных химиотерапевтических агентов, является гемато-энцефальный барьер.

Темозолимид является одним из главных эффективных антинеопластических агентов для лечения злокачественной глиомы. Однако ТМ должен назначаться в

слишком высоких системных дозировках для достижения терапевтического уровня ТМ в мозговой ткани, т.к. молекула ТМ имеет короткий период полураспада в крови — всего 1,8 часа [Zhang, 2007]. Поэтому полимерные системы, имплантируемые в мозг и способные локально высвобождать нейроактивные субстанции в течение длительного периода времени, могут стать наилучшим решением для проведения успешной химиотерапии у пациента.

Цитотоксическая эффективность полилактид-гликолидных микросфер с включением ТМ была исследована на линии клеток глиомы С6. Метод Фрочнея заключался в следующем: культуральные клетки в концентрации 10^4 кл/мл росли при 37 °С в клеточной флэшке размером 75 см^2. Среда для клеточной культуры содержала 10% фетальной телячей сыворотки (fetal calf) и по 1% пенициллина и стрептомицина. Клетки культивировались в атмосфере 5% CO_2 и 90% относительной влажности. Для проведения теста на цитотоксичность микросферы, содержащие 10% ТМ были инкубированы с клеточной культурой. Концентрация ТМ в микросферах соответствовала эквивалентному количеству свободного ТМ в концентрации 5, 10, 20 мкг/мл. Цитотоксичность микросфер показана на рис. 19 [Zhang, 2007].

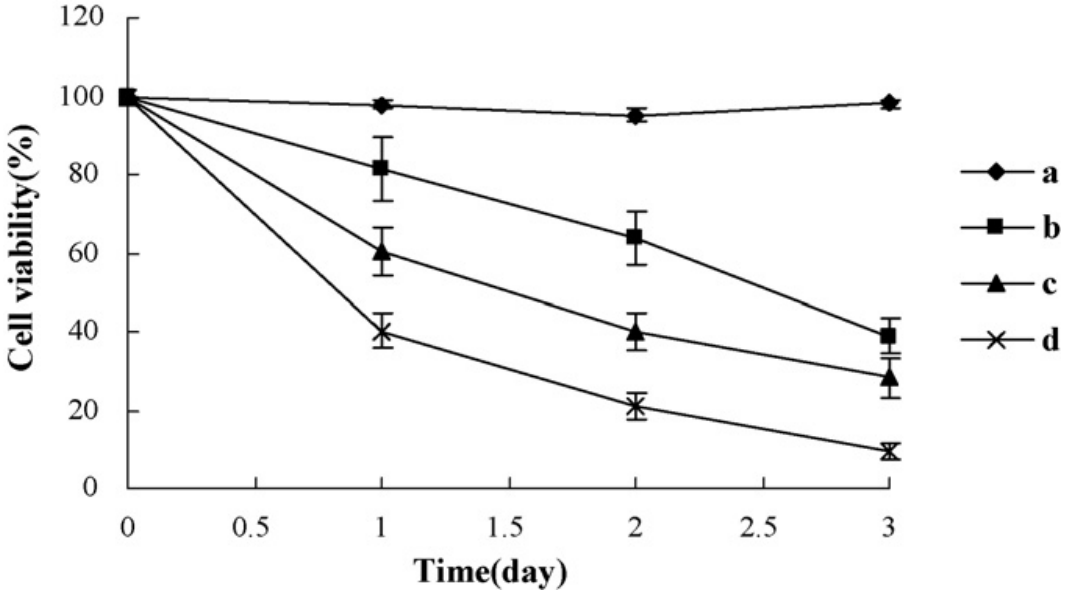


Рис. 19. Выживаемость клеток глиомы линии С6, обработанных микросферами на основе полилактид-гликолида с включением ТМ в концентрации 5 мкг/мл (б), 10 мкг/мл (в), 20 мкг/мл (г) и чистые микросферы (а) [Zhang, 2007].

4. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

4.1. Синтетические биодеградируемые материалы

Биодеградируемые полимеры могут быть природного происхождения либо синтетические. Большинство коммерчески доступных синтетических биодеградируемых полимерных материалов представляют собой полиэфиры органических кислот, которые образуются при полимеризации гомополимеров или сополимеров. Наиболее часто при производстве медицинских изделий используются полилактиды (ПЛА) и полигликолиды (ПГлА). Полилактид представляет собой циклический димер молочной кислоты, который состоит из двух его оптических изомеров D и L. L-форма встречается в природе, а DL-лактид — это синтетический продукт, полученный из указанных двух разновидностей полилактида [Кулаков, 2014].

Синтетические деградируемые полимеры, которые обычно используются для доставки ЛВ, наиболее часто получают из трех мономеров: лактида, гликолида и капролактона [Griffith, 2000]. Время их деградации колеблется от нескольких дней до нескольких лет и определяется кристалличностью, молекулярной массой и гидрофобностью полимера. Поэтому, изменяя эти физические свойства, можно изменять степень доступа воды к эфирным группам и, следовательно, управлять временем их деградации [Winzenburg, 2004].

Кинетика биодеградации композита может варьироваться путем изменения пропорции содержания ПЛА и ПГлА в сополимере и изменения молекулярного веса полимера. Для ПГлА микросфер низкая молекулярная масса и высокое содержание гликолевой кислоты приводят к быстрому высвобождению. Однако, использование ПГлА в микросферах осложняется возрастанием локальной активности во время деградации, которая может вызывать болезненную чувствительность тканей из-за подкисляющего эффекта, а также причинять ущерб стабильности белковых

лекарств. Кроме того, побочные кислые продукты деградации вовлекаются во многие биохимические реакции в тканях и могут нарушать их метаболизм [Griffith, 2000].

Таким образом, синтетические полимеры, хотя и позволяют обеспечить высокий контроль биодеградации, и, следовательно, высвобождения ЛВ, часто не отвечают критериям биосовместимости и вызывают различные негативные ответные реакции в тканях.

На сегодняшний день еще остаются нерешенными ряд вопросов, связанных с механизмами взаимодействия указанных материалов с прилежащими тканевыми структурами (обычно с костью) и реакцией последних на внедрение полимерного материала. Наблюдаются патогенные эффекты в области контакта имплантат - костная ткань. Необходимым является продолжение исследований по этой проблеме, тем более что в литературе появляются сообщения, свидетельствующие о патогенном побочном эффекте при взаимодействии синтетических биодеградируемых материалов с прилежащими тканевыми структурами организма-реципиента [Bohner, 2010]. С этой проблемой также столкнулись разработчики средств и методов тканевой инженерии [Кузнецова, 2014].

Исследователи тканевой инженерии отмечают недостаток полилактида, который заключается в плохой смачиваемости и, соответственно, неравномерном распределение клеток, также, как правило, отмечается локальное закисление. Не исключены воспалительные реакции при введении полилактида в организм. Также этот материал показывает недостаточную прочность при сжатии [Lyons, 2008; Garg, 2012].

Также было показано возникновение иммунного ответа на высвобождающиеся в процессе деструкции водорастворимые олигомеры синтетических полимеров. Некоторые исследователи даже использовали биосовместимые покрытия или биологически активные вещества для уменьшения воспалительной реакции окружающих тканей в ответ на имплантацию полилактидов и полигликолидов [Bostman,

2000; Solheim, 2000]. Анализ литературных данных показывает наличие многих нерешенных проблем в вопросах материалов медицинского назначения. В связи с этим в настоящее время активно развиваются работы, направленные на поиск новых биосовместимых биорезорбируемых полимеров для медицины.

4.2. Природные биодеградируемые материалы — полиоксиалканоаты

4.2.1. *Открытие и исследование свойств полиоксиалканоатов*

Полиоксиалканоаты (ПОА) являются запасным питательным веществом бактерий. Молекулы полиокси-алканоатов полностью разлагаются в организме до CO_2 и воды. В то же время эти полимеры полностью биосовместимы и обладают рядом физико-химических свойств, позволяющих использовать их для систем направленной транспортной доставки лекарственных веществ.

История изучения ПОА насчитывает более ста лет [Zhang, 2018]. Впервые ПОА были отмечены в виде суданофильных липидоподобных включений в 1903 году Мейером [Meyer, 1903] в клетках бактерий рода Азотобактер. Через 20 лет в 1924 году, Стапп, исследуя клетки Азотобактер, обнаружил, что жировые включения этих бактерий способны растворяться в хлороформе [Stapp, 1924]. Вскоре, в 1926 году, другим исследователем, Лемуалем [Lemoigne, 1926], был определён химический состав этого жироподобного вещества. Выяснилось, что в анаэробных условиях происходит подкисление суспензии бактериальных клеток. Было установлено, что образующаяся кислота является β-гидрокси-масляной кислотой и образуется она из поли-3-оксибутирата — жироподобного вещества полимерной природы. В дальнейшем, ученым Макраем и Викинсоном [Macrae, 1958] удалось выделить гранулы полиоксибутирата с помощью щелочного гидрохлорида. Также было установлено, что полиоксибутират является веществом для запасания углерода у бактерии рода Азотобактер. Вскоре ПОБ был обнаружен среди бактерий других родов [Doudoroff, 1959; Schlegel, 1961; Schlegel, 1962; Delafield, 1965; Stockdale, 1968; Jensen, 1971; Dawes, 1973], а также цианобактерий [Jensen, 1971]. Были изучены аспекты синтеза [Slepecky, 1961; Kominek, 1965; Senior, 1971; Dawes, 1973;

Oeding, 1973; Senior, 1973] и деградации ПОБ [Chowdhury, 1963; Merrick, 1964; Delafield, 1965; Gavard, 1966; Lusty, 1966; Merrick, 1966; Griebel, 1971; Senior, 1973]. В дальнейшем был обнаружен ряд других бактериальных полиокси-алканоатов (ПОА) [Wallen, 1974; de Smet, 1983; Haywood, 1990; Timm, 1990]. Оказалось, что кроме ПОБ, в состав бактериальных ПОА входит ряд других оксипроизводных кислот (валериановая, гексановая, октановая). К настоящему времени известно около 100 различных ПОА. Однако, мономеров, длиной цепью более С16 не было обнаружено [Steinbuchel, 1995]. Выяснилось, что на вариабельность мономерного состава ПОА влияют условия микробного синтеза [Davis, 1964; Wallen, 1974; Findlay, 1983; de Smet, 1983]. Это способствовало увеличению числа экспериментов с различными, в основном синтетическими ростовыми субстратами — предшественниками элементарных звеньев полиэфира. В настоящее время известные ПОА можно разделить на следующие типы:

(I) большой ряд 3-гидрокси-алканоатов — от 3-гидрокси-пропионовой до 3-гидрокси-гексадекановой кислоты;

(II) ненасыщенные 3-гидрокси-алкеновые кислоты с одной или двумя двойными связями в составе алкильного радикала боковой цепи;

(III) 3-гидрокси-алканоаты, содержащие метильную группу в качестве заместителя у различных углеродных атомов боковой цепи;

(IV) гидрокси-алканоаты, содержащие гидроксильную группу у четвертого, пятого и шестого углеродного атома боковой цепи: 4-гидрокси-масляная, 4-гидрокси-валериановая, 4-гидрокси-гексановая, 4-гидрокси-гептановая, 4-гидрокси-октановая, 4-гидрокси-декановая, 5-гидрокси-валериановая, 5-гидрокси-гексановая и 6-гидрокси-додекановая кислоты;

(V) 3-гидрокси-алканоаты с различными функциональными группами в составе боковой цепи, например, с карбоксильной группой, карбоксигруппой в составе сложного эфира с алкеновой или бензойной кислотой, 3-гидрокси-алканоаты с ацетокси-, фенокси-, пара-цианофенокси-, пара-нитрофенокси-группами в составе сложного эфира в боковой цепи.

Также известны 3-гидроксиалканоаты, содержащие в составе боковой цепи фенильные или циклоалифатические заместители, присоединенные углерод-углеродной связью к алкильному радикалу боковой цепи. Известны гидрокси-алканоаты со второй гидроксильной группой или с эпоксигруппой, а также галоид-содержащие гидрокси-алканоаты с атомом фтора, хлора или брома.

Кроме гидрокси-алканоатов с модифицированной боковой цепью, известны гидрокси-алканоаты с функциональной группой, присоединенной к углеродным атомам основной цепи полиэфира: гидрокси-алкеновые кислоты с двойной связью, такие как 3-гидрокси-2-бутеновая кислота и 3-гидрокси-додекеновая кислоты, а также различные 3- гидрокси-алканоаты с метильной группой, присоединенной к углеродному атому [Doi, 1990a; Doi, 1990b; Doi, 1990c; Doi, 1990d; Eggink, 1990; Fritzsche, 1990a; Fritzsche, 1990b; Choi, 1994; Steinbuchel, 1995]. Короткоцепочечными называются оксиалкановые кислоты, содержащие 1-5 атомов углерода, среднецепочечные содержат 6-16 углеродных атомов и длиноцепочечные 17-18 атомов углерода.

В таблице 2 приведены гидрокси-алкановые кислоты, обнаруженные (серая область) и не обнаруженные (белая область) в составе биосинтетических поли-гидрокси-алканоатов. В таблице указаны только насыщенные и незамещенные гидроксикислоты: HB — гидрокси-масляная, HV — гидрокси-валериановая, HHx — гидрокси-гексановая, HHp — гидрокси-гептановая, HO — гидрокси-октановая, HN — гидрокси-нонановая, HD — гидрокси-декановая, HUD — гидрокси-ундекановая, HDD — гидрокси-додекановая, HTriD — гидрокси-тридекановая, HTD — гидрокси-тетрадекановая, HPD — гидрокси-пентановая, HHxD — гидрокси-гексадекановая, HASCL и HAMCL — соответственно, коротко- и среднецепочечные гидрокси-алканоаты [Steinbuchel, 1995].

	C3	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**C8**	**C9**
1-OH	–	–	–	–	–	–	–
2-OH	Лактат	2HB	2HV	2HHx	2HHp	2HO	2HN
3-OH	3HP	3HB	3HV	3HHx	3HHp	3HO	3HN
4-OH	–	4HB	4HV	4HHx	4HHp	4HO	4HN
5-OH	–	–	5HV	5HHx	5HHp	5HO	5HN
6-OH	–	–	–	6HHx	6HHp	6HO	6HN
7-OH	–	–	–	–	7HHp	7HO	7HN
	C10	**C11**	**C12**	**C13**	**C14**	**C15**	**C16**
1-OH	–	–	–	–	–	–	–
2-OH	2HD	2HUD	2HDD	2HTriD	2HTD	2HPD	2HHxD
3-OH	3HD	3HUD	3HDD	3HTriD	3HTD	3HPD	3HHxD
4-OH	4HD	4HUD	4HDD	4HTriD	4HTD	4HPD	4HHxD
5-OH	5HD	5HUD	5HDD	5HTriD	5HTD	5HPD	5HHxD
6-OH	6HD	6HUD	6HDD	6HTriD	6HTD	6HPD	6HHxD
7-OH	7HD	7HUD	7HDD	7HTriD	7HTD	7HPD	7HHxD

Таблица 2. Гидрокси-алкановые кислоты в составе биосинтетических поли-гидрокси-алканоатов

4.2.2. *Учет особенностей и свойств полимеров при создании систем пролонгированного высвобождения лекарственных веществ*

Как было описано в предыдущей главе, в качестве транспортных средств для доставки препаратов используется широчайший спектр полимеров. От физико-химических свойств выбранного полимера зависит эффект управления высвобождением препарата. Для определения поведения системы доставки препарата и последующего высвобождения активного компонента важны многие особенности полимера. Так, молекулярная масса — важная составляющая при выборе полимера [Efentakis, 2006]. Полимеры высокой молекулярной массы могут часто быть более жесткими, чем полимеры низкой молекулярной массы вследствие увеличения запутанности между цепями. Запутанность также может предотвратить вход новых молекул воды в большую часть полимерной сети, следовательно, растворение препарата замедляется и его высвобождение происходит значительно медленнее. От молекулярной массы также зависит поведение полимеров при деградации [Braunecker, 2004]. При деградации уменьшается молекулярная масса полимерных цепей, и происходит диффузия олигомеров из полимерной матрицы, что приводит к образованию пор. Поры пропускают воду и способствуют высвобождению препарата. Поры позволяют молекулам воды входить в структуру полимера и начинать деградацию полимера и последующее высвобождение активного компонента. Раствор лекарственного препарата при этом высвобождается в циркуляторные системы быстрее по сравнению с плотным непористым полимерным матриксом. Поэтому, если начальная молекулярная масса полимера была высока, то процесс деградации будет идти медленнее. Наоборот, если начальная масса полимера низка, тогда полимер практически сразу становится растворимым и высвобождение препарата происходит быстро.

Другой важной физико-химической особенностью полимера является степень кристалличности. Степень кристалличности является важным детерминантом

функций полимерного устройства доставки препарата. Кристаллическими называются полимеры, которые имеют регулярные структуры и в состоянии достигнуть регулярной упаковочной организации цепей [Young, 1991]. Компактная упаковка цепей полимера увеличивает межмолекулярные взаимодействия, и полимер становится более упорядоченным и жестким, чем его аморфная копия. Кроме того, кристаллические области непроницаемы для диффундирующих молекул, и таким образом повышение кристалличности часто приводит к уменьшению проницаемости. Следовательно, кристаллические области чрезвычайно непроницаемы для воды и гидролиз в кристаллических областях значительно уменьшен. Это позволяет управлять свойствами полимера, регулируя степень кристалличности [Frieberg, 2004].

В качестве иллюстрации вышесказанного приведём работу канадских исследователей фармакологического института и отделения фармакологических наук Университета Британской Колумбии (Ванкувер), которые создали микросферы с включением паклитаксела на основе полимолочной кислоты (рис. 20) [Liggins, 2004].

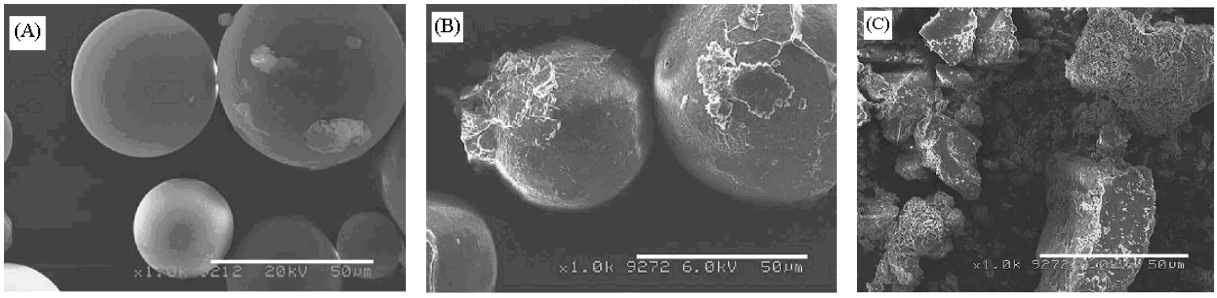


Рис. 20. Деградация микросфер и высвобождение паклитаксела.

Представители этого же института изучали влияние молекулярного веса полимолочной кислоты на деградацию микросфер и высвобождение паклитаксела [Jackson, 2004].

Анализ методом ДСК показал, что кристалличность и температура плавления уменьшались с увеличением содержания низкомолекулярного полимера в смеси.

Однако степень кристалличности может значительно изменяться в зависимости от физико-химических свойств инкапсулированного лекарственного вещества. Поэтому остается много неясных вопросов во взаимодействии лекарства с полимерной матрицей. Так, ученые отделения фармацевтических технологий Хельсинского университета (Финляндия) изучали эффект нанопреципитации низкомолекулярного полилактид-гликолида с модельными лекарственными веществами сульфатом солбутамола и дипропинатом беклометазона [Hyvonen, 2005]. Была оценена кристалличность полимерных нано-частиц в зависимости от инкапсулирования одного либо другого модельного лекарственного вещества. Сульфат салбутамола при инкапсулировании в полимерные наночастицы вызывал увеличение кристалличности по сравнению с дипропинатом беклометазона. Также было установлено, что в процессе нанопреципитации изменилась форма самого дипропината беклометазона от ангидрида к моногидриду. Таким образом, хотя было установлено изменение кристалличности при инкапсулировании различных модельных лекарственных веществ, однако сам механизм взаимодействия лекарственного вещества с полимерной матрицей остался неясен.

Температура кристаллизации полимера определяет поведение полимера при данной определённой температуре [Siepmann, 2001]. При низких температурах аморфные полимеры существуют в стекловидном состоянии, где не может произойти никакого существенного молекулярного движения. При повышении температуры полимеры подвергаются фазовому переходу, обозначаемому как температура перехода кристаллизации, когда полимер изменяется от стекловидного состояния до эластичного. В результате этого перехода полимер подвергается резкому изменению свойств, таких как гибкость, проводимость и расширение в объеме. Следовательно, при разработке биополимерной системы управляемого высвобождения, необходимо знание величины температуры кристаллизации полимера [Ranade, 2004].

Важным физико-химическими параметрами полимеров является их гидрофобность и гидрофильность. Когда полимер помещен в водную окружающую среду, он будет постепенно поглощать воду, и количество этой воды определено структурой полимера. Это имеет очень большое значение, поскольку системы контролируемого высвобождения неизменно функционируют в водных растворах. Согласно природе водно-полимерного взаимодействия, полимер может быть отнесен к одной из четырех групп [Robinson, 1987].

Гидрофобные полимеры — по существу непроницаемы для воды, будучи помещёнными в водную окружающую среду, поглощают очень немного воды. Эта непроницаемость происходит из-за консервативности цепи полимера, высокой степени кристалличности и присутствия гидрофобных групп.

Гидрофильные полимеры поглощают больше чем 5 % воды и, как и в случае с гидрофобными полимерами, это связано со свойствами полимера. Гибкость цепи, отсутствие кристалличности и присутствии таких групп, как аминогруппы, карбоксильные и гидроксильные — все это способствует поглощению молекул воды полимером. Кроме того, разные уровни гидрофильности могут быть достигнуты сополимеризацией двух мономеров с различными степенями гидрофильности [Robinson, 1987].

Третий класс полимеров легко растворим в воде, даже при том, что они имеют высокую молекулярную массу. Типичные полимеры этого класса включают поливиниловый спирт, полиакриловую кислоту и полиэтилен оксид.

Четвертый тип полимеров по этой классификации представляют собой высокогидрофильные или растворимые в воде полимеры, которые имеют поперечно связанные ковалентные связи. Присутствие ковалентных связей создает полимер, неспособный распасться в воде, но позволяет осуществлять большую степень поглощения воды и, следовательно, набухания полимера. Это придает такому полимеру особенности, которые не могут быть получены при использовании гидрофильных линейных полимеров [Robinson, 1987].

Выбирая оптимальное соотношение разных полимеров при получении их композитов, можно добиться желательной продолжительности деградации [Frieberg, 2004]. Если сильно гидрофобный полимер будет смешан с гидрофильным полимером, то гидрофильный полимер быстро высвободится, оставляя после себя пористую структуру. Пористая структура будет составлена главным образом из остающегося гидрофобного полимера. Поэтому, высвобождение препарата происходит в двухступенчатом процессе и коррелирует не с полной деградацией полимера, а с индивидуальным высвобождением каждого полимера [Kipper, 2002].

В качестве примера вышеизложенного материала можно привести результаты канадских ученых из колумбийского университета отделения фармацевтических наук [Jackson, 2004]. Им удалось создать композитные микросферы из полилактид-гликолида и низкомолекулярного сополимера — метокси-полиэтилен-гликоля с включением паклитаксела. Полученные сферы были размером 30-120 мкм. При высвобождении паклитаксела берст-эффект обеспечивался более гидрофильным компонентом — сополимером метокси-полиэтилен-гликолем. Длительное высвобождение паклитаксела в течении 10 недель происходило благодаря гидрофобному полилактид-гликолиду. Необходимо отметить, что гидрофильный компонент микросфер митокси-полиэтилен-гликоль показал лучшую биосовместимость по сравнению с полилактид-гликолидом.

Ученые ищут все новые вещества, которые могут служить в качестве матрикса для систем контролируемого высвобождения и одновременно выполнять лечебные функции. Так, корейским ученым из отделения биоинженерии национального отделения Сингапура удалось создать наночастицы с инкапсулированным паклитакселем на основе полилактид-гликолида и витамина Е — токоферол-полиэтилен-гликоля, известного своими антиоксидантными свойствами. Исследуя полученные наночастицы с помощью различных физико-химических методов, удалось доказать, что витамин Е может использоваться в качестве нового компонента полимерного матрикса при создании систем контролируемого высвобождения [Mu, 2003].

Ученые из института материаловедения и инжиниринга Сингапура в своей работе [Feng, 2001] использовали для сравнения ряд различных полимеров: полилактид-гликолиды с молярным соотношением лактидов к гликолидам 75:25 и 50:50, полилактиды, а также ряд природных липидов фосфотидилхолинов: ДДПС, ДППС, ДСПС, ДОПС. В данные полимеры инкапсулировали паклитаксел и изучали его высвобождение из полученных наносфер в фосфатном буфере *pH* 7,4 при 37,2°С. Высвобождение паклитакселя определяли методом высокой жидкостной хроматографии. Измерения проводили на длине волны 227 нм в УФ спектре. Результаты показали, что природные фосфолипиды, которые являются важными компонентами клеточных мембран, могут служить альтернативой традиционным химическим полимерам. После начального берст эффекта высвобождение паклитаксела продлевалось на более чем 6 месяцев. Таким образом, было показано, что природные фосфолипиды имеют большие преимущества для контролируемого высвобождения паклитаксела [Feng, 2001].

4.2.3. *Преимущества полиоксиалканоатов для получения микросфер*

Известно, что полиоксиалканоаты обладают такими уникальными свойствами, как биосовместимость и способность к биодеградации [Севастьянов, 2011]. Поэтому они являются перспективным материалом для изготовления медицинских изделий, для применения в фармакологии и пищевой промышленности. На сегодняшний день на рынке биосовместимых полимеров преобладают полимеры импортного производства из химически синтезируемых материалов — в основном это полилактиды и полигликолиды. Однако полилактиды и полигликолиды являются быстро деструктируемыми полимерами и часто не подходят для определенных медицинских целей. В институте биохимии им. А.Н. Баха РАН ведется работа по синтезу и исследованию физико-химических свойств полиоксиалканоатов— природных полимеров, не подверженных быстрой биодеградации. Изучается возможность получения сополимеров с заданными свойствами — такими как полимерный состав, молекулярная масса, кристалличность для использования в различных сферах

применения. Таким образом, полиокси-алканоаты могут стать альтернативой импортным полилактидам и полигликолидам. Поэтому требуется дальнейшее изучение синтеза и деградации полиокси-алканоатов.

Как уже говорилось, биосовместимость полиокси-алканоатов позволяет использовать их в таких медицинских сферах, как имплантация, пленочные раневые покрытия, системы доставки лекарств с контролируемым высвобождением. Биосовместимостью называется свойство материала выполнять определенную функцию в организме без вреда для него [Штильман, 2016]. Так, биосовместимость полиоксибутирата объясняется тем, что мономер 3-оксимасляная кислота — естественный продукт обмена веществ у животных и человека. Концентрация оксимасляной кислоты в крови человека составляет 0,3-1 мМ [Hocking, 1994]. Исследователями Янгом [Yang, 2002], Денгом [Deng, 2003] и Вангом [Wang, 2004] показано, что полиоксибутират может быть использован в качестве подложек для выращивания клеточных культур. Как уже отмечалось, полиоксибутират имеет более низкую скорость биодеструкции по сравнению с полилактидами и полигликолидами и поэтому не вызывает резкого увеличения концентрации 3-оксимасляной кислоты в окружающих тканях [Gogolewski, 1993; Qu, 2006]. В отличие от этого, при деградации полилактидов и полигликолидов происходит резкое высвобождение гликолевой и молочной кислот, что вызывает снижение уровня *pH* и раздражение кислотой окружающих тканей [Ignatius, 1996; Agrawal, 1997]. Тэйлор с соавторами [Taylor, 1994] провели оценку потенциальной токсичности продуктов деградации полиоксибутирата и его сополимера поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерата (ПОБВ) в сравнении с другими полимерами — полилактидами и полигликолидами и показали, что продукты деструкции ПОБ и ПОБВ (3- и 4-гидрокси-масляная кислота и 3-гидрокси-валериановая кислота) обладают меньшей кислотностью (*pH* 4,41 и 4,72, соответственно) в сравнении, например, с гликолевой (*pH* 3,83) и молочной (*pH* 3,73) кислотами. Также очень интересен тот факт, что практически у всех прокариот и эукариот в клетках обнаруживается комплекс низкомолекулярного ПОБ — коПОБ — содержащий до 150 остатков 3-оксимасляной кислоты. У

млекопитающих коПОБ обнаруживается в крови, почках, сосудах, головном мозге. В организме человека общее содержание коПОБ в плазме колебалось от 0,6 до 18,2 мг/л при среднем значении 3,5 мг/л [Reusch, 1992]. Было показано, что коПОБ является функциональной частью ионных каналов мембраны эритроцита и мембраны митохондрии гепатоцитов [Reusch, 1992; Pavlov, 2005]. Авторами предполагается, что коПОБ участвует в переносе ионов через мембрану и облегчает их передачу через гидрофобные барьеры. Также предполагается, что коПОБ является одним из продуктов симбиотического взаимодействия клеток организма с кишечными микроорганизмами [Huang, 1996; Pavlov, 2005;]. Однако механизм синтеза ПОБ в эукариотических организмах недостаточно изучен и требует дополнительных исследований. Вместе с тем требует дальнейших исследований возможность использования полиоксиалканоатов для медицинских целей. Хочется подчеркнуть, что использование ПОБ для применения в системах контролируемого высвобождения имеет большие перспективы. Микросферы на основе ПОБ смогут стать реальной альтернативой полилактидным и полигликолидным микросферам.

4.2.4. *Полиоксибутират — природный биосовместимый полимер для получения микросфер*

Наиболее известным из ПОА является ПОБ. Мономером для синтеза поли-3-гидроксибутирата, состоящего из повторяющихся фрагментов ($C_4H_6O_2$), является D(-)-3-β-оксимасляная кислота. Физико-химические свойства ПОБ приведены в таблице 3. Рентгенографические исследования кристаллического поли-3-гидроксибутирата показали, что пространственной структурой молекул полиэфира является левозакрученная спираль. Кристаллизация ПОБ в условиях повышенного насыщения происходит с образованием сфер радикально-лучистого строения — сферолитов [Семчиков, 2003].

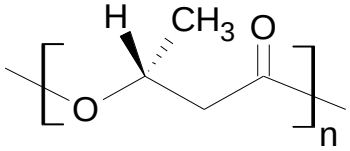
Химическое название	Поли-3-гидроксибутират, поли-β-оксибутират, полиэфир D(-)-3-гидроксимасляной кислоты
Структурная формула	
Эмпирическая формула	$(C_4H_6O_2)_n\ H_2O$, n ≈ 500-3000
Молекулярная масса, Да	300 000 – 1 500 000
Вязкость	1.9-10.0
Растворимость	Хорошо растворим в хлороформе, дихлорметане, диметилхлорамине. Плохо растворим в диоксане, пиридине. Нерастворим в воде, метаноле, этаноле, гексане, бензоле, ацетоне.
Форма выпуска	Порошок
Цвет	белый с желтоватым оттенком
Температура плавления, °С	170-180
Температура деградации, °С	240-280
Насыпная плотность, г/см^3	0.5-0.7
Плотность, г/см^3	1.15-1.30
Степень кристалличности, %	60-75
Относительное удлинение, %	10-30
Модуль упругости, Гпа	3.5-4.0
Предел прочности при растяжении, Мпа	30-40
Чувствительность к кислороду воздуха	Устойчив
Чувствительность к свету	Устойчив
Токсичность	Нетоксичен
Биодеградация	В организме человека сначала разлагается до 3-оксимаслянной кислоты, далее до CO_2 и воды.
Скорость биодеградации в животных тканях, мес.	До 30 [Shum-Tim, 1999]
Стерилизация	ПГБ выдерживает все виды стерилизации (термообработка, автоклавирование, дезинфицирующие растворы, гамма-радиацией до дозы 5 Мрад)

Таблица 3. Физико-химические свойства полиоксибутирата.

Биосинтез полиоксибутирата

Синтез ПОБ у большинства штаммов-продуцентов проходит в три стадии: 3-кетотиолаза конденсирует два остатка ацетил-кофермента А (КоА) с образованием ацетоацетил-КоА; НАД-Н-зависимая ацетоацетил-КоА редуктаза катализирует стереоселективное восстановление ацетоацетил-КоА в D(–)-3-гидроксибутирил-КоА, и, в завершение, ПГБ-синтаза присоединяет эфирной связью образовавшиеся мономеры к растущей цепи поли-3-гидроксибутирата [Verlinden, 2007].

При несбалансированных условиях роста ПОБ накапливается в виде гранул и является запасным питательным веществом клетки. Важным ферментом в биосинтезе ПОБ является кетотиолаза, которая участвует в β-окислении жирных кислот. Нативная и субъединичная молекулярные массы составляют примерно 180 и 44 кДа, соответственно, указывая на то, что ацетоацетил-КоА-тиолаза присутствует внутри клетки в виде гомотетрамера. В биосинтезе ПОБ этот фермент катализирует конденсацию ацетильной группы и ацетил-КоА [Ouyang, 2007].

Вторую стадию синтеза ПОБ катализирует фермент Ацетоацетил-КоА-редуктаза, или (R)-3-гидроацил-КоА-дегидрогеназа, который представляет собой гомотетрамер с молекулярной массой субъединиц около 25 кДа и проявляет НАДФ-Н и НАД-Н зависимую редуктазную активность в клетке. Ключевым ферментом синтеза полиоксибутирата является ПОБ-синтаза, которая использует в качестве субстрата тиоэфиры (R)-3-гидроксиалканоатов КоА, катализирует полимеризацию с высвобождением КоА. Всего известно более 40 ПГА-синтаз и их можно разделить на три класса на основании четвертичной структуры и субстратной специфичности.

Класс I, представленный ПГА-синтазой Ralstonia eutropha [Rehm, 2002; Shiraki, 2006], активен в отношении короткоцепочечных (R)-гидроксиацил-КоА (3-5 атомов углерода). *Класс II,* представленный ПГА-синтазой Pseudomonas aeruginosa [Tsuge, 2000], активен в отношении фрагментов средней длины (6-14 атомов углерода). Эти ферменты являются мономерами с молекулярной массой около 63 кДа. ПГА-синтаза *III класса* представляет собой димер, состоящий из двух

различных субъединиц и проявляет активность по отношению к короткоцепочечным (R)-гидроксиацил-КоА.

Также существуют синтазы, не попадающих под приведенную классификацию в силу их неспецифичности к длине цепи [Jia, 2001; Tian, 2005]. В отсутствие стрессовых факторов молекулы ПГА синтаз растворены в цитоплазме, а в процессе синтеза ПГА молекулы фермента локализуются на поверхности растущих гранул ПГА. Предполагается, что фермент катализирует образование ковалентной связи тиолового эфира и растущей полиэфирной цепи при помощи единственного цистеинового остатка в активном центре [Zheng, 2006].

Внутриклеточная деградация ПОБ

В бактериальной клетке одновременно присутствуют как ПОБ-синтаза, так и ПОБ-внутриклеточная деполимераза [Uchino, 2007], что говорит о равновесии метаболических процессов. В условиях ослабления стресса в клетке происходит катаболизм накопленного поли-3-гидроксибутирата. Внутриклеточная деполимераза специфична к нативной форме полигидроксибутирата, и, возможно, к выделенному аморфному ПОБ [Gebauer, 2006]. Также существуют внеклеточные ПОБ-деполимеразы, которые гидролизуют выделенный, частично кристаллический, полимер, лишенный поверхностного белкового слоя [Saito, 1991; Freier, 2002; Shishatskaya, 2005].

Таким образом, мы видим, что полиоксибутират по своим биохимическим характеристикам идеально подходит для получения микросфер. Варьируя способы культивирования бактерий рода Азотобактер, можно влиять на молекулярную массу и другие физико-химические параметры получаемого ПОБ, и, таким образом, подбирать полимер, подходящий для необходимого профиля высвобождения ЛВ. Кроме этого, существуют и другие способы влиять на свойства полимерной матрицы, в частности, используя сополимеры ПОБ. Такая работа проводится в институте биохимии им. А.Н. Баха РАН. Влияя на полимерный состав, можно добиться изменения физико-химических свойств полимера для конкретных целей. Изменяя условия культивирования, можно, например, получить такой сополимер,

как полиокси-бутират-совалерат, который является более эластичным и способным к быстрой биодеградации.

Сравнение термомеханических свойств полиоксибутирата, полиоксибутирата-оксивалерата и полипропилена приведено в таблице 4.

	ПОБ	ПОБ-ОВ	Полипропилен
Температура плавления, °С	180	145	176
Кристалличность, %	60-80	50-70	50-70
Модуль упругости, ГПа	3.5	1.2	1.7
Прочность на разрыв, МПа	40	32	38
Удлинение на разрыв, %	8	50	400

Таблица 4. Сравнение термомеханических свойств полиоксибутирата, полиоксибутирата-оксивалерата и полипропилена

4.2.5. *ПОБ и потенциал его использования в медицине*

Тканевая инженерия — быстро растущая междисциплинарная область исследований. Методы тканевой инженерии используют как живую ткань организма, так и комбинацию различных биоматериалов, а также клеточные культуры и биоактивные молекулы в целях восстановления поврежденной ткани или органа [Langer, 1993]. Одно из направлений тканевой инженерии — создание новой функциональной ткани, основанной на биоразлагаемых полимерах и имеющей форму замещаемого органа. Стратегия разработки включает в себя отбор биополимера с заданными характеристиками, а также взятые по возможности клетки у того же организма, у которого планируется замещение органа. Клетки начинают делиться и вторгаются в биополимерную матрицу, в то же время биополимер постепенно подвергается биодеструкции. Как только процесс биодеструкции завершается, функциональная ткань остается в форме замещаемого органа [Langer, 1993]. Матричные

биополимеры для разработки этой системы должны обладать определенными фундаментальными свойствами. Требуется биосовместимый материал, имеющий соответствующие механические свойства, для того чтобы поддерживать клеточную адгезию и быстрый рост клеток, а также организовывать рост клеток в необходимом направлении, позволяющим растущей ткани получать питательные вещества [Hutmacher, 2001].

Биоразлагаемые полимеры, такие как полилактиды и полигликолиды и их сополимеры, широко используются в качестве биоматериалов в хирургической практике [Howard, 2002]. В настоящее время саморассасывающиеся хирургические нити являются в большинстве сделанными из биодеградирующих полимеров. В медицине также используются ортопедические фиксирующие устройства, хирургические заплатки и другие медицинские изделия, в том числе трехмерные пористые носители для реконструкции тканей, сделанные из биоразрушаемых полимеров [Williams, 2005; Rivera-Briso, 2018].

ПОБ и его сополимеры представляет собой многообещающий материал для множества медицинских изделий. ПОБ потенциально может использоваться в раневой медицине: это шовный материал, заплаты для замены кожной ткани, манжеты для нервов, различные клапаны, сердечно-сосудистые ткани, перикардиальные участки, сосудистые протезы, импланты органов и тканей. Также использование ПОБ приобретает все большее значение для травматической ортопедии: это и опора для растущей хрящевой ткани, а также клеток костной ткани при переломах, замена костного трансплантанта, регенерация мениска, создание внутренних устройств фиксации органов, поддержание связочного аппарата при его восстановлении.

Необходимо учитывать, что разработка и внедрение в практику методов регенеративной медицины требует соответствующих механической и биологической совместимости с тканями человека, и при этом должны быть учтены все свойства деградации материала. Макромолекулярная структура полимера выбирается таким образом, чтобы тогда, когда отпадает необходимость в искусственном замещении,

полимерный носитель должен полностью разложиться [Coombes, 2004; Севастьянов, 2011; Штильман, 2016]. Регулирование свойств биополимера должно применяться для разработки стратегии приспособления материала к клиническим требованиям. Скорость распада полимера должна подбираться так, чтобы синтезированная структура подходила для выбранной задачи [Gomes, 2001; Jeong, 2004]. Таким образом, биоразлагаемые полимеры, особенно ПОБ и его сополимеры, открывают широкие возможности для тканевой инженерии [Lanza, 2000; Coenen, 2018].

ГЛАВА 2
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Штамм-продуцент ПОБ

В работе использовали штамм-продуцент Azotobacter chroococcum 7Б, способный к сверхсинтезу ПОБ. Штамм выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва). Крупные клетки штамма овальной формы, грамотрицательные, размером 2,0-2,5 х 3,5-5,0 мкм с мелкозернистой цитоплазмой и компактным нуклеотидом. Молодые клетки имеют перитрихиальные жгутики, а также фимбрии, которые обеспечивают способность к движению. С возрастом культура становится полиморфной, клетки соединяются в цепочки, образуют нитчатые формы и сарциноподобные пакеты. В цитоплазме клеток появляется зернистость, связанная с накоплением гранул резервного соединения поли-3-гидроксибутирата. В этой стадии клетки агрегируются и в жидкой среде легко осаждаются, образуя плотный осадок. Стадия покоя характеризуется образованием цист и слизистых капсул. Колонии на агаризованной среде Эшби — полупрозрачные, беловатые, слизистые, со временем приобретают черный или тёмно-бурый цвет. В качестве источника углерода используют глюкозу, сахарозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, маннит, крахмал, метанол, этанол, уксусную, лимонную и пропионовую кислоты. Облигатные аэробы. Фиксируют атмосферный азот, используют нитратный азот. Растут при температуре от +10°С до +40°С, оптимум роста в диапазоне 28°С – 32°С. Диапазон pH, при котором возможен рост от 5,0 до 8,6 с оптимумом 7,2 - 7,6. Оптимум биосинтеза ПОБ при 30°С и *pH* 7,2.

2. Получение микробиологического высокоочищенного ПОБ

В качестве продуцента ПОБ был использован штамм Azotobacter chroococcum 7Б. Коллекционные штаммы Azotobacter поддерживали на среде Эшби. Клетки продуцента поли-3-оксибутирата Azotobacter chroococcum выраща-

вали при 28°С в течение 48 часов на косяках агаризованной среды Эшби состава (г/л): K_2HPO_4 — 0,2; $MgSO_4$ — 0,2; NaCl — 0,2; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,006; $CaCO_3$ — 5,0; сахароза — 20; агар — 20.

Для получения биомассы с высоким содержанием ПГБ штамм-продуцент Azotobacter chroococcum пересевали и выращивали на жидкой среде Берка состава (г/л): сахар — 20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,006; цитрат натрия — 0,5; $CaCl_2$ — 0,1; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 1,05; KH_2PO_4 — 0,2.

Культивирование осуществляли в колбах на качалке (180 об/мин) при температуре 30°С, *pH* 7.2 в течение 48 часов. Сухой вес клеток (г/л) определяли, высушивая образцы при 60°С до постоянного веса. Количество полимера в бактериальных клетках определяли путем его экстракции хлороформом, с последующим удалением растворителя и высушиванием полимера до постоянного веса при 60°С.

3. Выделение и очистка ПОБ из биомассы

Выделение из биомассы и очистка полимера включали следующие этапы:

- *Получение очищенной сухой биомассы.* К сырой биомассе, полученной после центрифугирования, для обезвоживания, удаления липидной фракции и промывки добавляли чистый изопропанол и содержимое интенсивно перемешивали до образования однородной суспензии (не менее 3 часов). Затем массу фильтровали. Отфильтрованный осадок для 2-ой промывки снова обрабатывали чистым изопропанолом. Отфильтрованную и тщательно отжатую биомассу в тонком слое сушили в сушильном шкафу при температуре не выше 60°С. Сухой материал измельчали.
- *Получение раствора ПОБ.* Процесс заключался в экстракции полимера из сухой биомассы хлороформом при умеренном нагревании (35-40°С) в течение 2 часов с последующей фильтрацией для удаления не растворяющегося клеточного материала и частичного упаривания раствора ПГБ до необходимой концентрации (2%).

- *Получение очищенного ПОБ.* К полученному на предыдущей стадии раствору ПГБ добавляли двойной объем осадителя — изопропанола. При этом начинали выпадать белые хлопья полимера. Массу охлаждали, образовавшемуся гелю давали созреть в течение 4-6 часов. Полученный гель фильтровали. Тщательно отжатый на фильтре гель полимера промывали изопропиловым спиртом. После этого гель снова фильтровали на фильтре и тщательно отжимали. Гель полимера при этом должен был иметь белую окраску, а фильтр быть лишь слегка окрашенным. Отжатый гель полимера сушили при температуре не выше 60°С. Для получения полимера высокой степени чистоты процесс растворения полимера в хлороформе, осаждение его изопропанолом с последующей промывкой повторяли не менее 3 раз.

4. Определение молекулярной массы полимера

Величину молекулярной массы поли-3-гидроксибутирата определяли методом капиллярной вискозиметрии, используя капиллярный стеклянный вискозиметр марки ВПЖ-2 (диаметр капилляра 0,56 мм).

Для измерения вязкости в вискозиметр заливали 10 мл раствора и помещали его строго вертикально в термостат. Вязкость определяли при температуре 30±0,5°С. До измерения времени истечения раствор термостатировали 15-20 минут. Среднее время истечения раствора полимера в хлороформе определяли из 4-6 результатов. Для определения характеристической вязкости измерения проводили для 4-5 концентраций. Концентрация исследуемых образцов находилась в пределах 50-200 мг полимера на 100 мл хлороформа. Времена истечения растворов в эксперименте составляли от 40 до 115 секунд. Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{\text{уд}} = \frac{t - t_0}{t_0},$$

где: t_0 — время истечения растворителя, сек; t — время истечения раствора полимера, сек.

Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка-Хаувинка-Куна, используя следующие коэффициенты [Akita, 1976]:

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

Для определения $[\eta]$ экспериментально полученные числовые значения отражали в системе координат, откладывая по оси абсцисс концентрацию раствора полимера *C*, по оси ординат — значения приведенной вязкости ($\eta_{уд}$ /*C*). Экстраполяцией полученной прямой до оси ординат получали значение характеристической вязкости $[\eta]$. Точность определения $[\eta]$ составляет ~1%. Точность определения молекулярной массы, вычисленной по уравнению Марка-Хаувинка-Куна, составляет 2-5% [Рафиков, 1978].

5. Определение содержания ПОБ в клетках по Зевенхаузену

Суспензию клеток (20-100 мг сух. биом.) центрифугировали при 5000 g в течение 20 минут. Затем клетки суспендировали в 10 мл воды и гомогенизировали, используя УЗ-обработку (30 секунд). Получали суспензию плотностью по ФЭК около 0,4-0,5 (кювета №1), длина оптического пути 1 мм. К 2 мл суспензии клеток добавляли 2 мл 2N HCl и нагревали суспензию при 100°С в течение 2 часов на водяной бане; нерастворимый остаток (гранулы ПОБ) отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 20 минут. К полученному остатку добавляли 5 мл хлороформа. Пробирки закрывали герметически и оставляли на ночь при 28°С на качалке. Затем содержимое пробирок центрифугировали и к 0,1 мл чистого хлороформного экстракта, предварительно высушенного воздушным потоком, добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты; нагревали при 100°С на водяной бане в течение 10 минут. После охлаждения количество кротоновой кислоты, образующейся в результате кислотного гидролиза ПОБ и последующей дегидратации гидроксимасляной кислоты, определяли на спектрофотометре СФ-2000 ОКБ "СПЕКТР" (Россия): длина волны — 235 нм, кювета — 1 см, контроль — H_2SO_4 концентрированная.

6. Химиотерапевтические лекарственные вещества, инкапсулируемые в полимерную матрицу ПОБ

Для систем контролируемого высвобождения цитостатиков на основе ПОБ в качестве инкапсулируемых химиотерапевтических ЛВ использованы следующие препараты: паклитаксел, хлорамбуцил, дексаметазон, этопозид, доксорубицин. Доксорубицин, метотрексат, дексаметазон, были приобретены через фирму Sigma-Aldrich (США). Паклитаксел и хлорамбуцил приобретены через фирму MP Biomedicals (США).

7. Получение микросфер из ПОБ с инкапсулированными ЛВ

Схема методов включения в состав биополимерных микросфер липофильных ПОЛВ приведена на рис. 21.

В работе были получены партии микросфер различного диаметра с инкапсулированными цитостатиками. Микросферы получали с использованием метода одноэтапного эмульгирования. Раствор ЛВ и ПОБ (Мм от 220 до 280 кДа) в соотношении 1:4 растворяли в хлороформе (4 мл) и постепенно добавляли к 250 мл водного раствора поливинилового спирта (ПВС) различной концентрации (1,2% мас.). Перемешивание производили в течение 2 часов при помощи механической верхнеприводной мешалки RZR 2021 (Heidolph, Германия) при 600-2000 об/мин. После полного испарения органического растворителя более однородные по размеру фракции микросфер получали фильтрованием через текстильные фильтры. Затем микросферы отделяли от ПВС центрифугированием (6 минут при 4400 об/мин) с использованием центрифуги 5702 R (Eppendorf, Германия), а затем 3 раза промывали водой для полного удаления эмульгатора и ЛВ на поверхности сфер. После этого микросферы сушили в термостате при 37°С и аккуратно растирали полученный порошок в ступке. Процент включения ЛВ в микросферах определяли спектрофотометрически (по максимумам поглощения: 242 и 278 нм для паклитаксела; 253 и 290 нм для доксорубицина; 242нм для дексаметазона; 290 нм для метотрексата; 259 и 305 нм для хлорамбуцила и 288 нм для этопозида) при сравнении с

контрольным раствором ПОБ и ЛВ в хлороформе. Средний диаметр и стандартное отклонение у полученных партий микросфер определяли по микрофотографиям.

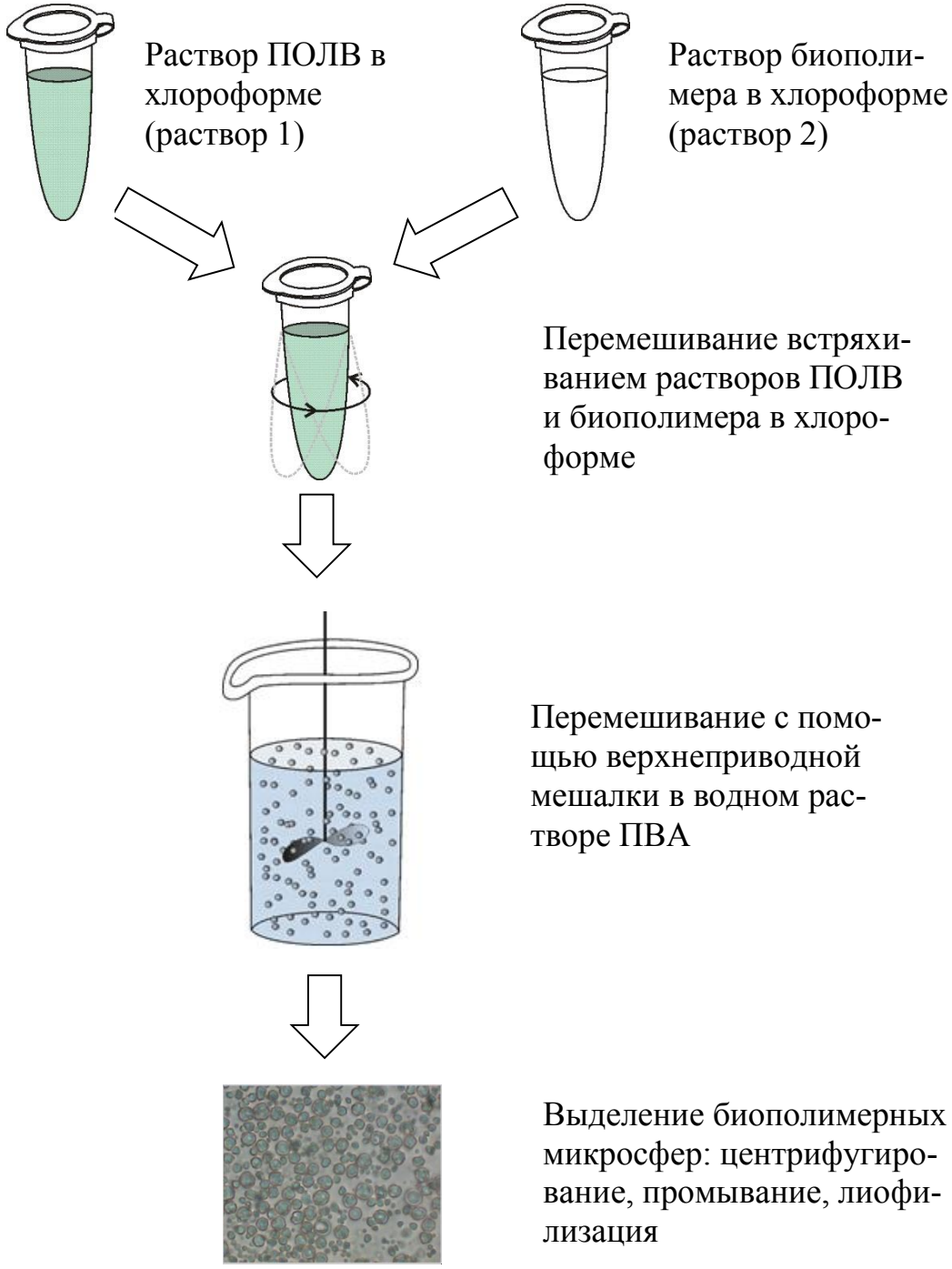


Рис. 21. Схема методов включения в состав биополимерных микросфер липофильных ПОЛВ.

8. Исследование контролируемого высвобождения цитостатиков из полимерных микросфер *in vitro*

Контролируемое высвобождение цитостатиков из микросфер проводили при 37°С в термостате ТС-1/20 (Россия) в 4 мл в 0.025М калий-фосфатного буфера (*pH* 7,4) с небольшим добавлением эмульгатора (0,05% Triton X-100 по объему): при перемешивании в пробирках на шейкере со скоростью 300 об/мин. При исследовании кинетики высвобождения цитостатиков через заданные интервалы времени (через 1-2 часа в течение первых суток, потом через 1-2 суток) микросферы отделяли от буфера центрифугированием при 14000 об/мин на центрифуге 5702 R, (Eppendorf, Германия) и добавляли 4 мл свежего буфера. Содержание цитостатика в опытном растворе определяли спектрофотометрически при сравнении с 0,025 М калий-фосфатным буфером, *pH* 7,2. Остаточное содержание цитостатиков в микросферах определяли, растворяя их в заданном количестве растворителя, с последующим определением концентрации в растворе спектрофотометрически, сравнивая с контрольными растворами известной концентрации.

9. Исследование деградации микросфер из ПОБ *in vitro*

Для определения среднего диаметра, а также степени биодеградации микросфер из ПОБ с инкапсулированными ЛВ использовали микрофотографии, полученные при помощи световой микроскопии (микроскоп Биомед, Россия) с цифровым окуляром MYscope 300M (Webbers, Тайвань); в определенные промежутки времени (1-2 суток в течение месяца) небольшую часть микросфер отбирали, исследовали микроскопически и фотографировали.

10. Сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопии

Для определения размера частиц и описания морфологии поверхности микросфер использовали метод сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Quanta 200 3D FEI Company, США).

Методом ТЭМ (трансмиссионной электронной микроскопии) посредством ультратонкого среза в парафине в расплавленном матриксе микросферы выявляли наночастицы металлов.

11. Изучение химиотерапевтической активности микросфер при их взаимодействии с культурой клеток рака молочной железы человека линии MFC-7

В таблице 5 приведены характеристики линии MFC-7 согласно каталогу Российской коллекции клеточных культур [Пинаев, 1999].

Название линии	MFC-7
Происхождение	человек, аденокарцинома молочной железы (плевральная жидкость)
Морфология	эпителиоподобная
Способ культивирования	монослойный
Условия культивирования	среда – EMEM, ДМЕМ
сыворотка	эмбриональная бычья 10%
процедура пересева	снятие клеток, используя трипсин 0.25%: версен 0.02% (1:3), кратность рассева 1:2 - 1:6, оптимальная плотность 2.0-4.0x10^4 клеток/см^2
криоконсервация	ростовая среда, 8-9% DMSO, 1.0x10^6 клеток/мл в ампуле
Жизнеспособность после криоконсервации	94% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)
Контроль контаминации	бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Контроль видовой идентичности	кариологический анализ
Кариология	2n=46, пределы изменчивости по числу хромосом 67-87, модальное число хромосом 79-82, количество маркеров 2, крупные акроцентрическая и субметацентрическая хромосомы (рутинная окраска), 29-34 (дифференциальная окраска, ATCC); количество полиплоидов 0.6%.
Туморогенность	туморогенны в мышах nude

Таблица 5. Характеристики линии MFC-7.

Клетки рака молочной железы человека культивировались в соответствующей для своей линии среде. Для используемых преимущественно в исследовании клеток MFC-7 использовали среду DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, США) с повышенным содержанием глюкозы (4,5 г/л), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки инкубировались при 37ºС в атмосфере, содержащей 5% CO_2, среда менялась каждый день. Клетки снимали с подложки раствором трипсина-версена (0,05% трипсин и 0,02% версен в фосфатно-солевом буфере (ФСБ)) (Serva, Germany) и подсчитывали с помощью камеры Горяева.

Для оценки химиотерапевтической активности рака молочной железы человека линии MFC-7 исследовали выживаемость опухолевых клеток под воздействием тестируемого агента.

Выживаемость вычисляли по формуле:

$$N[\%] = \frac{\text{кол} - \text{во клеток в опыте}}{\text{кол} - \text{во клеток в контроле}} \times 100\% \,.$$

При этом использовался стандартный МТТ-тест, как наиболее показательный метод при работе с используемыми культурами опухолевых клеток. При использовании метода МТТ микросферы тестируют в 4-х параллельных измерениях при минимальной и максимальной концентрациях, которые были обнаружены в литературных источниках по исследованию влияния полимерных микрочастиц на культурах клеток, а именно от 5 мкг/мл до 5 мг/мл [Saad, 1996; Chen, 2005; Bonartsev, 2011]. Исходя из данных предварительных экспериментов по подбору концентрации микросфер для МТТ-теста, были выбраны 5 последовательно возрастающих в 3 раза концентраций микрочастиц в рамках диапазона от 10 мкг/мл до 3 мг/мл, например, для микрочастиц с паклитакселем были выбраны концентрации: 30, 100, 300, 1000 и 3000 мкг/мл. Для этого исходную суспензию микрочастиц (10 мг/мл) разбавляют и диспергируют в той питательной среде, которую используют для культивирования соответствующей линии клеток, для достижения указанных концентраций. Предварительно сухие микросферы стерилизовали при 100°С в течение

10 минут. В качестве контроля был использован рост клеток без добавления БЛК (биополимерной лекарственной композиции). Суспензия биополимерных микросфер, не содержащих ЛВ, используют в качестве отрицательного контроля. Препарат Таксол в традиционной лекарственной форме был использован в качестве коммерческого препарата как положительный контроль. Концентрация Таксола рассчитывалась исходя из того, какое количество ЛВ высвобождается in vitro в данных условиях за 3 суток из микрочастиц в минимальной концентрации (3 мкг/мл).

Для проведения экспериментов культивируемые вышеописанным способом клетки в концентрации $1{,}0 \cdot 10^4$ в 100 мкл соответствующей среды помещают в лунки 96-луночных планшетов с объемом лунки 200 мкл и инкубируют в течение 24 часов при 37 ºС. Затем добавляют суспензию микросфер в заданной концентрации в объеме 100 мкл и инкубируют в течение 3-х временных интервалов: 24 ч, 48 ч и 72 ч (на графиках будут фигурировать 1, 2 и 3 суток) при тех же условиях. Жизнеспособность клеток контролировали с помощью теста, основанного на реакции преобразования соли тетразолиума в окрашенную соль формазана, осуществляемой активными митохондриальными ферментами клеток (MTT Cell Proliferation Kit, Sigma-Aldrich, Германия). По прошествии экспериментального времени (2, 3 и 4 суток, соответственно) содержащую микрочастицы среду удаляют, добавляют 10 мкл свежей среды и по 50 мкл смеси MTT в каждую лунку и инкубируют при 37ºС в течение 4 часов. Для растворения соли формазана перед измерением в лунки добавляют по 50 мкл ДМСО и инкубируют при 37ºС в течение 4 часов. Затем проводят измерения на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) при длине волны 450 нм. Количество живых клеток определяли по стандартной калибровочной прямой для теста MTT. Результаты представлены в виде оптической плотности. Для каждой концентрации БЛК вычисляют среднее значение из 4-х параллельных измерений и рассчитывают отношение к росту в отрицательном контроле в процентах на каждом временном интервале.

Для оценки биосовместимости БЛК был использован стандартизированный параметр IC_{50}, который широко используется в качестве основного критерия оценки действия лекарственных препаратов на культуры клеток в экспериментах *in vitro* и рекомендуется для использования как в нормативных документах (ГОСТ Р ИСО 10993.5 99) для доклинических испытаний лекарственных препаратов и медицинских изделий, так и в научной литературе, в т.ч. для оценки биосовместимости полимерных микрочастиц с инкапсулированными ЛВ [Gupte, 2004; Lina, 2005; Defail, 2006; Liu, 2006; Gryparis, 2007; Nguyen, 2008]. Параметр IC_{50} представляет собой концентрацию ЛВ, которая вызывает 50% подавление роста клеток в условиях *in vitro* при использовании стандартных тестов оценки выживаемости клеток, например, XTT-тест.

Химиотерапевтическая активность микросфер с ЛВ также была продемонстрирована при помощи световой микроскопии. Для микроскопирования применялась окраска клеток по Гимзе.

12. Оценка острой токсичности микросфер

Биополимерные микросферы с инкапсулированными цитостатиками (диаметр микросфер — 41±7 мкм) вводили 6 мышам внутрибрюшинно в концентрации 8 мг/мл в объеме 1,0 мл на мышь (25 г) или 40 мл/кг (320 мг микросфер/кг), в качестве растворителя использовали стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) с добавлением в качестве эмульгатора полисорбата (Sigma-Aldrich, USA) (0,025%). Контрольным животным вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) с добавлением в качестве эмульгатора полисорбата (Sigma-Aldrich, USA) (0,025%) в том же объеме. Наблюдение за животными проводили в течение 60 суток.

ГЛАВА 3
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. МИКРОСФЕРЫ С ВКЛЮЧЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

1.1. Микросферы с включением наночастиц оксида железа Fe_2O_3.

Наиболее современным направлением в химиотерапии является создание лекарственных форм цитостатиков для направленной доставки в очаг поражения. Локальная доставка химиотерапевтических агентов может производиться с помощью магнитного поля.

В целях получения магнитоуправляемых микросфер методом одноэтапного эмульгирования были получены и исследованы микросферы с включением наночастиц оксида железа Fe_2O_3. Морфология микросфер представлена на рис. 22, откуда можно видеть, что сферы имеют средний размер 25,2 мкм, округлую форму, в теле сфер четко фиксируются скопления наночастиц оксида железа Fe_2O_3.

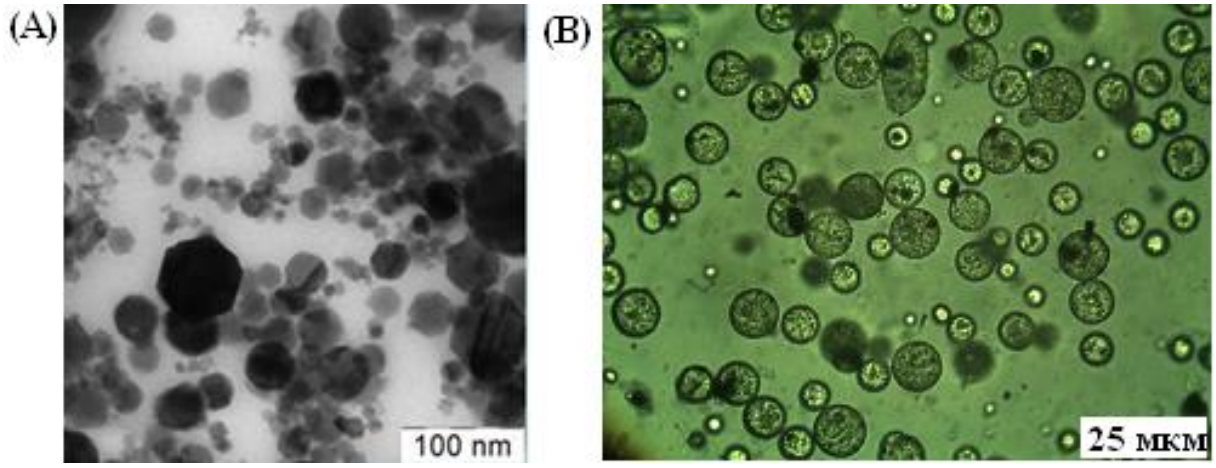


Рис. 22. (A) Нано-частица оксида железа Fe_2O_3. Сканирующая электронная микроскопия, (B) Микросферы, содержащие наночастицы оксида железа Fe_2O_3 (средний размер микросфер — 25,2 мкм). Световая микроскопия

На рис. 23 представлены микрофотографии при разном увеличении тех же микросфер с включением оксида железа, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, где морфология микросфер выглядит более четко.

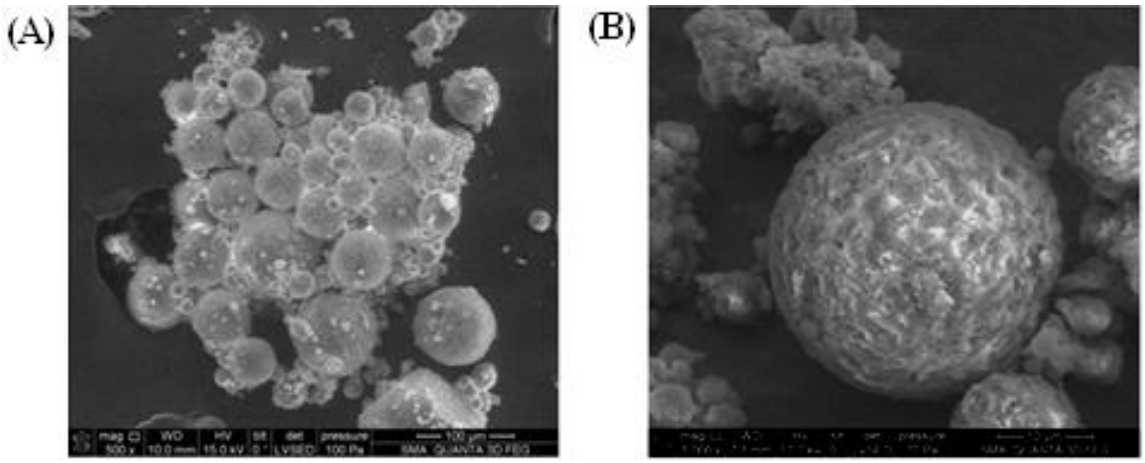


Рис. 23. Микросферы, содержащие наночастицы оксида железа Fe_2O_3. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение (А) в 500 раз, (В) в 5000 раз.

Наличие металла железа в микросферах подтверждено методом спектрального анализа, а также при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (рис. 24, 25).

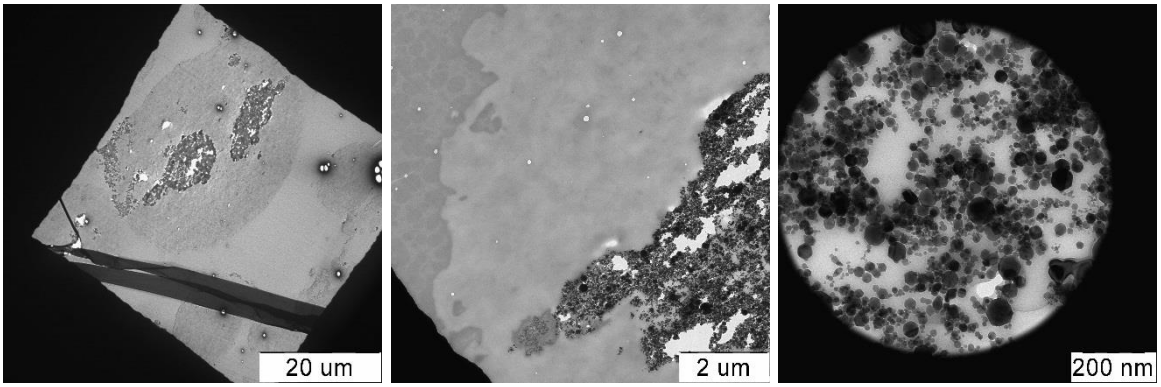


Рис. 24. Трансмиссионная электронная микроскопия. Последовательное увеличение.

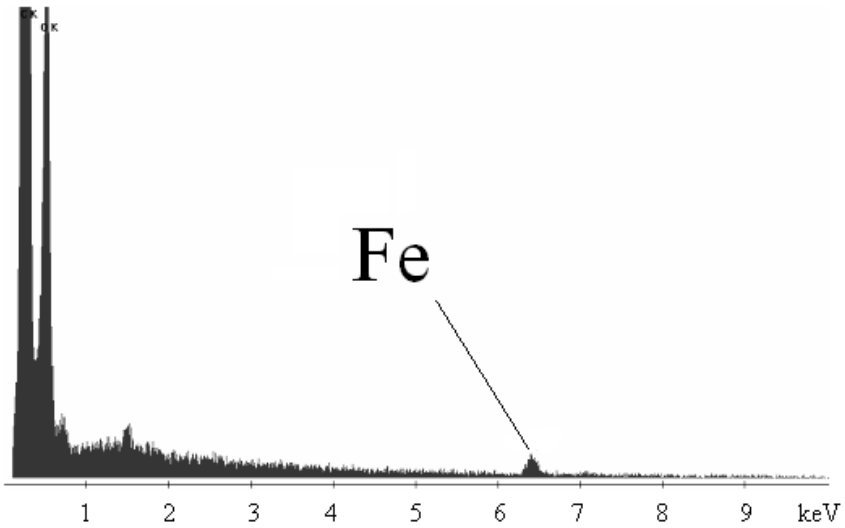


Рис. 25. Спектральный анализ микросфер, инкапсулированных наночастицами оксида железа Fe_2O_3.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки систем адресной доставки цитостатиков в целях уменьшения системного побочного отрицательного воздействия. при создании новых химиотерапевтических препаратов направленного действия.

1.2. Микросферы с включением наночастиц золота

Для успешного развития химиотерапии прежде всего необходима своевременная диагностика. Золотые наночастицы могут использоваться для диагностики локализации опухоли с помощью методов оптической томографии, а именно в методике по контролю накопления наночастиц золота в опухолях неинвазимными высокоразрешающими методами оптической когерентной томографии (ОКТ) и в дифференциальной флуоресцентной томографии (ДФТ).

Методом одноэтапного эмульгирования нами были получены микросферы с включением наночастиц золота (Au). Для изучения структуры микросфер с включением наночастиц использовалась световая и сканирующая электронная микроскопия (рис.26, 27).

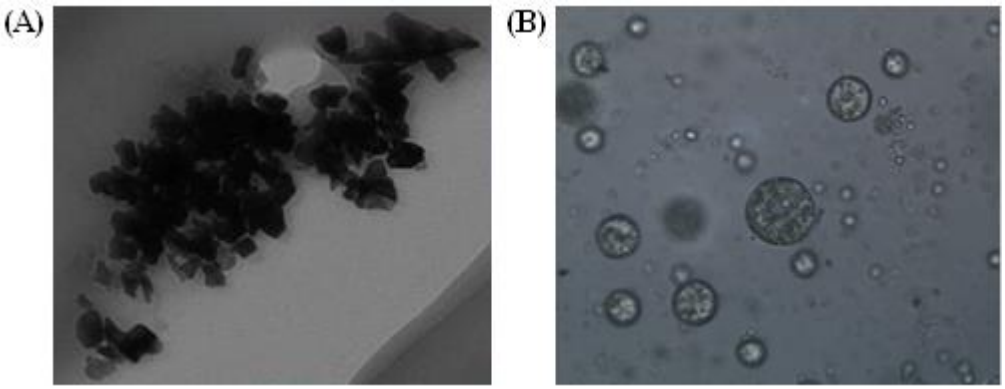


Рис. 26. (А) — нано-частицы золота. Сканирующая электронная микроскопия. (В) — микросферы, содержащие наночастицы золота Au (средний размер микросфер — 30 мкм). Световая микроскопия

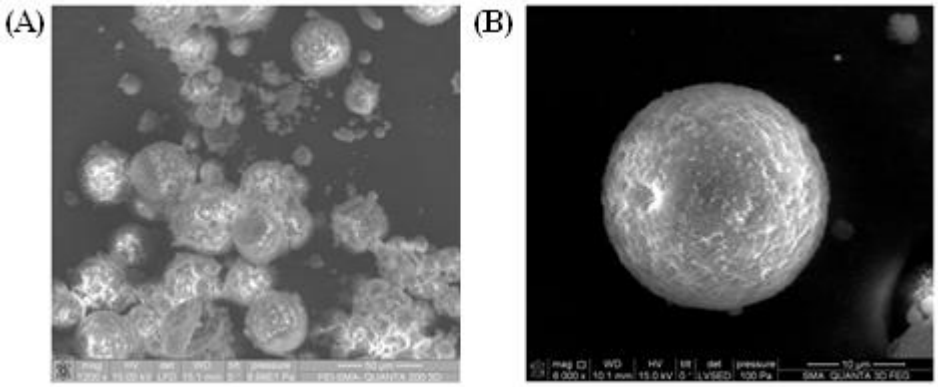


Рис. 27. Микросферы с включением нано-частиц золота (Au). (А) — увеличение в 1200 раз, (В) — увеличение в 6000 раз. Сканирующая электронная микроскопия.

На микрофотографии (рис. 27) видно, что сферы правильной формы, поверхность микросфер однородная.

Для обнаружения в матриксе сферы наночастиц золота мы использовали последовательное увеличение от 300 до 200 000 раз. При таком приближении происходит плавление микросферы и выявляются нано-частицы золота (Au).

Также нами был использован метод ТЭМ (трансмиссионной электронной микроскопии), который посредством ультратонкого среза в парафине выявил в расплавленном матриксе микросферы нано-частицы золота (Au) (рис. 28).

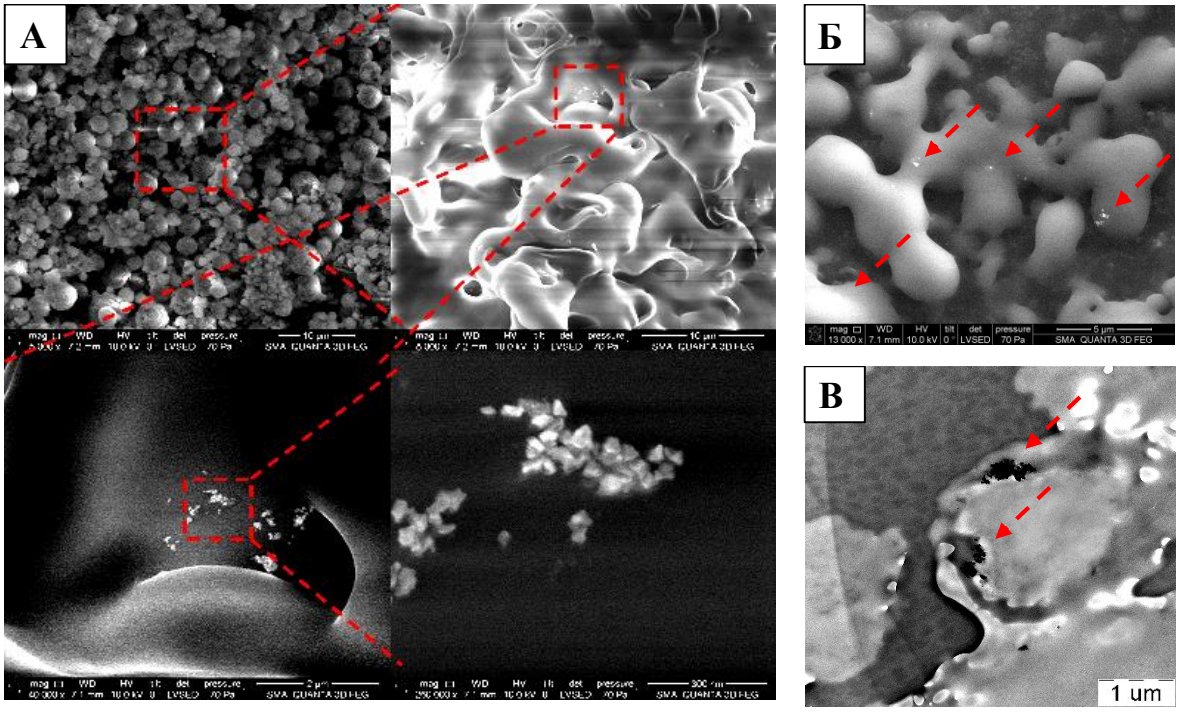


Рис. 28. Микрофотографии наночастиц золота (Au) в полимерной матрице ПОБ микросфер, полученные методом СЭМ — (А) (показана серия фотографий с последовательно возрастающим увеличением) и (Б), а также методом ТЭМ — (В) (ультратонкий срез в парафине).

На основе данного метода получения микросфер с включением наночастиц золота возможна дальнейшая разработка диагностических методов с применением оптической когерентной томографии (ОКТ) и дифференциальной флуоресцентной томографии (ДФТ).

Полученные микросферы с включением наночастиц металлов золота (Au) и оксида железа Fe_2O_3 требуют дальнейших исследований и могут послужить основой для систем адресной доставки цитостатиков, а также для диагностических целей.

2. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СИСТЕМЫ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ПРОЛИВООПУХОЛЕВЫХ ЛВ

В целях получения и исследования лекарственных систем с контролируемым высвобождением методом одноэтапного эмульгирования [Kassab, 1997], были получены следующие микросферы: микросферы с включением дексометазона, доксорубицина, этопозида, паклитаксела, хлорамбуцила, метотрексата. Форма и размер микросфер определяли с помощью световой микроскопии. Средний размер полученных микросфер варьировался в пределах 40±10 мкм. Массовую долю ЛВ в микросферах определяли спектрофотометрически при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения используемых ЛВ. Массовая доля ЛВ составляла (10±3) %. Также в целях разработки новых химиотерапевтических препаратов с включением нано-частиц металлов, были получены микросферы с включением нано-частиц золота и оксида железа.

Для исследования профиля высвобождения ЛВ из полимерной матрицы *in vitro* применялся метод контроль-релиза. Полученные данные по кинетике высвобождения послужили основанием для выбора наиболее оптимального ЛВ по параметрам пролонгации высвобождения. Им оказался Таксол, и дальнейшие исследования проводили именно с ним. Было исследовано воздействие микросфер, инкапсулированных Таксолом на клеточную культуру. Также исследовалось действие инкапсулированных Таксолом микросфер на выживаемость мышей *in vivo*. Полученные результаты позволяют разрабатывать малотоксичную форму препарата Таксол с контролируемым высвобождением. Данные, полученные по кинетике высвобождения других цитостатиков были использованы для дальнейших исследований на культуре тканей и показали результаты, которые ложатся в основу разработки новых лекарственных форм с контролируемым высвобождением. Полученные микросферы с включением металлов являются основой для создания новых химиотерапевтических препаратов направленного действия, что является перспективным этапом развития химиотерапии. В целях исследования биосовместимости

полученных микросфер был проведен ряд экспериментов по деградации полимерной матрицы. Размер и морфологию микросфер исследовали с помощью светового и электронного микроскопов. Для исследования физико-химических свойств микросфер применялся метод ДСК анализа и ИК спектроскопии.

2.1. Параметры инкапсулирования и морфология микрочастиц с различными ЛВ

Перед описанием результатов экспериментов необходимо дать определение основным технологическим параметрам как самого процесса инкапсулирования, так и полученных микросфер с инкапсулированным ЛВ:

$$\text{Степень загруженности} = \frac{\text{масса инкапсулированного ЛВ}}{\text{масса микрокапсул}} \times 100\%$$

$$\text{Эффективность инкапсулирования} = \frac{\text{масса инкапсулированного ЛВ}}{\text{общая масса использованного ЛВ}} \times 100\%$$

$$\text{Выход микрокапсул} = \frac{\text{масса полученных микрокапсул}}{\text{(общая масса использованного ЛВ + общая масса использованного полимера)}} \times 100\%$$

$$\text{Величина «взрывного» высвобождения} = \frac{\text{масса ЛВ, высвободившегося из микрокапсул в первые 24 часа}}{\text{масса инкапсулированного ЛВ}} \times 100\%$$

2.2. Микросферы с включением дексаметазона

Дексаметазон —гормональное средство (глюкокортикоид для системного и местного применения) обладает иммунодепрессивными свойствами, используется как в гормональной, так и в химиотерапии. Фторированный гомолог гидрокортизона. Дексаметазон — белый или почти белый кристаллический порошок без запаха. Растворимость в воде (25 °C): 10 мг/100 мл; растворим в ацетоне, этаноле, хлороформе. Молекулярная масса 392,47. Брутто-формула $C_{22}H_{29}FO_5$.

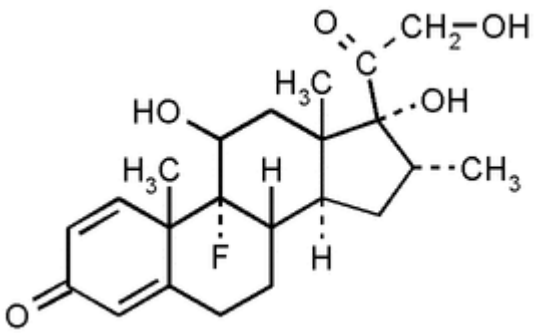


Рис. 29. Структурная формула дексаметазона.

Дексаметазон обладает иммуно депрессивным эффектом и применяется при системных заболеваниях соединительных тканей, острых и хронических воспалительных заболеваниях, а также при лечении таких онкозаболеваний, как лимфома, лейкемия, лимфолейкоз.

Методом одноэтапного эмульгирования были получены микросферы с включением дексаметазона. На рис. 30 показана фотография микросфер, сделанная при помощи светового микроскопа.

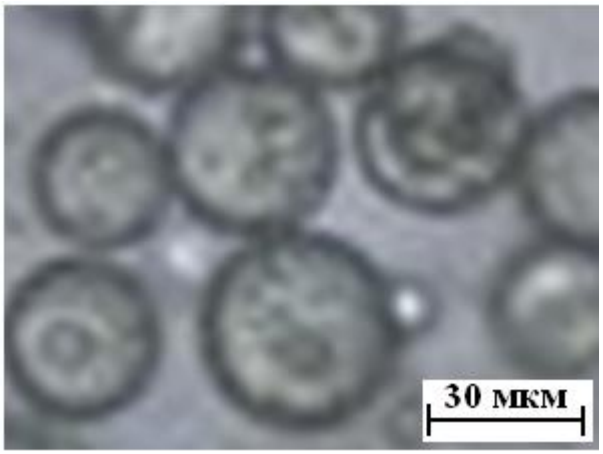


Рис. 30. Биополимерные микросферы с инкапсулированным дексаметазоном на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Световая микроскопия.

На рис. 31 приведены фотографии, сделанные с помощью сканирующей электронной микроскопии, где видна более полная структура микросфер с включением

дексаметазона, которая все яснее проявляется при использовании большего увеличения.

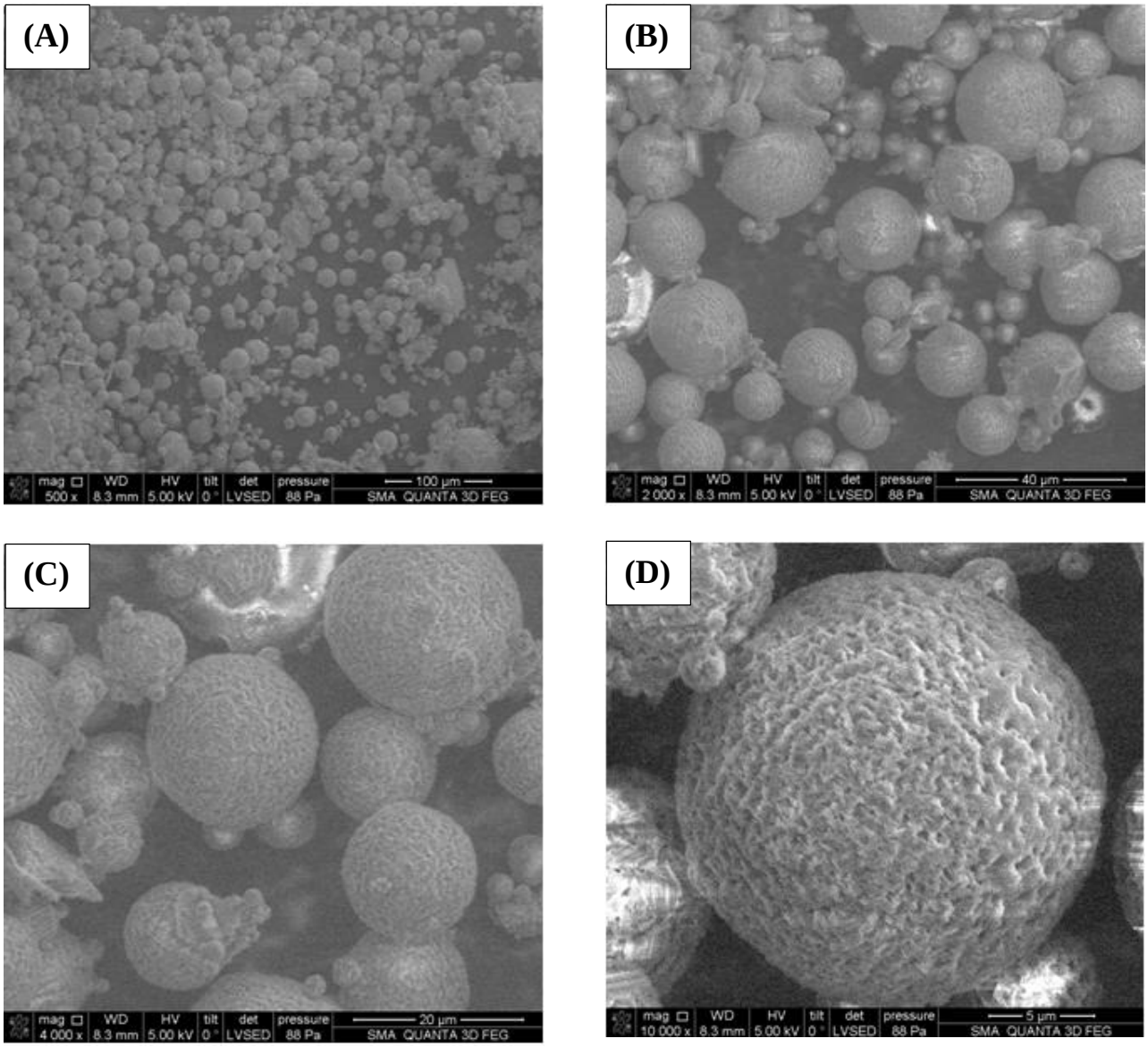


Рис.31. Биополимерные микросферы с инкапсулированным дексаметазоном на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение в 500 раз (A), в 2000 раз (B), в 4000 раз (C), в 10 000 раз (D).

На рис. 32-33 отражен кинетический профиль высвобождения дексаметазона в фосфатном буфере при 37°C. Кинетику высвобождения исследовали в четырех параллельных измерениях.

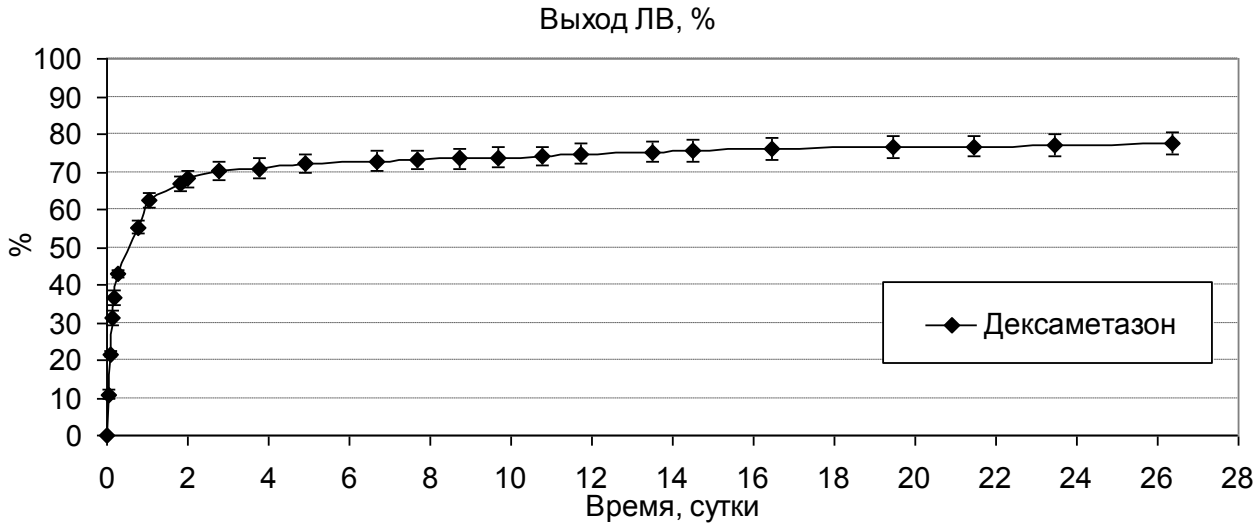


Рис. 32. Кинетика высвобождения дексаметазона из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

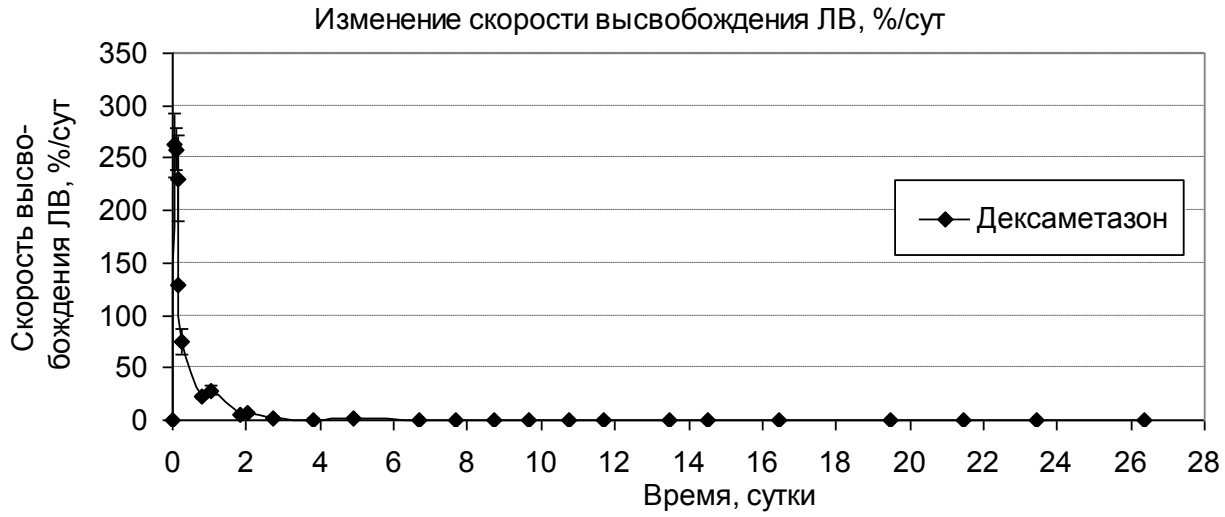


Рис. 33. Изменение скорости высвобождения дексаметазона из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер pH 7,4, Т 37°С); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

Из графика кинетики высвобождения следует, что за первые двое суток происходит высвобождение 70% включенного дексаметазона, это так называемый берст-эффект, а затем высвобождение становится равномерным и постоянным, что

мы наблюдали в течение 28 дней. Таким образом первая фаза выброса дексаметазона из полимерной матрицы характеризуется «взрывным эффектом», который видимо объясняется слабыми гидрофобными взаимодействиями между полимером и дексаметазоном. Высвобождение происходит по диффузионному механизму, что согласуется с литературными данными. Так, Бакером было показано, что полимерные системы с включением различных биологически активных веществ характеризуются диффузионным механизмом высвобождения, при котором ЛВ перемещается под действием диффузии к краю полимерного изделия и затем переходит во внешнюю среду [Baker, 1987].

Следующий этап высвобождения характеризуется степенной функцией. На поздних этапах высвобождение становится постоянным и характеризуется уже линейной функцией.

Если на первой стадии высвобождения дексаметазона из микросфер преобладают диффузионные процессы между водным буфером и ЛВ, то на более поздних этапах диффузия уступает место гидролитической деградации полимерной основы, что и объясняет линейность скорости высвобождения дексаметазона.

Из литературных данных известно, что аналогичный профиль высвобождения наблюдался у микросфер из полилактидгликолида и 5-фторурацила [Siepmann, 2006]. Однако наряду с вышеописанными двумя стадиями высвобождения, степенной и линейной, в системе “полимер – 5-фторурацил” наблюдался третий временной участок, где на завершающей стадии кинетики высвобождения наблюдался резкий выброс ЛВ. Так Шипман и сотрудники в экспериментах *in vitro* показали, что высвобождение 5-фторурацила из микросфер на основе полилактид-гликолидов происходит в три стадии, характеризующиеся различными механизмами высвобождения: на первом этапе высвобождения доминирует диффузионный процесс, когда скорость выхода ЛВ нелинейная и весьма высокая, в литературе ее часто называют “burst effects” — “взрывной эффект”; вторая часть кинетического профиля высвобождения представляет комбинацию диффузии ЛВ и деструкции макромолекул полимерной матрицы, что отражает линейный характер этого

участка; на третьем этапе разрушение полимерной матрицы вызывает резкий выброс ЛВ [Siepmann, 2002; Siepmann, 2005; Siepmann, 2006].

В отличие от полилактидов и полилактид-гликолидов, высвобождение ЛВ из полиоксибутиратной полимерной матрицы не вызывает резкого выброса ЛВ на третьем этапе. Так, в экспериментах Козенко по высвобождению 5-нитрофурфурилиденсемикарбазона из ПОБ-полимерной матрицы показано, что кинетический профиль высвобождения имеет начальную диффузионную стадию, плавно переходящую в линейную стадию, и не включает третий этап, отражающий разрушение сетки полимера [Kosenko, 2007]. Таким образом, кинетические профили высвобождения ЛВ из ПОБ в наших экспериментах, а также в экспериментах Козенко качественно похожи друг на друга. Так как ПОБ имеет большую гидролитическую устойчивость по сравнению с полилактидами и полигликолидами, завершающий этап разрушения сетки отсутствует и, следовательно, резкий выброс ЛВ из микросфер не наблюдается.

В настоящее время считается, что линейный участок профиля высвобождения может быть объяснен комбинацией диффузии и гидролитической деструкции. Однако некоторые авторы считают, что диффузионные процессы могут доминировать над деструкционными [Brannon-Peppas, 1997; Faisant, 2006]. Они протекают, прежде всего, потому, что в многокомпонентной системе, а именно такой является микрочастица, содержащая ЛВ, воду, низкомолекулярные компоненты калий-фосфатного буфера (*in vitro*) или компоненты биологических сред (*in vivo*), возникают градиенты химических потенциалов вышеуказанных компонентов. Причем потоки диффундирующих веществ могут быть противоположно направленными. Так, например, поток ЛВ направлен из микросферы в окружающую среду, тогда как поток воды имеет встречное направление. Если учесть, что диффузионные явления могут быть осложнены структурной релаксацией, химическими (каталитическими) реакциями макромолекул, порообразованием в полимерной матрице и рядом дру-

гих процессов, то становится понятным, почему для предсказания профиля контролируемого высвобождения требуется изучение совокупности нескольких химических и физических процессов [Atkins, 1996; Embleton, 2002].

2.3. Микросферы с доксорубицином

Следующим цитостатиком, который мы использовали в своих исследованиях, был доксорубицин. Доксорубицин — антибиотик антрациклинового ряда, выделенный из культуры Streptomyces peuceticus var. caesius. Молекулярная масса 579,99 Да. Красный кристаллический порошок или пористая масса. Умеренно растворим в воде, нерастворим в спирте. Нестабилен в растворах со значением *pH* менее 3 и более 7. Брутто-формула $C_{27}H_{29}NO_{11}$.

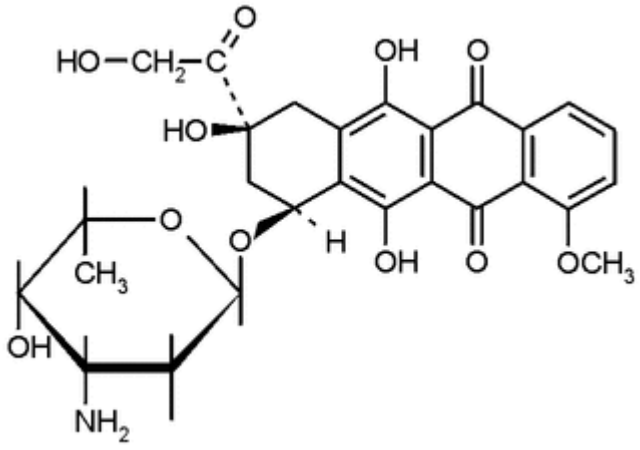


Рис. 34. Структурная формула доксорубицина.

Доксорубицин используется при лечении лимфобластного лейкоза, саркомы мягких тканей, остеогенной саркомы, саркомы Юинга, рака молочной железы и др.

Наиболее опасными из побочных эффектов доксорубицина, лимитирующими его дозу, являются кардиотоксичность и миелосупрессия. Трудно компенсируемая кардиотоксичность чаще всего проявляется у больных при достижении суммарной дозы препарата, превышающей 550 мг/м2.

Миелосупрессия, которая проявляется прежде всего лейкопенией и тромбоцитопенией наступает, как правило, на 10 день после приема доксорубицина. У большинства больных при приеме доксорубицина возникает обратимая алопеция.

У детей возможно возникновение явления гиперпигментации ногтей и кожных сгибов. При применении препарата часто отмечаются потеря аппетита, тошнота и рвота. В одиночных случаях развивается конъюнктивит или слезотечение. У некоторых больных развивается диарея. Создание малотоксичных форм доксорубицина позволило бы избежать негативных последствий его применения. Сейчас активно ведется разработка малотоксичных форм доксорубицина. Так из литературных данных известно, что уже разработаны термолипосомы с включением доксорубицина [Тазина, 2008]. Однако они подвержены очень быстрому разрушению и требуют специальных условий хранения и транспортировки. Микросферы с включением доксорубицина на основе ПОБ позволяют избежать этих недостатков.

Нами были получены микросферы, инкапсулированные доксорубицином. На рис. 35 показана фотография данных микросфер, сделанная при помощи светового микроскопа.

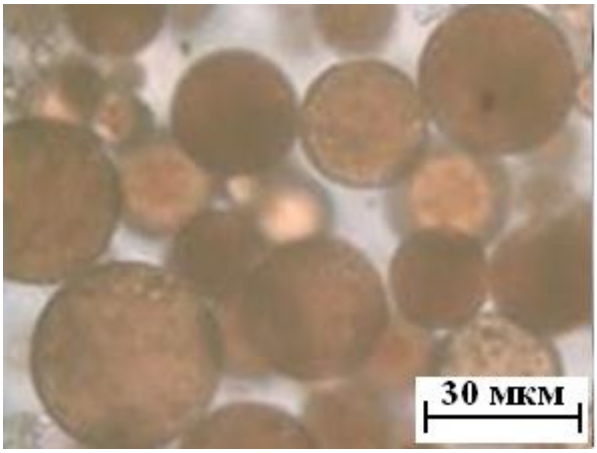


Рис. 35. Биополимерные микросферы с инкапсулированным доксорубицином на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Световая микроскопия.

Для выявления более полной картины строения микросфер с включением доксорубицина был сделан ряд микрофотографий при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 36).

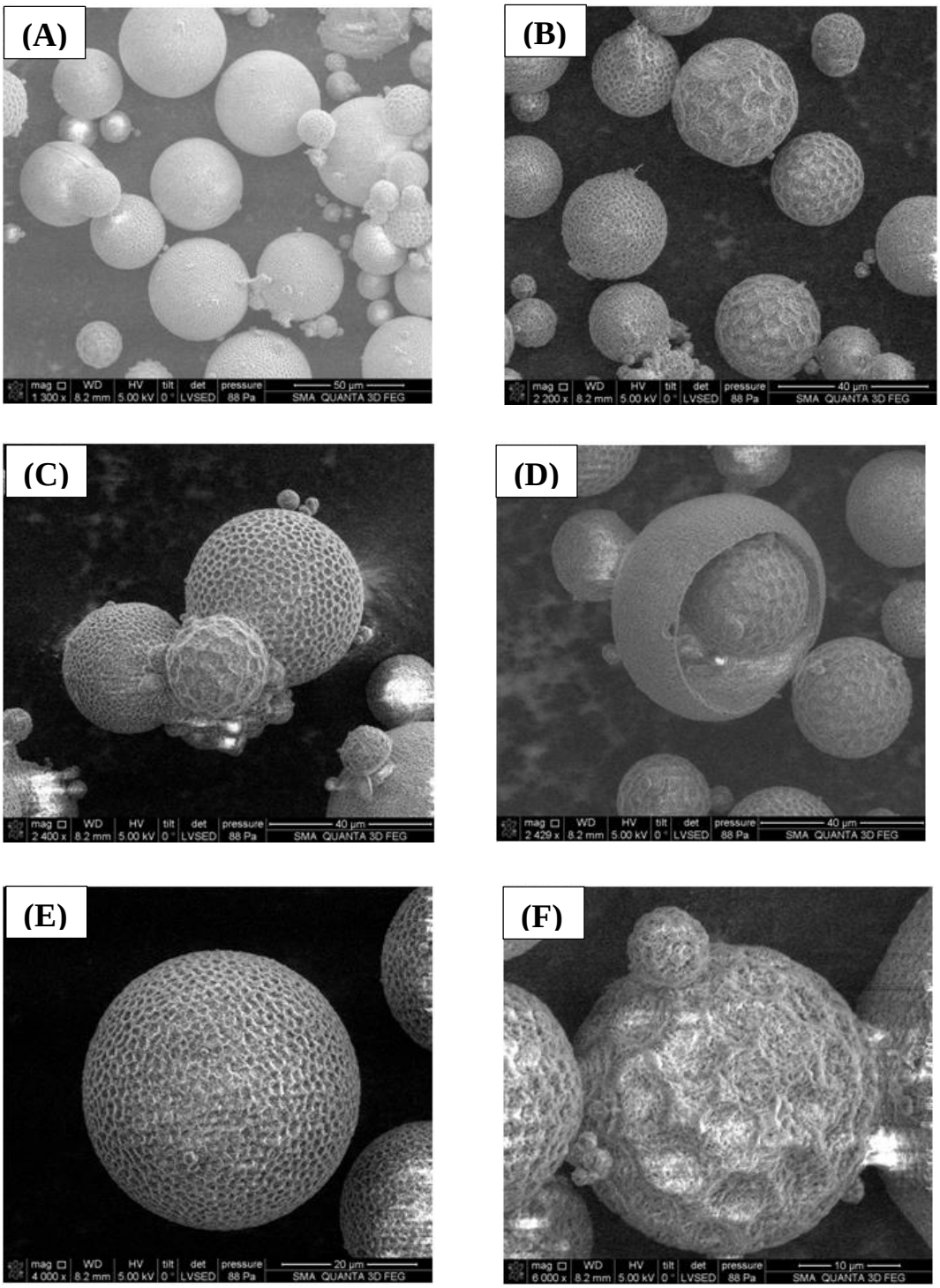


Рис. 36. Микросферы с инкапсулированным доксорубицином на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение в 1300 раз (A), в 2200 раз (B), в 2400 раз (C), в 2429 раз (D), в 4000 раз (E), в 6000 раз (F).

Анализ микрофотографий показал, что практически каждая микросфера имеет индивидуальное строение, что отражено на следующем рисунке. При этом некоторые микросферы имеют мелкоячеистую структуру в отличие от других микросфер с более крупной структурой. Иногда при формировании микросфер происходит поглощение мелкой микросферы более крупной, таким образом получаются двойные микросферы. Иногда микросферы образуют скопления — на более крупных микросферах образуются более мелкие, причем более мелкие микросферы вписываются в ячейки более крупной.

В целях исследования высвобождения доксорубицина из микросфер был применен метод контроль-релиза. Профиль высвобождения доксорубицина из микросфер отражен на рис. 37, 38.

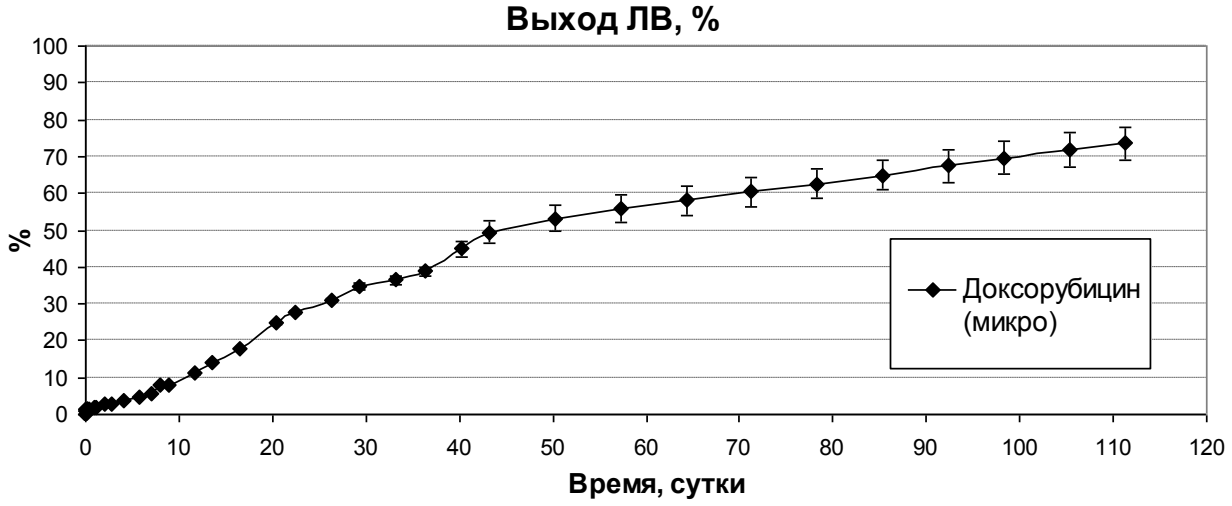


Рис. 37. Кинетика высвобождения доксорубицина из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер pH 7,4, T 37°C); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

Из данных, представленных на рис. 37 и 38 видно, что высвобождение носит долговременный пролонгированный характер. Это свойство кинетики доксорубицина может быть использовано для длительной химиотерапии.

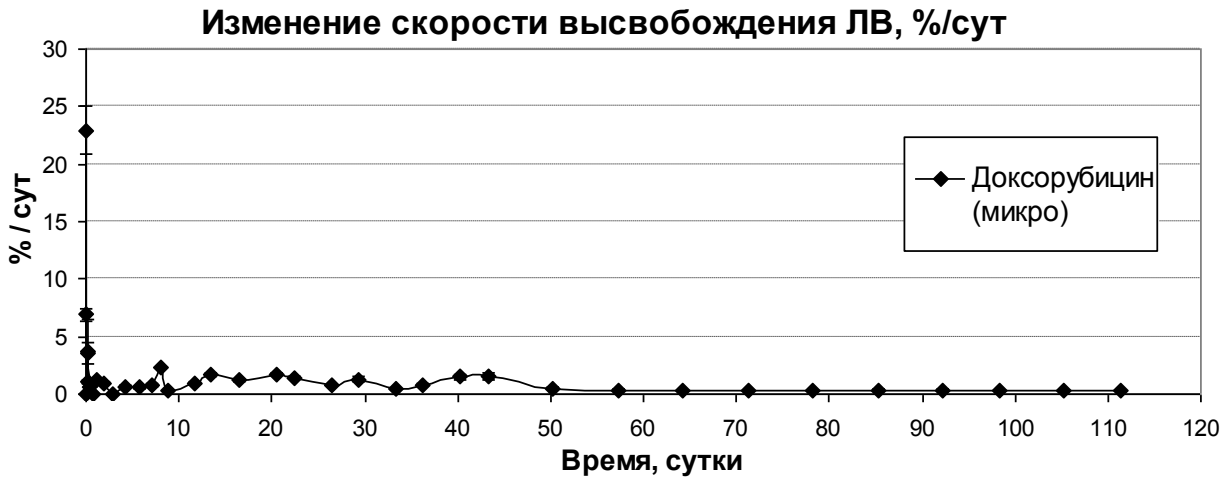


Рис. 38. Изменение скорости высвобождения доксорубицина из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер pH 7,4, T 37°C); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

Берст эффект практически не наблюдается, что позволяет избежать влияния первоначального выброса и кардинально снизить токсический эффект. Таким образом, полученные результаты дают основу для разработки малотоксичных химиотерапевтических форм доксорубицина длительного действия.

2.4. Микросферы с метотрексатом

Еще одним цитостатиком, который мы инкапсулировали в полимерную матрицу, явился метотрексат. Метотрексат — антиметаболит группы структурных аналогов фолиевой кислоты. Желтый или оранжево-желтый кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде и спирте, гигроскопичен и неустойчив к действию света. Выпускается в виде лиофилизированной пористой массы от желтого до желто-коричневого цвета, растворимой в воде. Молекулярная масса 454,45 Да. Брутто-формула $C_{20}H_{22}N_8O_5$.

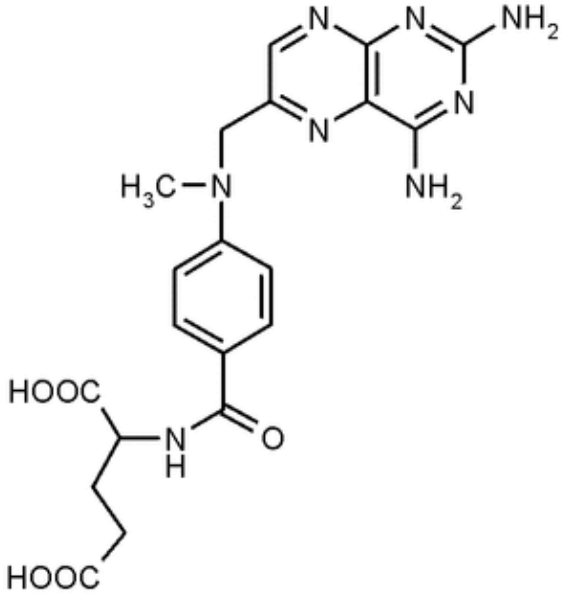


Рис. 39. Структурная формула метотрексата.

На рис. 40, 41 отражен профиль высвобождения метотрексата из полимерной матрицы.

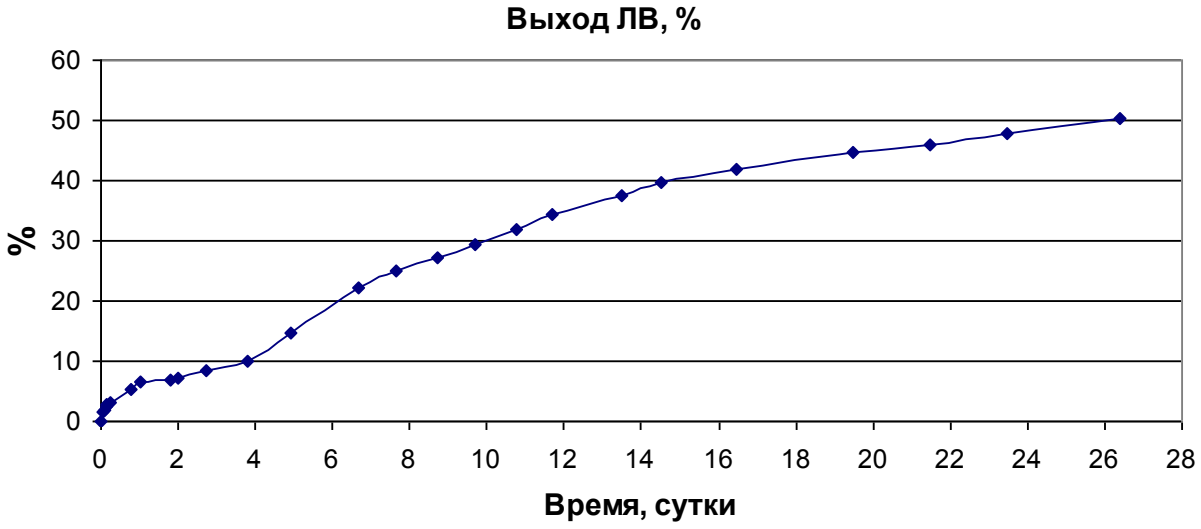


Рис. 40. Кинетика высвобождения метотрексата из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С). Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

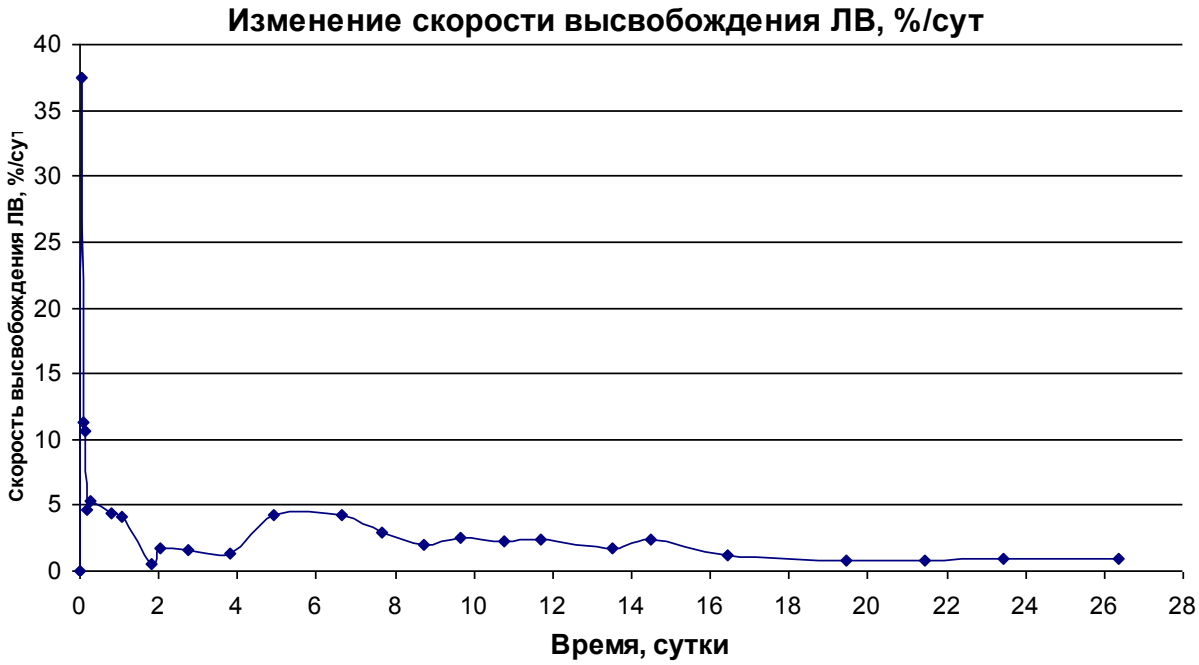


Рис. 41. Изменение скорости высвобождения метотрексата из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

Из графика, представленного на рис. 40 видно, что у метотрексата берст-эффект выражен незначительно. За 26 дней инкубации высвобождение метотрексата составило только 50%, что позволяет иметь длительный пролонгирующий эффект. Данная работа требует дальнейших исследований и открывает новое направление в инкапсулировании химиотерапевтических лекарственных веществ.

2.5. Микросферы с паклитакселом

Наиболее значимый и широко применяемый в химиотерапии препарат, который мы использовали в своей работе — паклитаксел. Паклитаксел представляет собой противоопухолевое средство растительного происхождения и является действующим веществом химиотерапевтического препарата Таксол. Алкалоид, выделенный из коры тисового дерева (Taxus brevifolia), получают также полусинтетическим и синтетическим путем. Белый или почти белый кристаллический порошок. Нерастворим в воде. Высоко липофилен. Плавится при температуре 216–217°С. Молекулярная масса 853,9 Да. Брутто-формула $C_{47}H_{51}NO_{14}$.

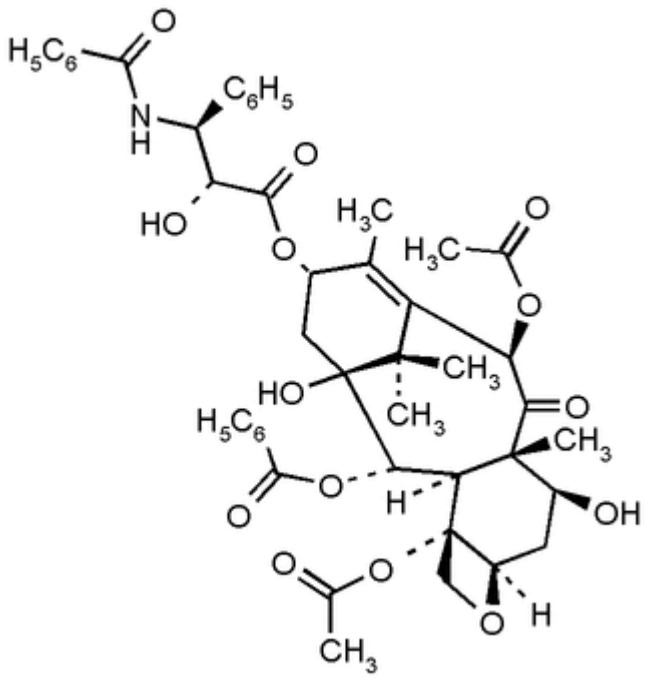


Рис. 42. Структурная формула паклитаксела.

Паклитаксел — нерастворимый в воде растительный алкалоид, обладающий мощным антипролиферативным и противоопухолевым эффектом, связанным с его способностью дезорганизовывать сборку микротрубочек во время митоза. Таксол, как и большинство лекарственных препаратов, применяющихся в онкологии, обладает высокой токсичностью, что вызывает тяжелые осложнения и снижает качество жизни пациента. Это могут быть поражения печени, почек, стволовых кроветворных клеток, нарушение свертываемости крови, анорексия и др. Более того, токсичностью обладает и сама лекарственная форма, в которую заключено действующее ЛВ Таксола — паклитаксел. Лекарственная форма Таксола производится на основе полиоксиэтилированного касторового масла, называемого кремафором. Кремафор вызывает тяжелые аллергические реакции у пациента.

Использование биосовместимых полимеров в качестве основы лекарственной формы может не только устранить многие недостатки традиционного препарата Таксол, но и добавить новые свойства, такие, например, как, пролонгированное действие. Постепенный выход ЛВ из биополимерных микрочастиц может обес-

печить длительное поддержание необходимой концентрации цитостатика в организме или локально в определенном органе или ткани. Тем самым, устранится необходимость дополнительного многократного введения Таксола, снизится токсичность и побочные эффекты препарата, повысится стабильность его молекулы и его эффективность за счет равномерной скорости подачи и эффективного расхода ЛВ. Также если в качестве основы используется биоразлагаемый полимер, то лекарственная форма после высвобождения паклитаксела полностью деградирует, а продукты его биодеградации выводятся из организма. Таким образом, полимерные лекарственные формы позволят избежать побочных эффектов и устранить недостатки традиционной химиотерапии.

Нами были синтезированы микросферы с включением паклитаксела. На рис. 43 показаны фотографии, сделанные при помощи светового микроскопа.

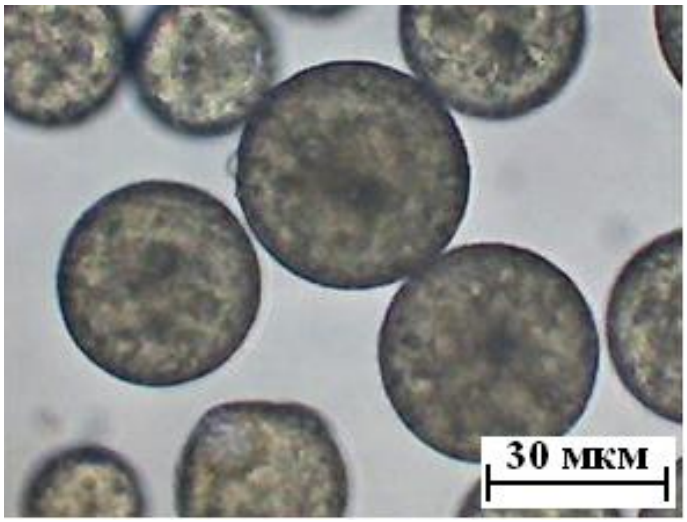


Рис. 43. Биополимерные микросферы с инкапсулированным паклитакселом на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Световая микроскопия.

Характер поверхности микросфер с включением Таксола изучали при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 44).

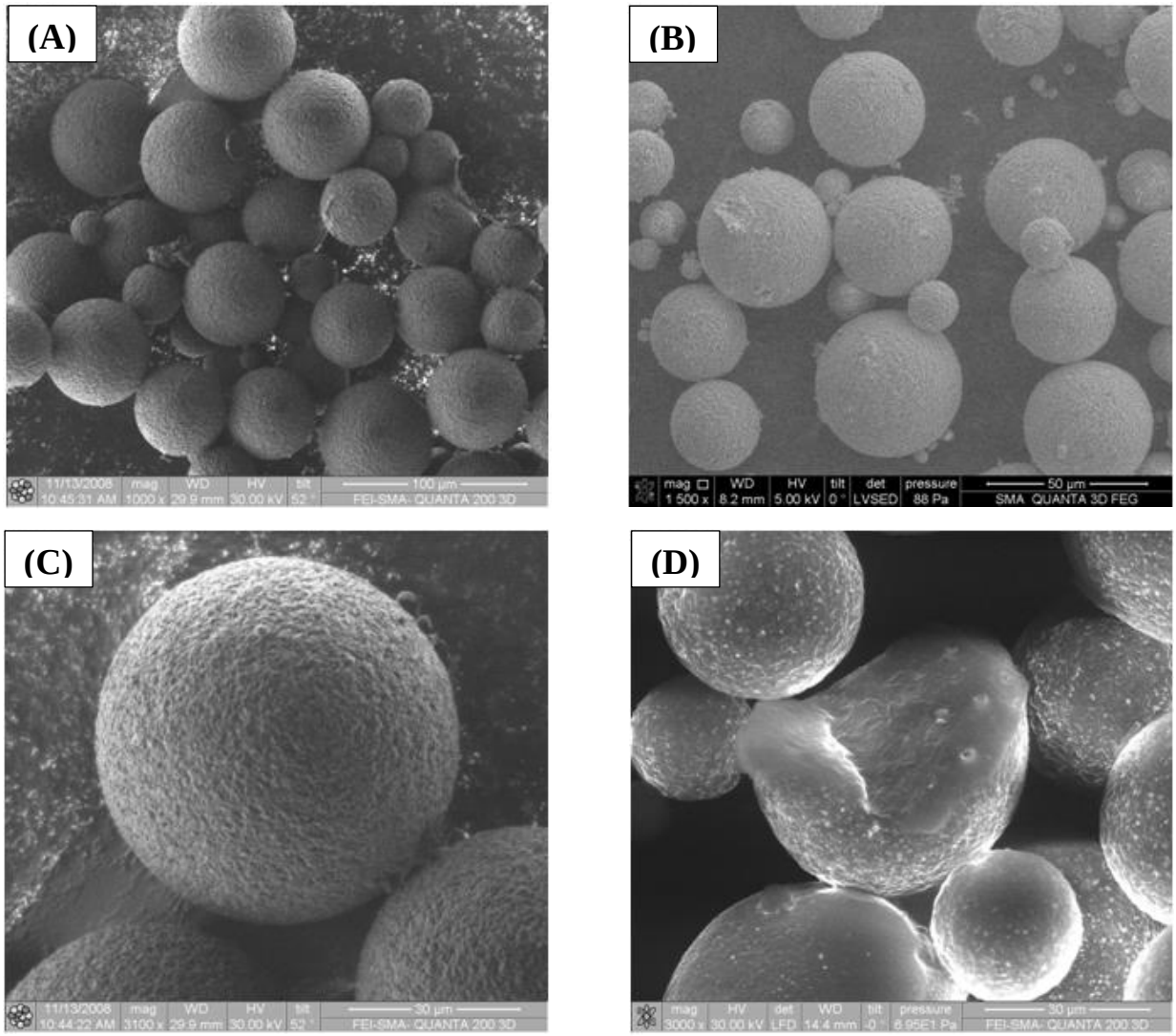


Рис. 44. Биополимерные микросферы с инкапсулированным паклитакселем на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение в 1000 раз (A), в 1500 раз (B), в 3100 раз (C), в 3000 раз (D).

На этой микрофотографии видно, что популяция микросфер с включением Таксола однородная, поверхность сфер ровная, правильной формы.

Для выявления более полной картины поверхности были сделаны фотографии с увеличением в 3100 раз, на которых отчетливо видна структурная однородность микросфер с включением Таксола. На рисунке (D) показана микросфера в разрезе. Видна плотная внутренняя структура микросферы, которая равномерно заполнена полимером и лекарственным веществом.

На рис. 45, 46 приведен профиль высвобождения паклитаксела из микросфер.

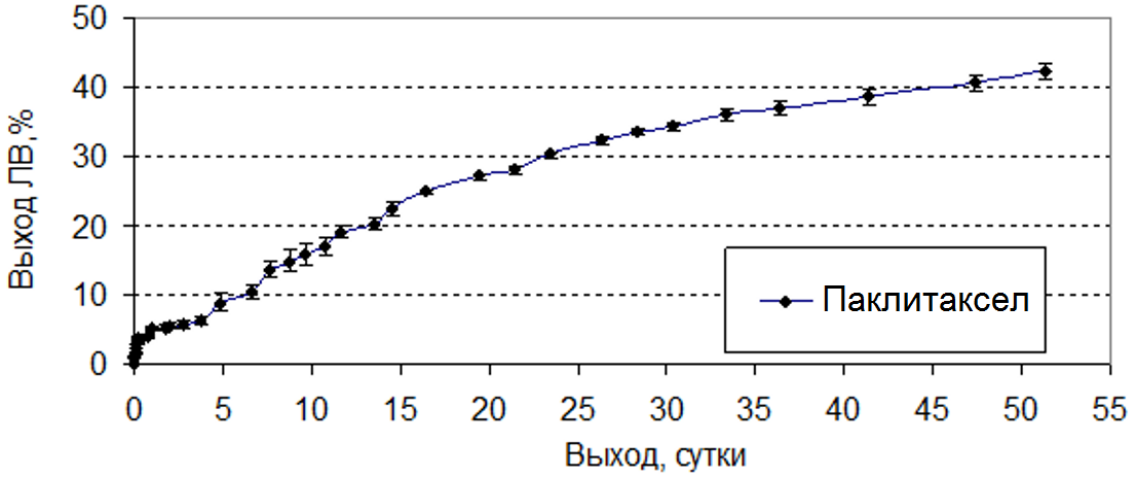


Рис. 45. Кинетика высвобождения паклитаксела из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С). Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

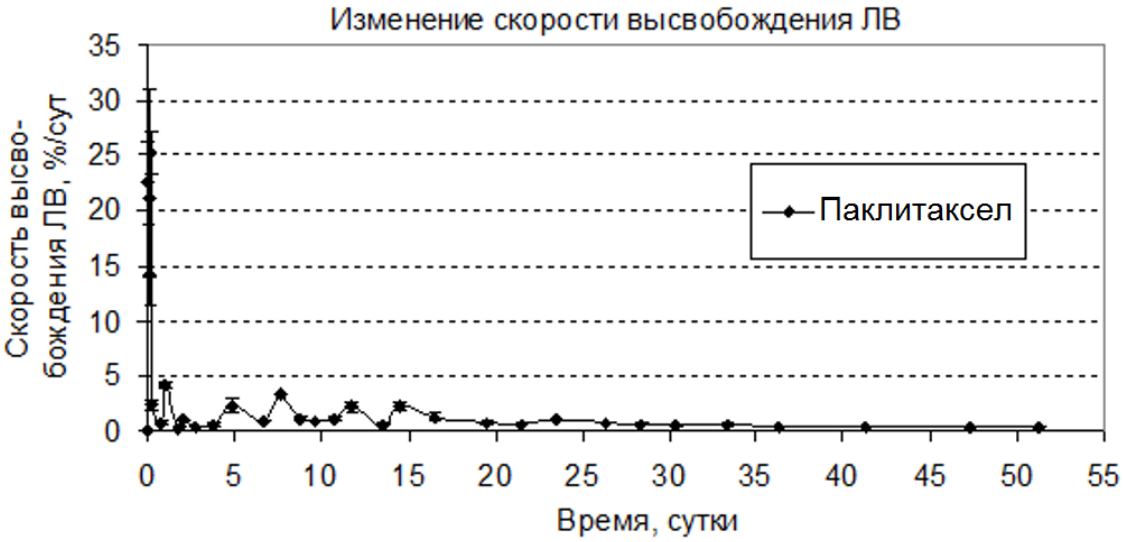


Рис. 46. Изменение скорости высвобождения паклитаксела из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

Аналогично доксорубицину и метотрексату берст-эффект у паклитаксела выражен незначительно, а кинетика высвобождения имеет долговременный пролонгированный характер с постепенным выходом ЛВ, что дает возможность разрабатывать малотоксичные формы паклитаксела с длительным периодом действия.

2.6. Микросферы с включением этопозида

Следующим цитостатиком, используемым в исследованиях, являлся этопозид. Этопозид — противоопухолевое средство растительного происхождения, полусинтетическое производное подофиллотоксина. Хорошо растворим в метаноле и хлороформе, незначительно растворим в этаноле, трудно растворим в воде и эфире. Брутто-формула $C_{29}H_{32}O_{13}$.

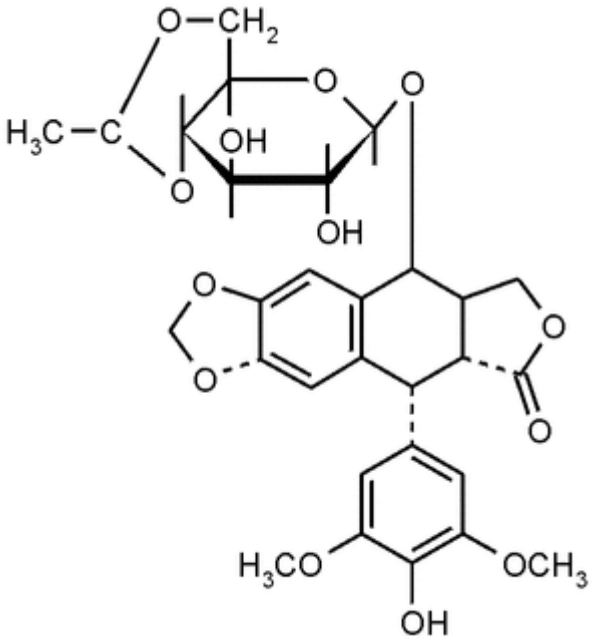


Рис. 47. Структурная формула этопозида.

Этопозид оказывает цитотоксическое действие за счет повреждения ДНК. Препарат блокирует митоз, вызывая гибель клеток в G_2 фазе и поздней S-фазе митотического цикла. Однако высокие концентрации препарата вызывают лизис клеток в премитотической фазе, что вызывает повреждение здоровых клеток. Поэтому создание малотоксичных форм этопозида позволит избежать цитотоксического действия в отношении нормальных здоровых клеток. Этопозид также подавляет проникновение нуклеотидов через плазматическую мембрану, что препятствует синтезу и восстановлению ДНК.

Нами были созданы микросферы с включением этопозида в полимерную матрицу (рис. 48).

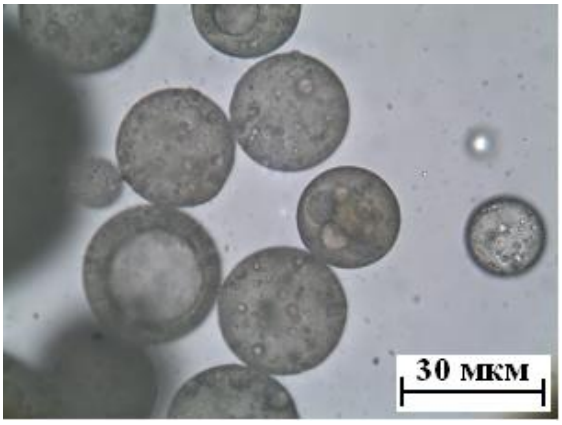


Рис. 48. Биополимерные микросферы с инкапсулированным этопозидом на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Световая микроскопия.

Для изучения структуры микросфер использовался метод санирующей электронной микроскопии (рис. 49).

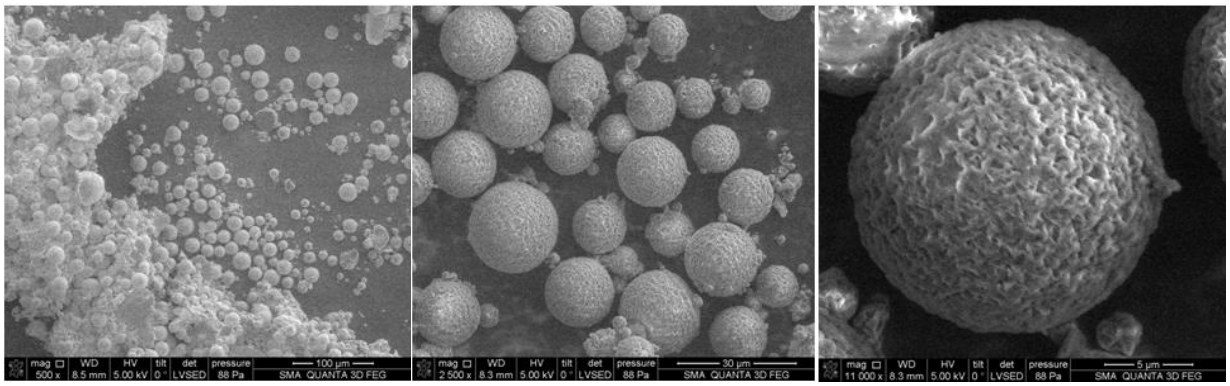


Рис. 49. Биополимерные микросферы с инкапсулированным этопозидом на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение в 500 раз, в 2500 раз, в 11000 раз.

Было выявлено, что все микросферы с включением этопозида имеют практически одинаковую структуру. Таким образом, популяция микросфер с включением этопозида является однородной по своей структуре.

Дальнейшее увеличение позволило описать рельеф поверхности микросфер. Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа фотография микросфер с этопозидом позволяет увидеть, что поверхность микросфер шероховатая с отчетливо различимыми тяжами полимера (рис. 49).

На рис. 50, 51 отражен профиль высвобождения этопозида из микросфер.

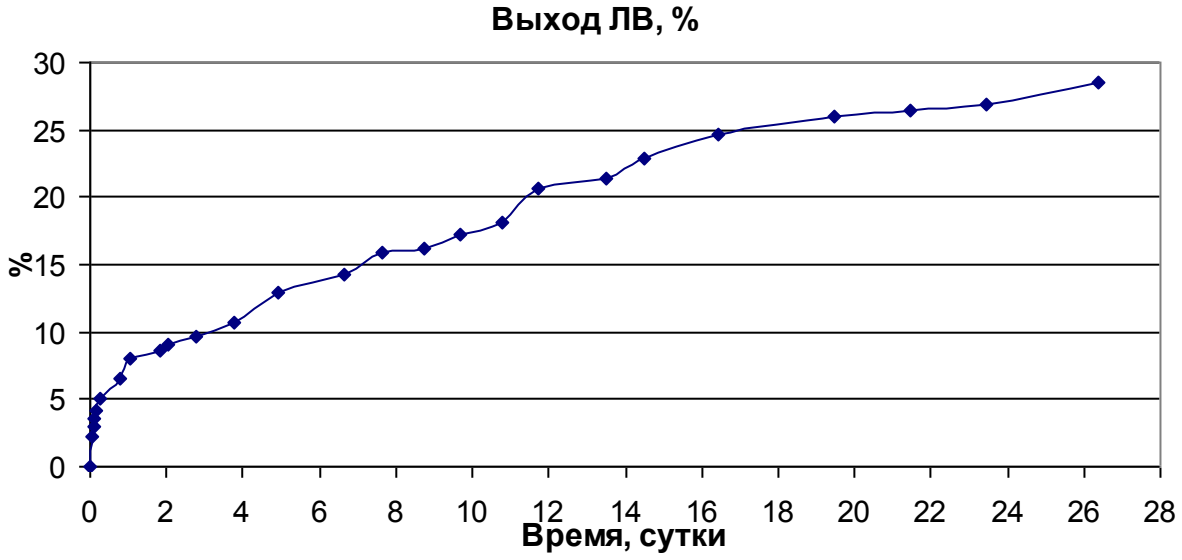


Рис. 50. Кинетика высвобождения этопозида из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С). Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3) %.

Рис. 51. Изменение скорости высвобождения этопозида из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ – (10±3) %

Исследование кинетики высвобождения демонстрирует небольшой берст эффект и длительное высвобождение с постепенным выходом ЛВ.

Полученный профиль высвобождения дает возможность для разработки малотоксичной формы этопозида с длительным периодом действия, которые позволяют избежать цитостатического эффекта на здоровые клетки.

2.7. Микросферы с хлорамбуцилом

Следующим химиотерапевтическим агентом, который мы исследовали, был хлорамбуцил. Хлорамбуцил — ароматическое производное из группы азотсодержащего иприта, бифункционального алкилирующего типа, циклонеспецифического действия. Гидролизуется в воде. Белый или белый со слабо-розовым или кремовым оттенком кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте. Брутто-формула $C_{14}H_{19}C_{l2}NO_2$.

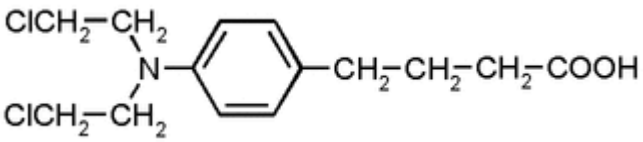


Рис. 52. Структурная формула

Хлорамбуцил связывается с нуклеопротеидами клеточных ядер. Воздействует на цепи ДНК путем алкилирования посредством образования высокореактивных радикалов этиленимония. Вызывает сшивку или разрывы нитей ДНК и нарушает их репликацию. Клинический эффект наступает только через 3-4 недели, поэтому целесообразно использование пролонгированных лекарственных форм. Хлорамбуцил в традиционной лекарственной форме вызывает различные осложнения со стороны нервной, мочеполовой, респираторной, сердечно-сосудистой систем и органов желуточно-кишечного тракта.

Нами были получены микросферы, инкапсулированные хлорамбуцилом. На рис. 53 представлена фотография, сделанная с помощью светового микроскопа.

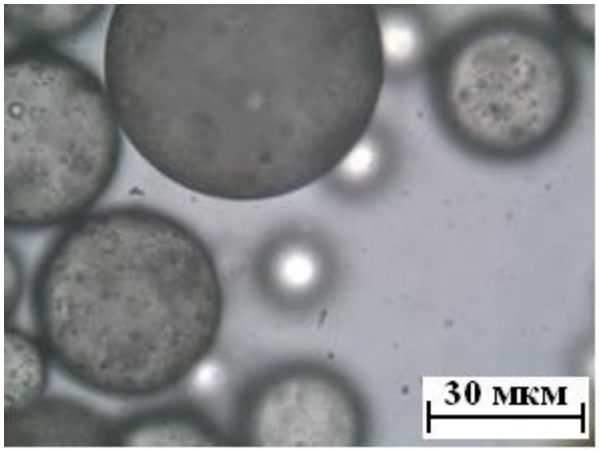


Рис. 53. Биополимерные микросферы с инкапсулированным хлорамбуцилом на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ – (10±3) %. Световая микроскопия.

Для изучения поверхности микросфер с включением хлорамбуцила использовался сканирующий электронный микроскоп. При возрастающем увеличении от 2000 до 6000 раз мы наблюдали однородную поверхность микросфер (рис. 54).

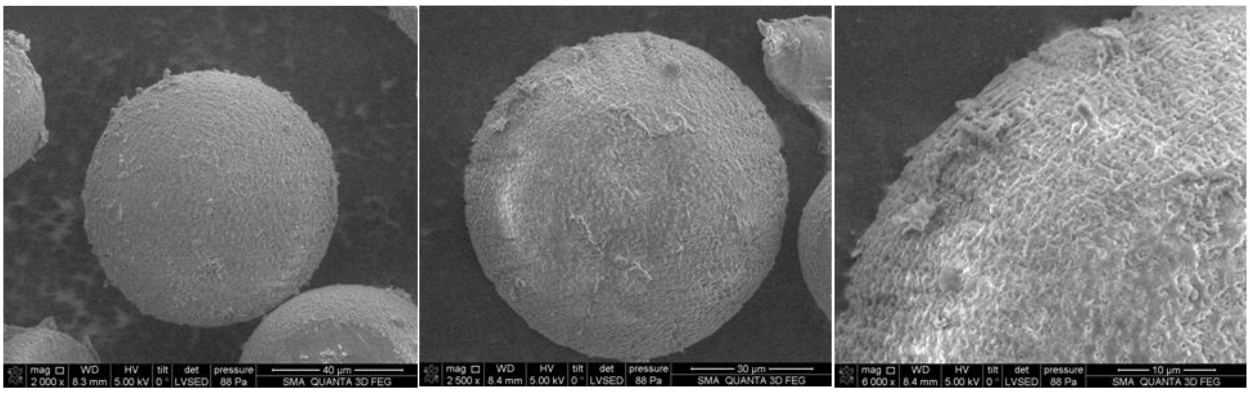


Рис. 54. Биополимерные микросферы с инкапсулированным хлорамбуцилом на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3) %. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение в 2000 раз, в 2500 раз, в 6000 раз.

На следующем этапе был исследован профиль высвобождения хлорамбуцила из полимерной матрицы *in vitro* в 0,025 М фосфатном буфере *pH* 7,4 при 37ºС (рис. 55, 56).

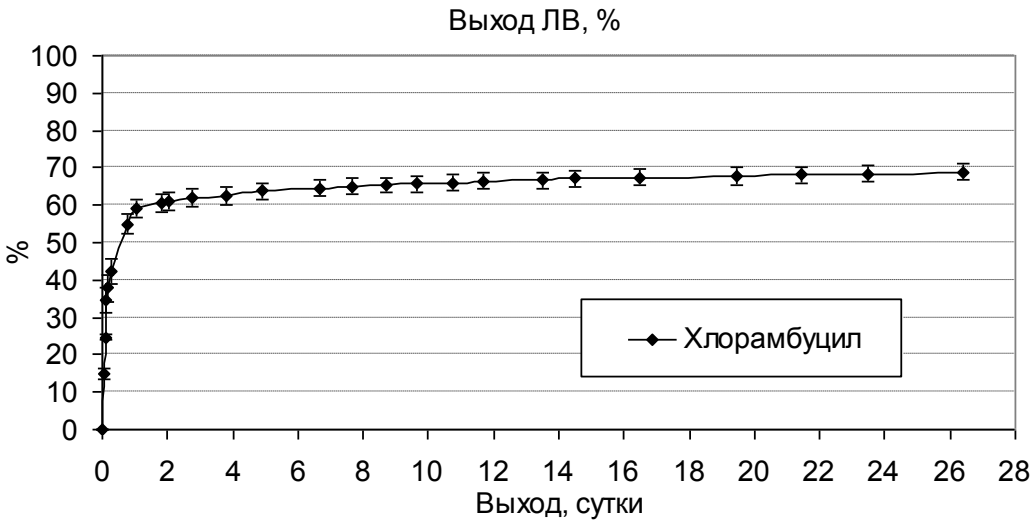


Рис. 55. Кинетика высвобождения хлорамбуцила из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С). Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

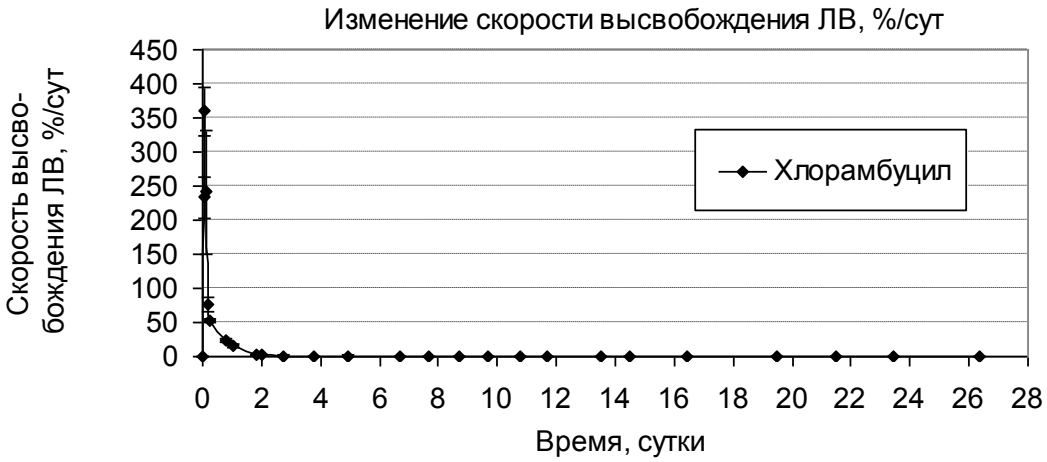


Рис. 56. Изменение скорости высвобождения хлорамбуцила из микросфер на основе ПОБ (0,025М фосфатный буфер *pH* 7,4, Т 37°С); средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3)%.

Из графика кинетики высвобождения следует, что в первые двое суток мы наблюдаем высокий берст-эффект — происходит высвобождение около 70% включенного хлорамбуцила, а затем в течение 28 дней наблюдается равномерное и постоянное высвобождение. Таким образом первая фаза выброса хлорамбуцила из

полимерной матрицы характеризуется «взрывным эффектом», который видимо объясняется слабыми гидрофобными взаимодействиями между полимером и хлорамбуцилом. Высвобождение происходит по диффузионному механизму [Baker, 1987]. Следующий этап высвобождения характеризуется степенной функцией. На поздних этапах высвобождение становится постоянным и характеризуется уже линейной функцией, в это время диффузия уступает место процессам гидролитической деградации полимерной основы.

Далее нами был проведен сравнительный анализ полученных профилей высвобождения всех исследуемых ЛВ и выбраны три из них для более полного исследования.

3. КИНЕТИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛВ

3.1. Сравнительный анализ профилей высвобождения различных ЛВ

Высвобождение ЛВ из полимерной матрицы микросфер *in vitro* согласно стандартной методике изучали в 0,025 М калий-фосфатном буфере при 37°С при перемешивании на шейкере со скоростью 30 об/мин.

На рис. 57 показана сравнительная кинетика высвобождения цитостатиков из биополимерных микросфер на основе ПОБ.

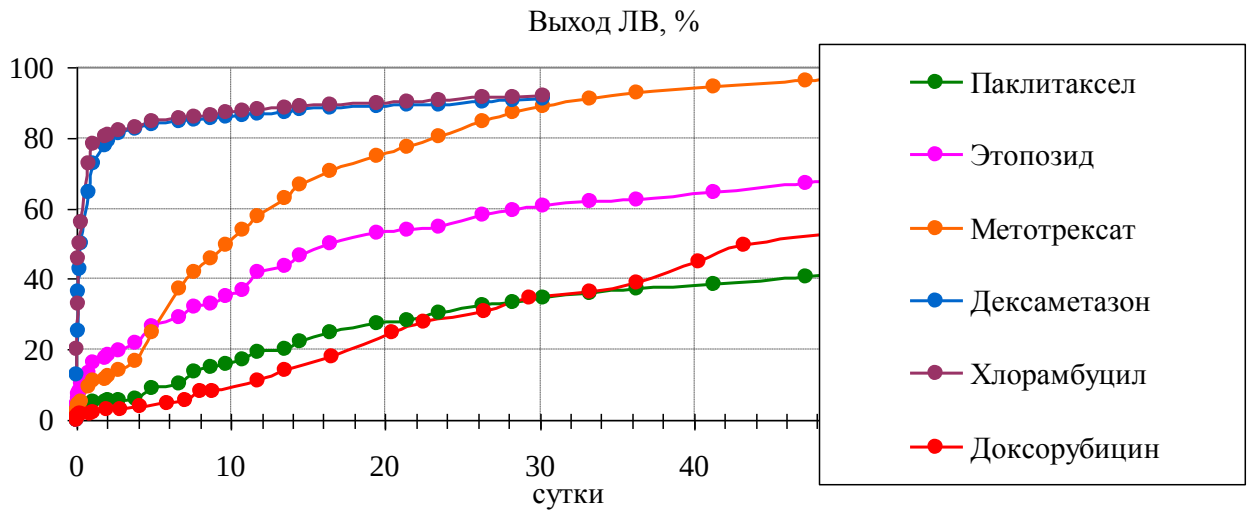


Рис. 57.Сравнительная кинетика высвобождения цитостатиков из биополимерных микросфер на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3) %.

Мы наблюдали выход исследуемых лекарственных веществ из микросфер в течение 60 суток и обнаружили, что все изучаемые цитостатики имеют различный профиль высвобождения. За этот период полное высвобождение (до 90%) было отмечено у хлорамбуцила и дексаметазона. У этопозида высвобождение составило 70%, а у паклитаксела — 40% за этот же период. Кроме того, оценивался первичный выброс исследуемого ЛВ, именуемого в литературе «взрывной эффект» ("burst effect") — стадия I высвобождения ЛВ (табл. 6).

Лекарственное вещество (ЛВ)	Доксо-рубицин	Пакли-таксел	Мето-трексат	Этопозид	Декса-метазон	Хлор-амбуцил
Выход ЛВ в 1-ые сутки,%	2	5	11	16	72	78

Таблица 6. Величина первичного высвобождения ЛВ[%] ("burst effect").

Исходя из данных, представленных на рис. 50 и в таблице 6, используемые цитостатики можно качественно разделить на две группы по величине берст-эффекта: соответственно ниже и выше 50% от всей массовой доли инкапсулированного ЛВ. К первой группе относятся доксорубицин, паклитаксел, метотрексат и этопозид. Ко второй — дексаметазон и хлорамбуцил. Первая группа ЛВ имеет более плавный выход ЛВ в начале высвобождения и более пролонгированное по длительности высвобождение, длительностью до 60 и более суток. Вторая группа ЛВ — с высоким берст-эффектом — в первые сутки высвобождает 70-80% всего включенного ЛВ, и имеет менее длительный период пролонгированного высвобождения — до 30 суток.

После анализа данных для дальнейшей работы и сравнительного изучения кинетики нами были отобраны три из шести противоопухолевых веществ, которые имеют наиболее отличные друг от друга профили высвобождения. Так как профиль высвобождения доксорубицина аналогичен профилю паклитаксела, а профиль дексаметазона аналогичен профилю хлорамбуцила, мы выбрали паклитаксел, хлорамбуцил и этопозид (рис. 58).

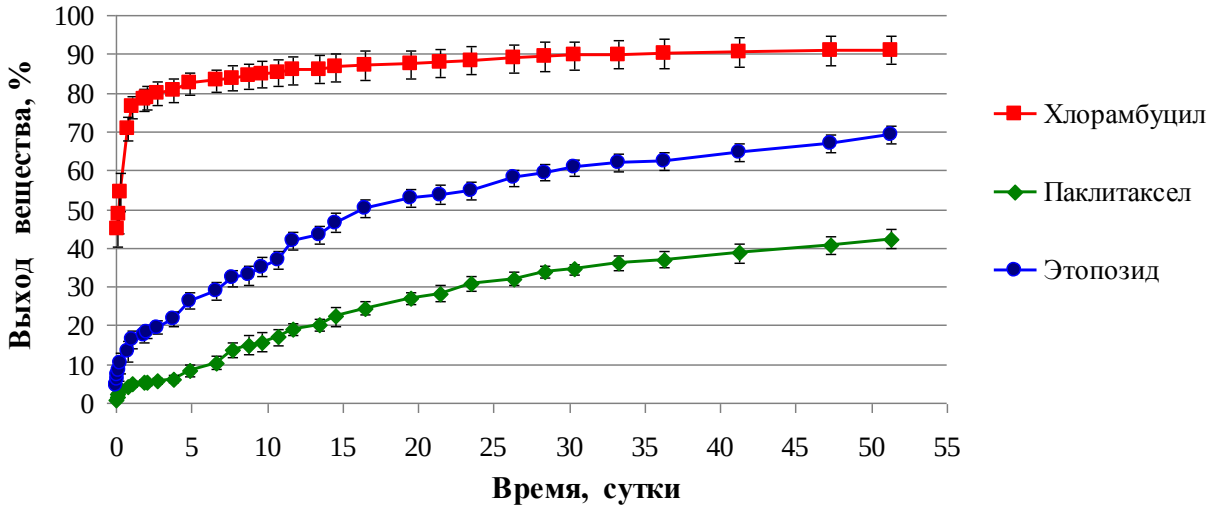


Рис. 58. Профили высвобождения паклитаксела, хлорамбуцила и этопозида.

В табл. 7 приведено сравнение величин первичного выброса отобранных цитостатиков.

Лекарственное вещество (ЛВ)	Паклитаксел	Этопозид	Хлорамбуцил
Выход ЛВ в 1-ые сутки,%	5	16	78

Таблица 7. Величина первичного высвобождения ЛВ[%] ("burst effect").

3.2. Модели кинетического профиля высвобождения

3.2.1. *Математическая модель диффузионного высвобождения ЛВ*

В работах [Crank, 1975; Baker, 1987; Vergnaud, 1993] приведено общее решение для высвобождения ЛВ из полимерной матрицы для закона Фика (уравнение диффузии) в виде бесконечных рядов тригонометрических и экспоненциальных функций. В рассматриваемой модели делается следующий ряд допущений: в начальный момент времени ЛВ равномерно распределено внутри полимера с начальной концентрацией ЛВ меньшей, чем максимальный предел растворимости; коэффициент диффузии считается постоянным в процессе высвобождения и не зависящим от концентрации; не происходит накопления вещества на границе выхода из микросфер.

Для анализа данных удобно использовать приближенные выражения этого решения, которые соответствуют ранней и поздней стадиям высвобождения ЛВ.

На ранней стадии высвобождения ($M_t \leq 60\%$) профиль «фиковского» высвобождения описывается формулой [Baker, 1987; Arifin, 2006]:

$$\frac{M_t}{M_0} = 6\sqrt{\frac{Dt}{\pi r^2}} - \frac{3Dt}{r^2},$$

где M_t и M_0— количества высвободившегося и изначально загруженного ЛВ в полимерную матрицу в момент времени t, r — радиус микросфер и D —коэффициент диффузии.

На поздней стадии высвобождения ($M_t > 60\%$) профиль «фиковского» высвобождения описывается формулой:

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2}\exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}\right).$$

Если ввести характеристическое время диффузионного процесса в виде $T = \frac{r^2}{\pi^2 D}$, формулы для ранней и поздней стадий высвобождения примут простой, зависящий только от T, вид:

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{3}{\pi^2}\left(2\sqrt{\frac{\pi\, t}{T}} - \frac{t}{T}\right), \qquad \frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2}\exp\left(-\frac{t}{T}\right).$$

На рис. 59 приведены графики высвобождения для ранней стадии (сплошная синяя линия) и поздней стадии (красная линия) в зависимости от времени в единицах характеристического времени T. Также на рис. 59 приведен график фиковского высвобождения на ранней стадии в приближение Хигучи, которое учитывает лишь квадратный корень от времени ($M_t \sim \sqrt{t}$)

$$\frac{M_t}{M_0} = 6\sqrt{\frac{Dt}{\pi r^2}} = \frac{6}{\pi^{3/2}}\sqrt{\frac{t}{T}}.$$

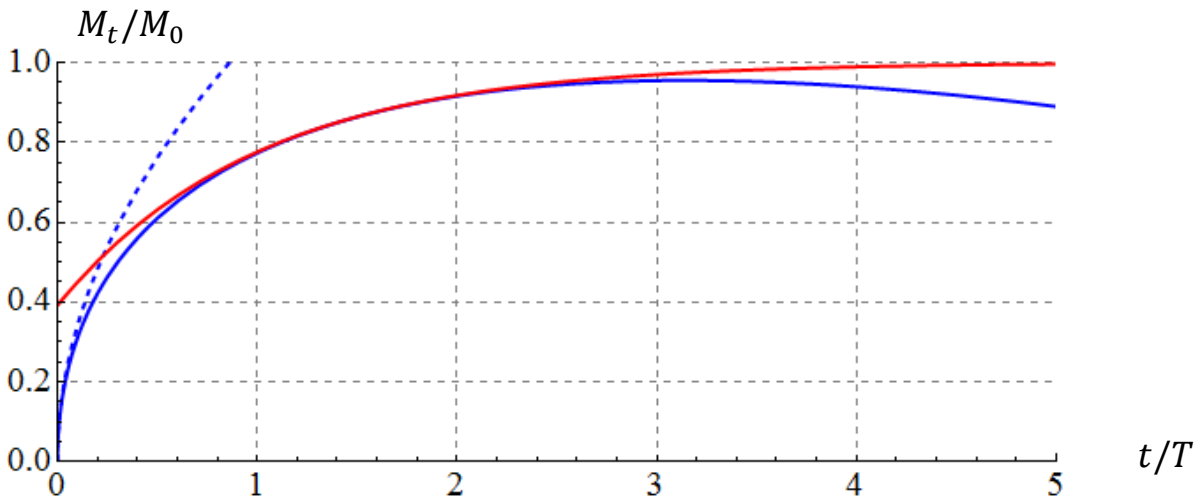


Рис. 59. Графики высвобождения в зависимости от времени в единицах характеристического времени T: сплошная синяя линия — ранняя стадия, красная— поздняя стадия; пунктирная синяя — ранняя стадия (приближение Хигучи).

Как видим из графиков в области времен от T до $2T$ профили высвобождения, описывающиеся формулами ранней и поздней стадиями, практически не отличаются друг от друга. В качестве условной границы, когда заканчивается ранняя стадия и начинается поздняя, можно выбрать $t^* = T$, чему соответствует выход вещества $\approx 77\%$.

Обычно в литературе приближение Хигучи распространяют до значений выхода ЛВ $M_t < 0.6\, M_0$. Однако, для фиковской диффузии из сравнения графиков (пунктирная и сплошная синие линии на рис. 59) видно, что профили высвобождения практически не отличаются для значений выхода ЛВ в интервале $M_t < 0.3\, M_0$.

Скорости высвобождения получаются дифференцированием по времени профилей высвобождения, которые в нашем случае для ранней и поздней стадий принимают следующий вид:

$$V_t = \frac{dM_t}{dt} = \frac{3}{\pi^2}\left(\sqrt{\frac{\pi\, T}{t}} - 1\right)\frac{M_0}{T}, \qquad V_t = \frac{6}{\pi^2}\exp\left(-\frac{t}{T}\right)\frac{M_0}{T}.$$

Графики скорости высвобождения для ранней стадии (синяя линия) и поздней стадии (красная линия) в зависимости от времени в единицах характеристического времени T показаны на рис. 60.

Как видим из формулы и графика на рис. 60 на ранней стадии скорость высвобождения пропорциональна $1/\sqrt{t}$ и стремится к бесконечности в начале координат при $t \to 0$. Таким образом, фиковская диффузия дает объяснение «берст» эффекту. На поздней стадии ($t > T$) скорость высвобождения будет экспоненциально стремиться к нулю со временем затухания T.

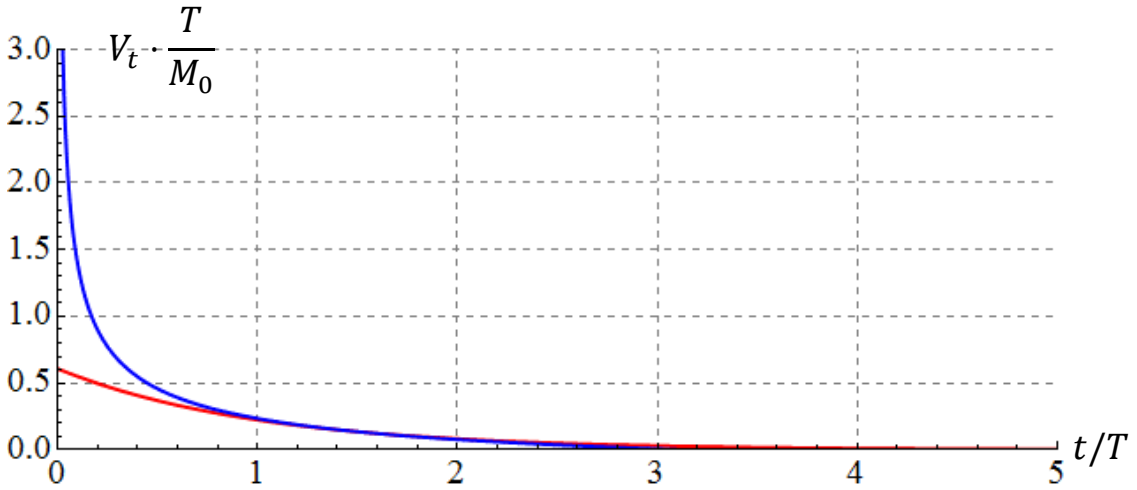


Рис. 60. Скорость высвобождения в единицах (M_0/T) в зависимости от времени в единицах характеристического времени T: сплошная синяя линия — ранняя стадия, красная — поздняя стадия.

Для быстрой грубой оценки коэффициента диффузии в «фиковской» модели можно использовать какое-нибудь характерное время, которое соответствует заданному значению M_t высвобождения ЛВ. Например, 77% высвобождения соответствует $t = T$, M_t =60% — $t_{60\%} \approx 0.5\,T$, M_t =50% — $t_{50\%} \approx 0.3\,T$, M_t =30% — $t_{30\%} \approx 0.1\,T$.

В качестве примера, оценим коэффициент диффузии в фиковской модели для паклитаксела. Из графика на рис. 58 видно, что 30% высвобождения происходит

при $t_{30\%} \approx 24$ суток, из чего следует, что характеристическое время для паклитаксела составляет $T \approx 240$ суток. Для коэффициента диффузии получим $D = r^2/(\pi^2 T) \approx 7{,}8 \cdot 10^{-14}$ см²/с при $r = 40$ мкм.

Для более точных расчетов коэффициента диффузии следует аппроксимировать данные полученные в релизе функцией ранней стадии высвобождения. В качестве параметра для аппроксимации служит введенное характеристическое время T, из которого после и вычисляется коэффициент диффузии.

Графики аппроксимации ранней стадии высвобождения ЛВ из микросфер для фиковской модели приведены на рис. 61. Как видно из этого рисунка, данные для паклитаксела (зеленая линия) и хлорамбуцила (синяя линия) хорошо соответствуют фиковской диффузии. Для хлорамбуцила (красная линия) хорошее соответствие модели характерно только на ранней стадии высвобождения. На поздней стадии высвобождения (красная пунктирная линия) наблюдаются значительные отклонения от фиковской диффузии, что по-видимому можно объяснить деградацией полимера.

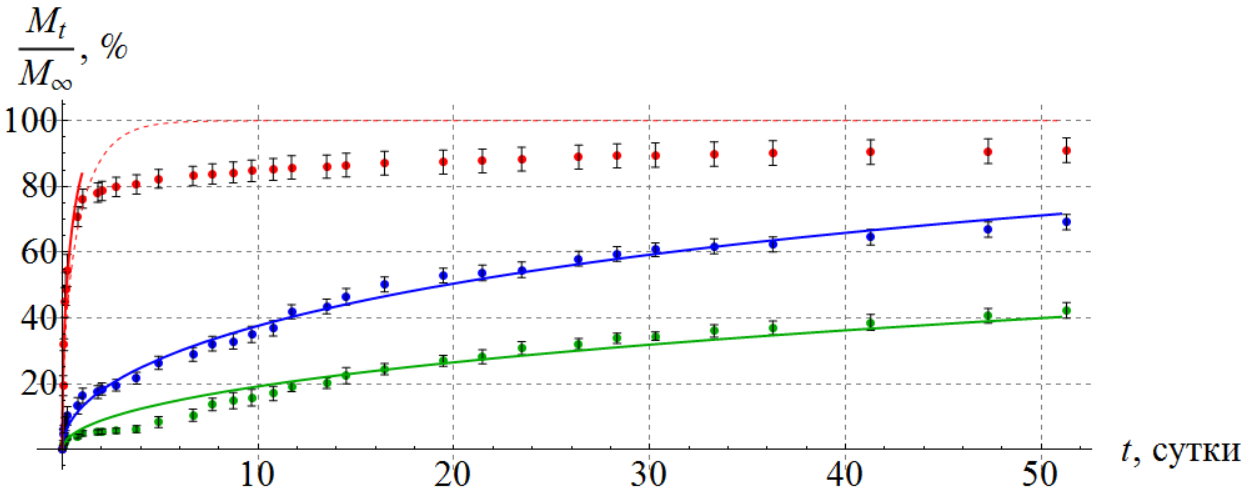


Рис. 61. Графики аппроксимации ранней стадии высвобождения хлорамбуцила (красный цвет), этопозида (синий цвет) и паклитаксела (зелёный цвет) из микросфер для фиковской модели.

В таблице 8 приведены результаты расчета коэффициента диффузии из полученных аппроксимированных данных для фиковской модели.

Лекарственное вещество	Характеристическое время T, сутки	Коэффициент диффузии D, см^2/с
Хлорамбуцил	0,75	$2.5 \cdot 10^{-11}$
Этопозид	64,7	$2.9 \cdot 10^{-13}$
Паклитаксел	282	$6.6 \cdot 10^{-14}$

Таблица 8. Коэффициенты диффузии ЛВ для фиковской модели.

3.2.2. *Эмпирические модели кинетического профиля высвобождения*

Как уже отмечалось выше, модель фиковской диффузии имеет ряд существенных ограничений, которые накладывают свои ограничения на область применения полученных с её помощью результатов.

Ниже рассмотрим четыре широко применяемые эмпирические модели: модели нулевого и первого порядка, а также модели, которые основываются на уравнениях Higuchi [Higuchi,1961] и Peppas-Korsmeyer [Korsmeyer, 1983; Peppas, 1985].

Модель нулевого порядка описывается уравнением

$$M_t = V_0 t$$

Скорость высвобождения V_0 в модели нулевого порядка не зависит от времени. График представляет собой линию, выходящую из начала координат. Обычно эта модель применима для самой начальной фазы высвобождения. Скорости высвобождения (коэффициенты при t) позволяют судить о темпе протекания начального «берст»-эффекта. На рис. 62 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели нулевого порядка. Как мы видим из результатов аппроксимации, наибольшим «берст»-эффектом обладает хлорамбуцил.

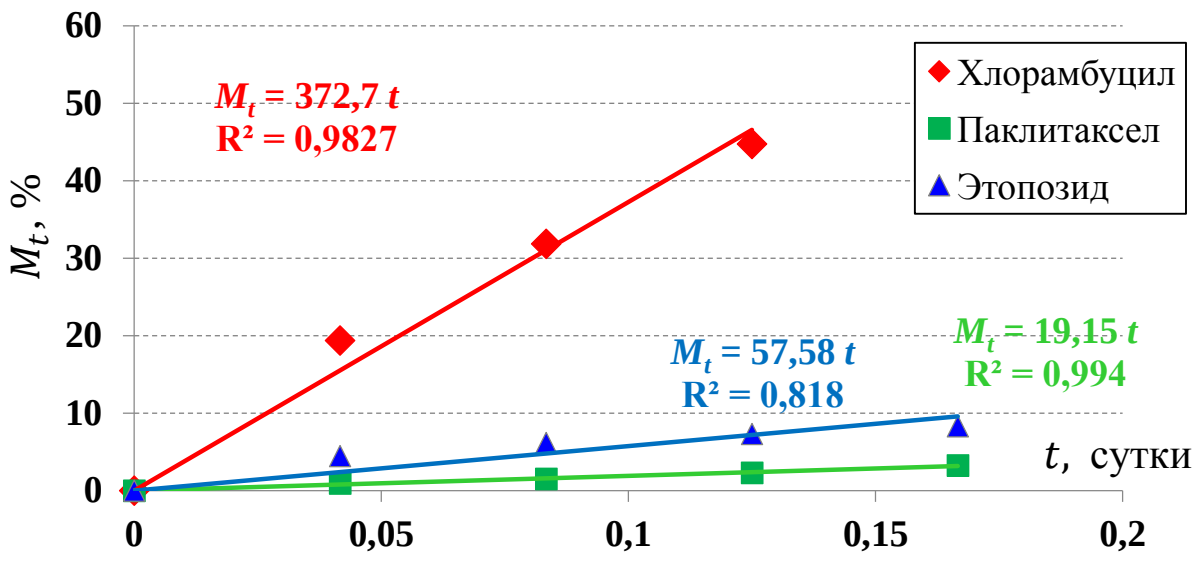


Рис. 62. Аппроксимация высвобождения ЛВ из микросфер для модели нулевого порядка.

<u>Модель первого порядка</u> описывается уравнением

$$\ln\left(1-\frac{M_t}{M_0}\right)=k_1-k_2t,$$

где k_1, k_2 — постоянные процесса. Это уравнение эквивалентно уравнению

$$\frac{M_t}{M_0}=1-k_3\exp(-k_2t),$$

где $k_3=e^{k_1}$ — постоянный предэкспоненциальный множитель, а обратная величина k_2 имеет смысл времени затухания. Именно такой зависимостью описывается поздняя стадия «фиковской» диффузии. Поэтому моделью первого порядка лучше описывать конечную стадию высвобождение ЛВ.

На рис. 63 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели первого порядка. Достаточно высокие коэффициенты достоверности ($R^2\approx0.95$) для этопозида и паклитаксела указывают, что у них уже началась поздняя стадия высвобождения. Значение коэффициента достоверности для хлорамбуцила ($R^2\approx0.9$) по-видимому, как уже отмечалось выше, можно объяснить деградацией полимера.

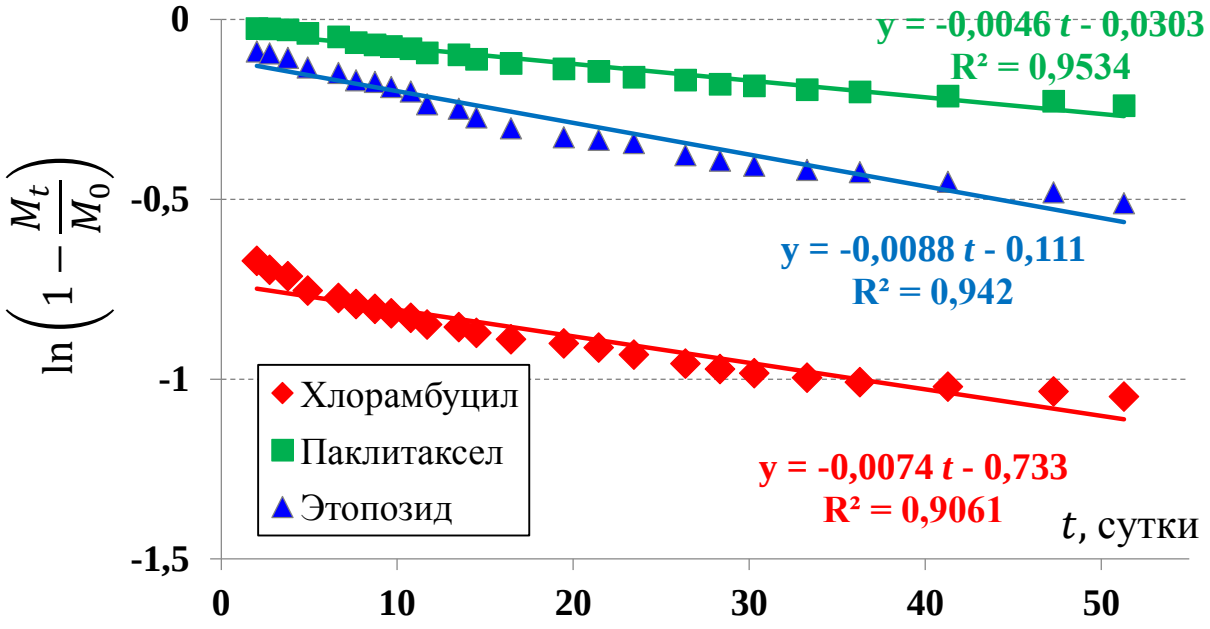


Рис. 63. Аппроксимация высвобождения ЛВ из микросфер для модели первого порядка

Модель Higuchi описывается уравнением

$$M_t = k\sqrt{t},$$

где k — постоянная процесса. Именно такой зависимостью описывается ранняя стадия «фиковской» диффузии, в которой постоянная k связана с коэффициентом диффузии соотношением $k = 6\sqrt{\frac{D}{\pi r^2}}\,M_0$. Поэтому моделью Higuchi лучше описывать начальную стадию высвобождение ЛВ ($M_t < 0.6\,M_0$).

На рис. 64 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели Higuchi, для которой графики в координатах $(\sqrt{t}, M_t)$ должны быть прямыми. Высокие коэффициенты достоверности ($R^2 \approx 0.97$) указывают, что ранняя стадия высвобождения имеет фиковский диффузионный характер

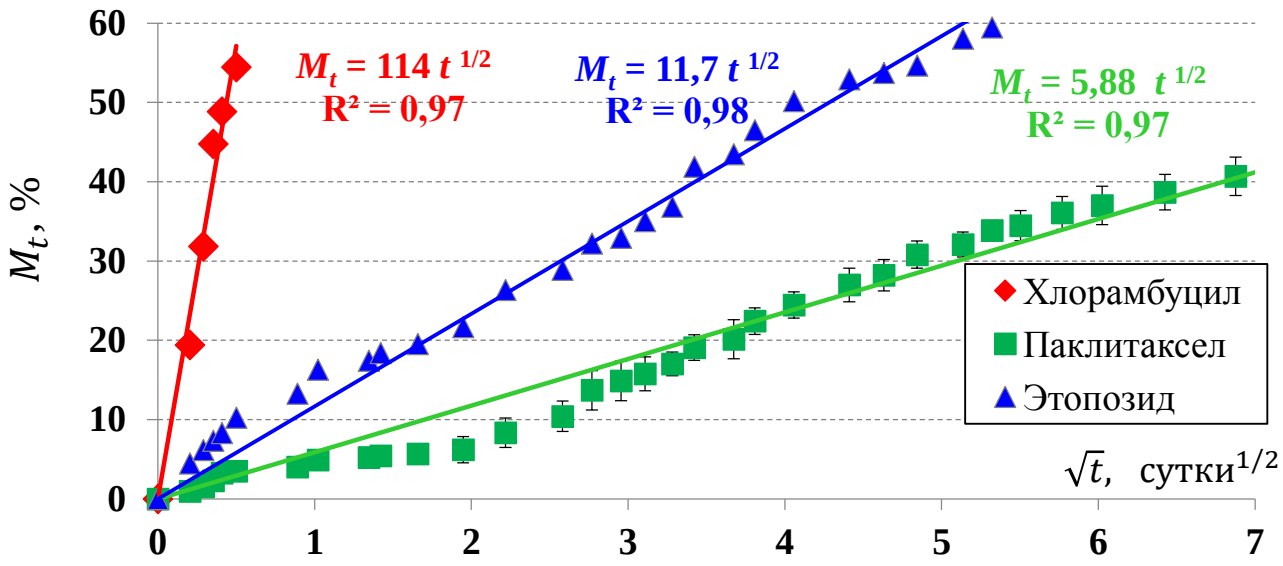


Рис. 64. Аппроксимация высвобождения ЛВ из микросфер для модели Higuchi.

Интересно сравнить полученные результаты с аппроксимацией данных для фиковской модели. Введенное характеристическое время может быть вычислено через полученный коэффициент k:

$$T = \frac{36}{\pi^3}\left(\frac{M_0}{k}\right)^2.$$

Для рассчитанных коэффициентов хлорамбуцила, этопозида и паклетаксела для характеристических времен соответственно получим 0.9, 85, 336 суток, что находится в хорошем согласии с фиковской апроксимацией (табл. 8).

<u>Модель Peppas-Korsmeyer</u> описывается уравнением

$$M_t = k\,t^n,$$

где k, n — постоянные процесса. В зависимости от показателя степени n различают следующие типы высвобож-дения: n = 0,5 — фиковская диффузия, 0,5 < n < 1 — аномальная фиковская диффузия, n = 1 — модель нулевого порядка.

На рис. 65 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели Peppas-Korsmeyer. Близость показателя экспоненты к 0.5 для исследуемых ЛВ указывает на фиковский характер диффузии.

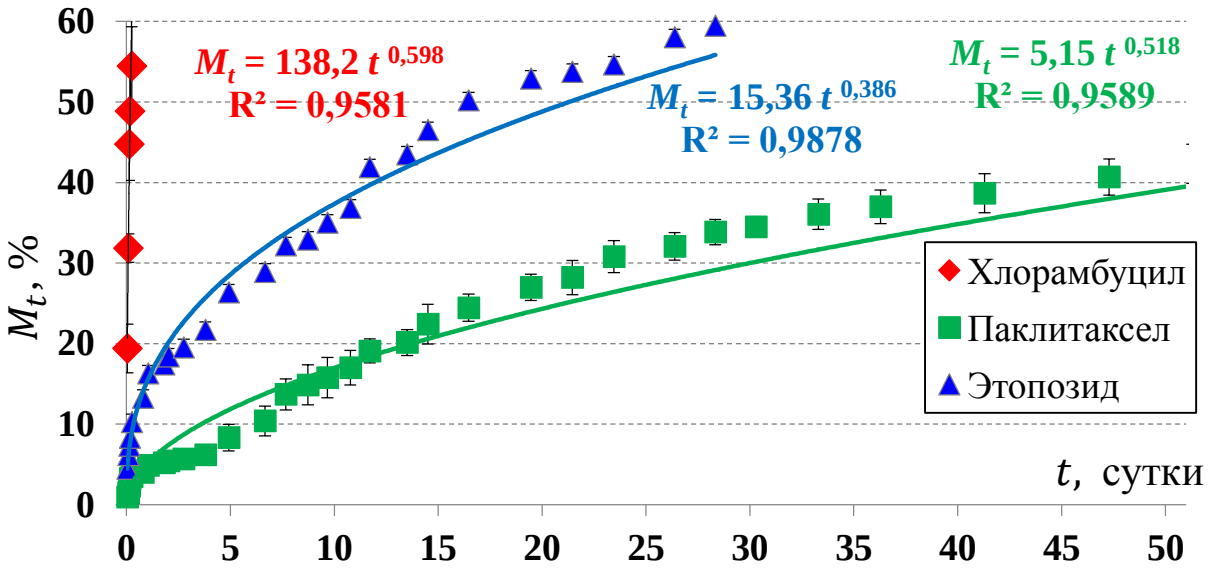


Рис. 65. Аппроксимация высвобождения ЛВ из микросфер для модели Peppas-Korsmeyer.

Из представленного анализа высвобождения ЛВ следует, что высвобождение этопозида и ПКЛ протекает гораздо слабее, чем у хлорамбуцила, при этом отсутствует ярко выраженный берст-эффект. Вероятно, это объясняется более сильным гидрофобным взаимодействием данных ЛВ с полимером. Также, по-видимому, большое значение имеют водородные связи функциональных групп ЛВ с гидроксильной и карбонильной группами ПОБ, и степень этого связывания также влияет на скорость высвобождения. На профиль высвобождения лекарственного вещества также влияют концевые группы ПОБ, которые, являясь функциональными группами, взаимодействуют с мобильными молекулами ЛВ, и, следовательно, замедляют их диффузию, а также разрыхляют структуру ПОБ, т.е. мешают образованию совершенной структуры биополимера [Iordanskii, 1994; Liggins, 2001].

Результаты анализа скорости высвобождения ЛВ находятся в хорошем соответствии с полученными экспериментальными данными (рис. 66, 60). Как видно, хлорамбуцил вначале высвобождается с очень высокой скоростью, а затем его ско-

рость пролонгированного высвобождения становится постоянной, но очень низкой. Начальная скорость высвобождения этопозида меньше, чем у хлорамбуцила, а значение скорости пролонгированного высвобождения, наоборот, больше. Наименьшее значение начальной скорости высвобождения наблюдается у паклитаксела, который имеет наибольшее значение скорости пролонгированного высвобождения.

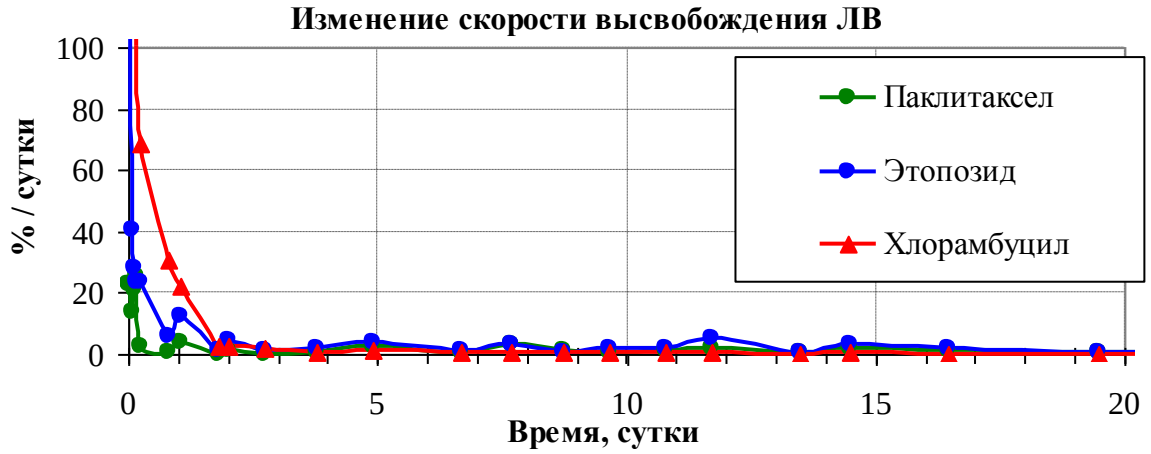


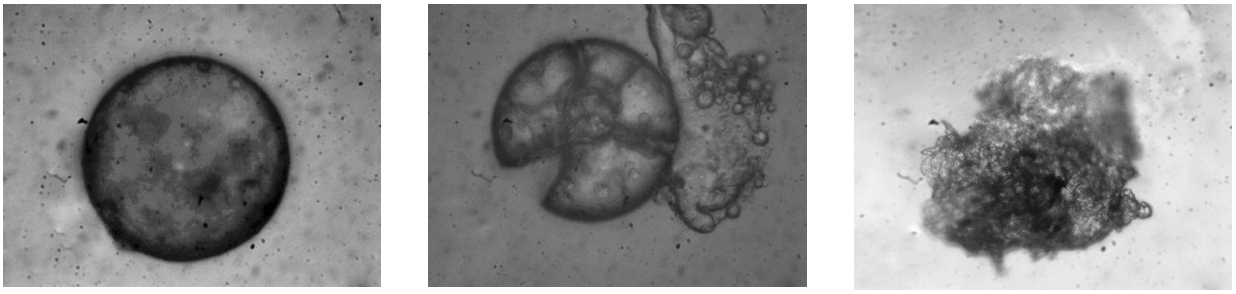
Рис. 66. Изменение скорости высвобождения ЛВ из микросфер.

Полученные данные по кинетике высвобождения послужили основанием для выбора наиболее оптимального ЛВ по параметрам пролонгации высвобождения — паклитаксела.

4. ДЕГРАДАЦИЯ МИКРОСФЕР С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМИ ЛВ

4.1. Деградация микросфер с инкапсулированными противоопухолевыми лекарственными веществами

Следующим этапом исследования явилось изучение стадий деградации микросфер с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ *in vitro* в фосфатном буфере. Рассмотрим их на примере микросфер с хлорамбуцилом. Необходимо отметить, что *in vitro* в фосфатном буфере мы наблюдаем деградацию за счет гидролитической деструкции, в то время как в организме происходит как гидролитическая, так и ферментативная деструкция. Различные стадии деградации хорошо видны на фотографиях, сделанных с помощью световой микроскопии на разных этапах эксперимента (рис. 67).



(А) 1 сутки **(Б)** 15 суток **(В)** 30 суток

Рис. 67. Гидролитическая деструкция биополимерных микросфер на основе ПОБ с инкапсулированным хлорамбуцилом (световая микроскопия): А — 1 сутки, Б — 15 суток, В — 30 суток.

Для выявления более полной картины деградации мы использовали сканирующий электронный микроскоп (рис. 68).

Из полученных данных видно, что деградация микросфер с хлорамбуцилом отчетливо проявляется на 30-е сутки инкубации в фосфатном буфере. На 90-е сутки инкубации' микросферы теряют свои очертания, представляя собой аморфную полимерную массу. Деградация микросфер с этопозидом имела те же стадии и не имела принципиальных отличий от деградации микросфер с хлорамбуцилом.

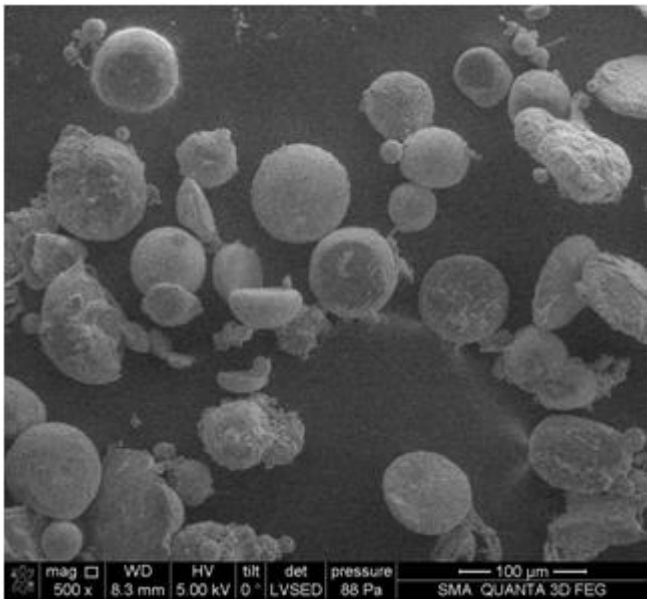


Рис. 68. Гидролитическая деградация микросфер с инкапсулированным хлорамбуцилом на основе ПОБ. Средний размер микросфер — 40±10 мкм; массовая доля включенного ЛВ — (10±3) %. Сканирующая электронная микроскопия.

Если сравнивать результаты по биодеградации микросфер из ПОБ с результатами по деградации микросфер из полилактидов и полигликолидов, то видно, что деградация микросфер из ПОБ происходит значительно медленнее, что описано во многих литературных источников [Atkins, 1996; Brannon-Peppas, 1997; Embleton, 2002]. Было отмечено, что полилактиды и полигликолиды являются более гидролитически лабильными полимерами и теряют свою механическую стабильность во время стадии быстрой деградации полимера [Atkins, 1996; Brannon-Peppas, 1997; Embleton, 2002]. На этой стадии на скорость высвобождения инкапсулированных агентов может также влиять автокаталитический эффект химической деградации полимера [Siepmann, 2005].

Исходя из этих данных, можно сделать вывод, что ПОБ является более стабильным полимером по сравнению с полилактидами и полигликолидами. Известно также, что полимерные матрицы из полилактидов и полигликолидов даже без включения ЛВ теряют за месяц до 60% своего веса [Gogolewski, 1993; Taddei, 2001; Taddei, 2002; Loo, 2007], в то время как потеря массы образцов из ПОБ в течение 6 месяцев составляла не более 2% [Correa, 2008].

4.2. Гидролитическая деструкция микросфер с инкапсулированным паклитакселем

Паклитаксел (ПКЛ) представляет собой цитостатическое средство природного происхождения — нерастворимый в воде растительный алкалоид, выделенный из коры тисового дерева (Taxus brevifolia) и является действующим веществом противоопухолевого препарата Таксол. ПКЛ обладает мощным антипролиферативным и цитостатическим эффектом, связанным с его способностью дезорганизовывать сборку микротрубочек во время митоза. Таксол, как и большинство лекарственных препаратов, применяющихся в онкологии, обладает высокой токсичностью, что вызывает тяжелые осложнения и снижает качество жизни пациента. Это могут быть поражения печени, почек, стволовых кроветворных клеток, нарушение свертываемости крови, анорексия и др. Лекарственная форма паклитаксела произ-

водится на основе полиоксиэтилированного касторового масла, называемого кремафором. Токсичностью обладает не только действующее ЛВ Таксола — паклитаксел, но и сама лекарственная форма, в которую ЛВ заключено — кремафор. Помимо собственных осложнений, таких как нейтропения и тромбоцитопения, вызываемых лекарственным веществом паклитакселом, кремофор вызывает ряд осложнений, главными из которых являются различные аллергические реакции, бронхоспазм, тромбоз сосудов, тяжелая невропатия. Для предотвращения аллергических реакций врачам приходится перед введением Таксола применять дополнительно ряд других препаратов, что также негативно влияет на здоровье пациента.

Получив суммарные данные по кинетике высвобождения цитостатиков из микросфер, мы стали искать наиболее оптимальный по кинетическим показателям цитостатик. После сравнении профилей высвобождения различных химиотерапевтических лекарственных веществ выяснилось, что именно ПКЛ обладает наиболее оптимальным профилем высвобождения по сравнению с другими цитостатиками при прочих равных условиях, так как не имеет ярко выраженного берст-эффекта и практически полностью высвобождается в течение трех месяцев (рис. 45).

Высвобождение ПКЛ пролонгированное и идет с достаточно высокой скоростью, способной обеспечить поддержание терапевтической концентрации паклитаксела в крови. Высвобождение ПКЛ протекает в две стадии. Высвобождение происходит за счет диффузии лекарственного вещества из полимерной матрицы на начальном этапе (в течение 1-2 недель) и за счет гидролитической деструкции полимера на более поздних этапах (1-3 месяца) до полной деградации полимерной основы.

Одновременно с изучением кинетики высвобождения ПКЛ из полимерной матрицы *in vitro* было изучено изменение морфологии микросфер при гидролитической деструкции *in vitro*. Деградацию полимерной матрицы микросферы с включением ПКЛ визуально оценивали через определенные промежутки времени.

На рис. 69 показано, как происходит процесс деградации микросфер с паклитакселом в течение трех месяцев. Деструкция включает следующие стадии: разрыхление полимерной матрицы микросферы, разделение ее на сегменты, деструкция

полимера до мономерных звеньев. Видно, что через три месяца сферы превращаются в аморфную массу полимера с последующим полным его растворением.

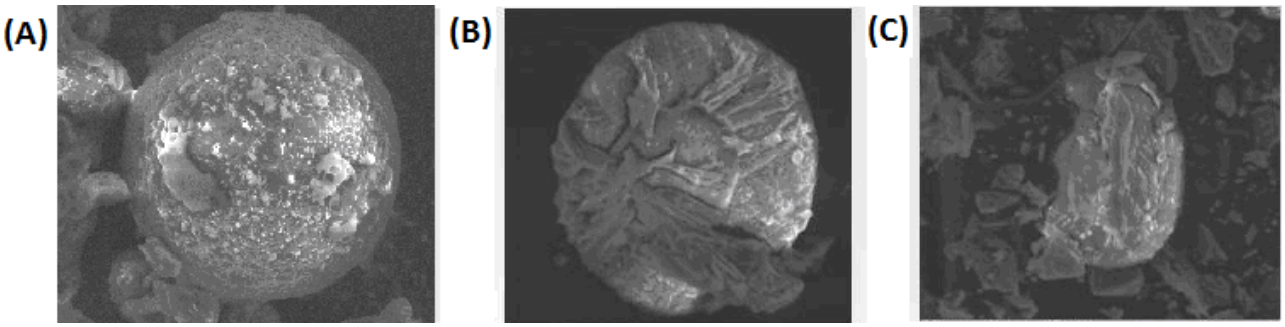


Рис. 69. Гидролитическая деградация микросфер с включением паклитаксела (массовая доля ЛВ в полимере —10,3%, средний диаметр микросфер — 41мкм): (A) — 1 сутки; (B) — 30 суток; (C) — 90 суток инкубации в 0,025М калий-фосфатном буфере (*pH* = 7,4) при 37°С.

Представленные на рисунке микрофотографии убедительно демонстрируют постепенную гидролитическую деструкцию биополимерных микросфер с инкапсулированным паклитакселом в течение 90 суток. Сравнивая полученные результаты с литературными данными по деградации микросфер на основе полилактидов и полигликолидов, можно отметить, что гидролитическая деструкция микросфер из ПОБ происходит значительно медленнее, что способствует более пролонгированному высвобождению ЛВ [Faisant, 2006].

5. ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИОПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ЛВ

5.1. Исследование химиотерапевтической активности микросфер с цитостатиками на культуре ткани опухолевых клеток MFC-7

Полученные нами микросферы были изучены в опытах на культуре ткани рака груди человека MFC-7. Культура опухолевых клеток MFC-7 была выбрана нами потому, что Таксол чаще всего используется при лечении рака груди человека. На рис. 70 показано воздействие микросфер с паклитакселом на опухолевые клетки. Можно видеть начало гибели опухолевых клеток под действием микросфер

с инкапсулированным паклитакселом через 24 часа — (А); через 48 часов отчетливо видно, что окружающие микросферу опухолевые клетки погибли — (В).

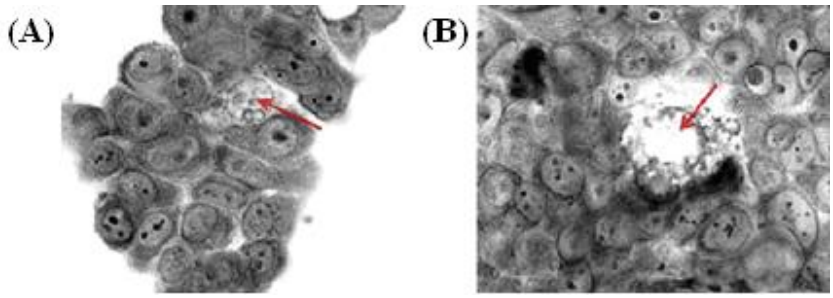


Рис. 70. Взаимодействие микросфер (включение паклитаксела в микросферах — 10,3%, средний диаметр микросфер — 41мкм) с клетками рака груди человека линии MFC-7 в течение 24 часов (А) и 48 часов (В), стрелками указаны биополимерные микросферы. После 2-х суток культивации, окружающие микросферу клетки погибли.

5.2. Результаты исследования биосовместимости микросфер с включением цитостатиков

Были проведены исследования биосовместимости микросфер с различными противоопухолевыми цитостатиками — паклитакселом, этопозидом и хлорамбуцилом. Результаты исследования биосовместимости микросфер с различными цитостатиками на клетках линии MFC-7 представлены на рис. 71.

Из анализа представленных данных следует, что микросферы, не содержащие ЛВ, практически не влияют на жизнеспособность клеток, что свидетельствует о высокой биосовместимости биополимера ПОБ. Напротив, микросферы, содержащие противоопухолевые цитостатики: паклитаксел, хлорамбуцил и этопозид вызывают выраженное подавление роста клеток, которое зависит от времени инкубации клеток и от концентрации микрочастиц. Так, через 24 часа традиционный препарат Таксол подавляет пролиферацию клеток, в то время как микросферы еще не оказывают такого действия. К трем суткам ситуация меняется — микросферы с инкапсулированным паклитакселом подавляют рост опухолевых клеток концентрационно-зависимо практически на 100%, в то время как активность препарата Таксол падает. С увеличением срока инкубации клеток ингибирующий эффект микросфер усиливался и достигал максимума к 3-м суткам эксперимента.

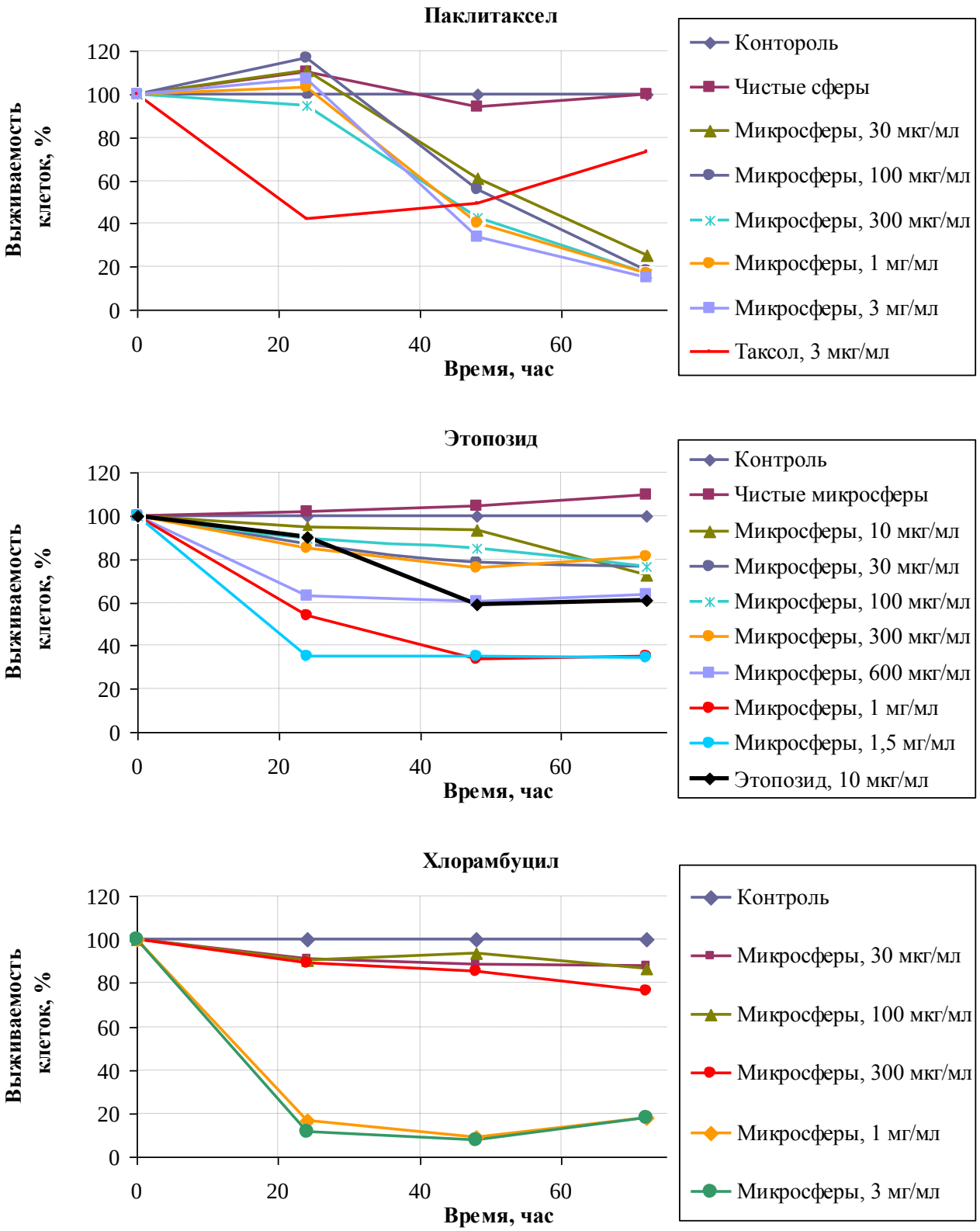


Рис. 71. Влияние различных микросфер в различных концентрациях, содержащих: паклитаксел (10,3%), этопозид (7,1%) и хлорамбуцил (11,3%) на выживаемость опухолевых клеток линии MFC-7.

Ингибирующий эффект микросфер на рост клеток носит концентрационно-зависимый характер. Интересно, что используемый для сравнения традиционный препарат Таксол вызывал максимальное подавление роста клеток через 1 и 2 суток, а затем его ингибирующий эффект заметно ослабевал. Это связано, по-видимому, с тем, что ПКЛ в традиционной форме утилизируется клетками или распадается в среде, в результате чего его концентрация со временем снижается и это приводит к возобновлению роста клеток. Полученные нами биополимерные микросферы вызывают стабильное подавление роста с 1 по 3 сутки эксперимента, обеспечивая постоянное поступление ПКЛ в культуральную среду и способствуя поддержанию постоянной действующей концентрации, что и повышает эффективность микросфер по сравнению с традиционной лекарственной формой на основе кремафора.

Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе. Исследования полимерных микрочастиц с инкапсулированными ЛВ были проведены на различных культурах клеток. Так, было показано, что микросферы с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ эффективно подавляют рост опухолевых клеток в течение длительного времени. Подавление пролиферации опухолевых клеток было показано для различных клеточных культур: рака печени [Liu, 2006], глиомы C6 [Lina, 2005; Zhang, 2007], 4T1 [Defail, 2006], MDA-MB 435 S [Gupte, 2004], LNCaP клеток рака простаты [Gryparis, 2007], MCF-7 клеток рака груди [Nguyen, 2008]. Причем в случае пролонгированного подавления роста опухолевых клеток (от 12 часов до 4 суток) микрочастицы были значительно более эффективны по сравнению с водным раствором противоопухолевых ЛВ: ПОЛВ в традиционной лекарственной форме подавляет рост клеток не более 12 часов, а биополимерные микросферы с инкапсулированным ПОЛВ подавляют рост до 4 суток. В течение более длительного срока подавление роста опухолевых клеток продемонстрировать затруднительно, т.к. срок их культивирования ограничен [Gupte, 2004; Zhang, 2007].

Для доказательства пролонгированного действия микросфер с включением паклитаксела были использованы микросферы после инкубации *in vitro* в 25 мМ фосфатном буфере в течение 45 суток. Из данных, представленных на рис. 72

видно, что даже после 45 дневного высвобождения паклитаксела из микросфер, причем при всех использованных концентрациях микросфер от 10 мкг/мл до 3 мг/мл, они оставались действенными в отношении опухолевых клеток линии MFC-7.

Таким образом противоопухолевая активность микросфер сохраняется в течение долгого времени даже при инкубации в водной среде при 37°С, что говорит о высокой стабильности паклитаксела в новой полимерной форме.

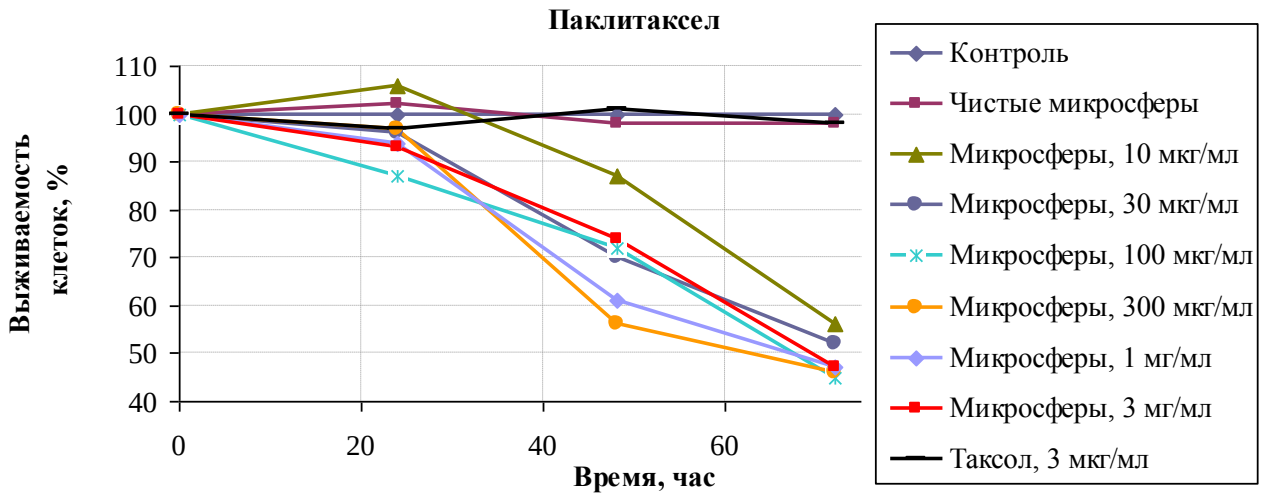


Рис. 72. Влияние различных концентраций микросфер биополимерной системы, содержащей паклитаксел (10,3%) на выживаемость опухолевых клеток линии MFC-7 после инкубации микросфер *in vitro* в 25 мМ фосфатном буфере при 37°С в течение 45 суток.

5.3. Оценка биосовместимости с помощью параметра IC_{50}.

Для оценки биосовместимости БЛК был использован стандартизированный параметр IC_{50}, который широко используется в качестве основного критерия оценки действия лекарственных препаратов на культуры клеток в экспериментах *in vitro* и рекомендуется для использования как в нормативных документах (ГОСТ Р ИСО 10993.5 99) для доклинических испытаний лекарственных препаратов и медицинских изделий, так и в научной литературе, в т.ч. для оценки биосовместимости полимерных микрочастиц с инкапсулированными ЛВ [Gupte, 2004; Lina, 2005;

Defail, 2006; Liu, 2006; Gryparis, 2007; Zhang, 2007; Nguyen, 2008]. IC_{50} представляет собой концентрацию ЛВ, которая вызывает 50% подавление роста клеток в условиях *in vitro* при использовании стандартных тестов оценки выживаемости клеток, например, XTT-тест.

Для расчета параметра IC_{50} для каждого препарата микрочастиц, содержащих различные ЛВ, были построены графики зависимости выживаемости клеток от концентрации микрочастиц БЛК в логарифмической шкале, ориентируясь на классическое уравнение «концентрация-эффект»:

$$E = E_{max}\frac{C}{C+K},$$

где E — ингибирующий эффект ЛВ, C — концентрация ЛВ, K —константа ингибирующего эффекта ЛВ на клетки.

На рис. 73 приведены графики зависимости ингибирующего эффекта микросфер, содержащих паклитаксел, этопозид и хлорамбуцил, от их концентрации в логарифмической шкале. Из графика видно, что увеличение ингибирующего воздействия на рост клеток (взяты усредненные значения по срокам инкубации 1, 2 и 3 суток) носило концентрационно-зависимый характер не во всем диапазоне концентраций микросфер. Согласно уравнению «концентрация-эффект» представленные зависимости имеют S-образную форму кривой, в которой присутствует центральный участок, хорошо аппроксимируемый линейной функцией, и периферийные нелинейные участки в области низких и высоких значений логарифма концентрации. Поэтому для построения графика был выбран не весь диапазон используемых значений концентрации, а лишь 3 или 4 значения (черные точки), которые с высокой точностью (коэффициент корреляции $R^2 > 85\%$) описывается линейной функцией, из уравнения которой можно вычислить значение IC_{50}, как значение концентрации, вызывающей 50% подавление роста клеток.

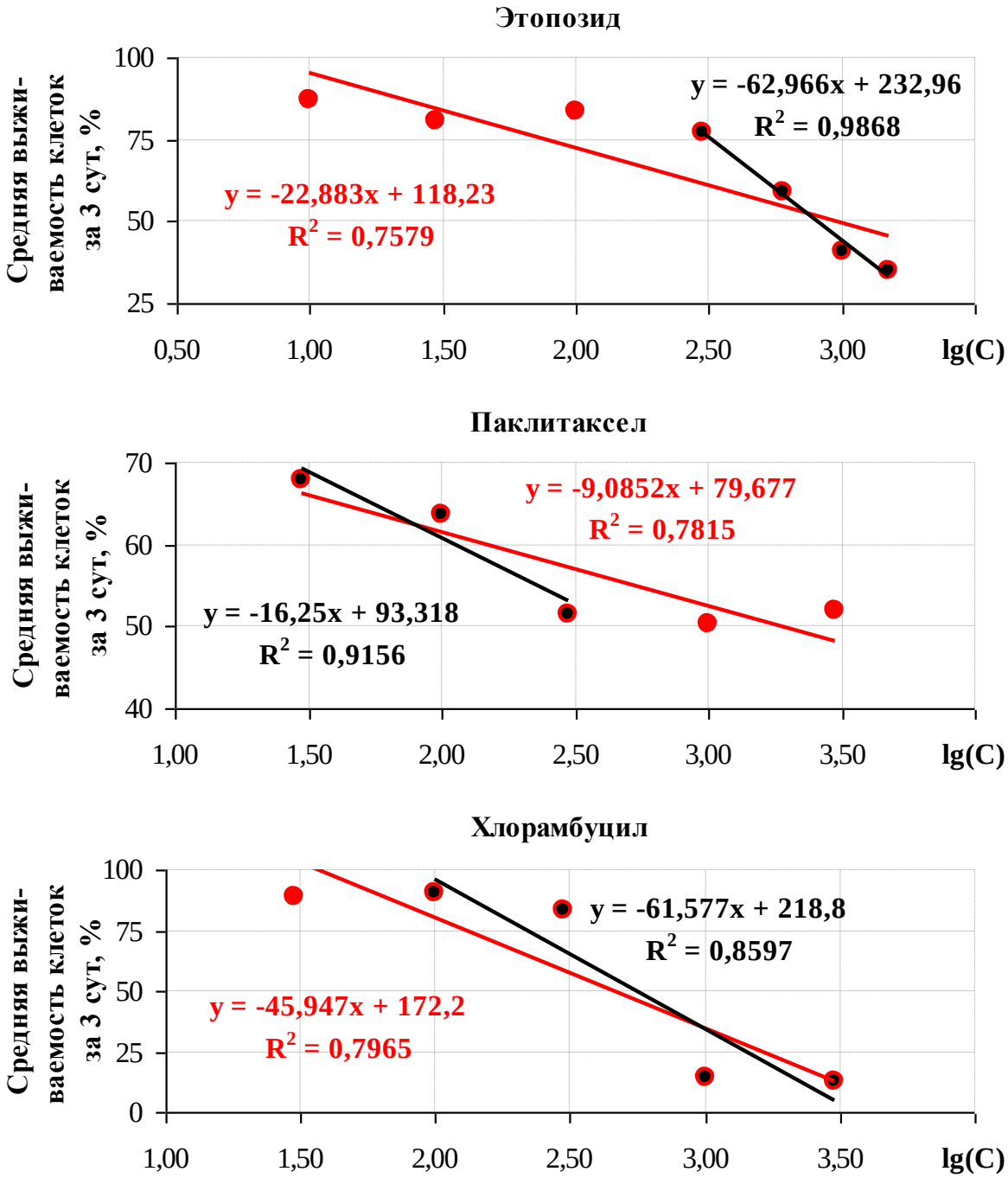


Рис. 73. Зависимость ингибирующего эффекта микросфер, содержащих паклитаксел, этопозид и хлорамбуцил, от их концентрации в логарифмической шкале.

По разработанной методике были построены графики для 1, 2 и 3 суток инкубации и рассчитаны параметры IC_{50}. В качестве примера такого расчета на рис. 74 приведен график для микросфер, содержащих этопозид.

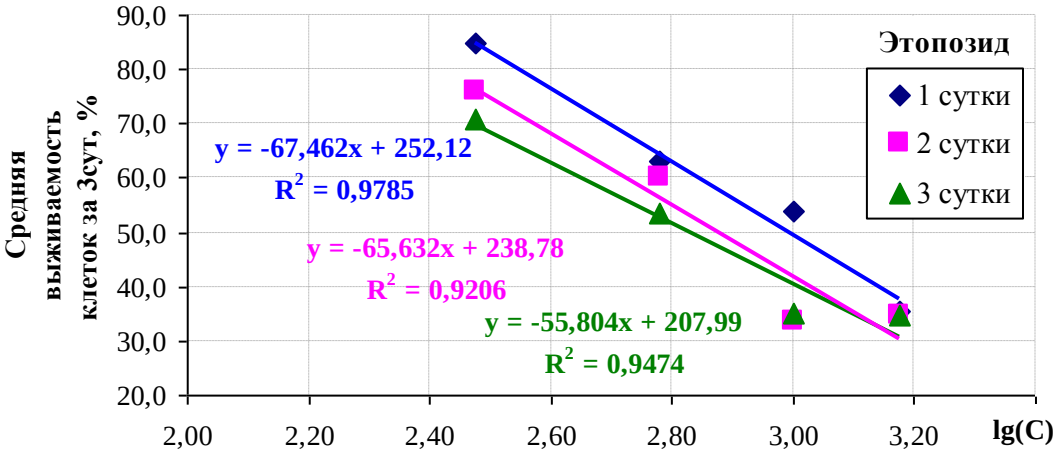


Рис. 74. График расчета зависимости ингибирующего эффекта микросфер, содержащих этопозид, от концентрации микрочастиц в логарифмической шкале для каждой временной отметки: 1, 2 и 3 суток.

Значения параметра IC_{50}, рассчитанные для ингибирующего эффекта микросфер, содержащих хлорамбуцил, этопозид и паклитаксел, на клетки линии MFC-7 представлены на рис. 75 в виде диаграммы.

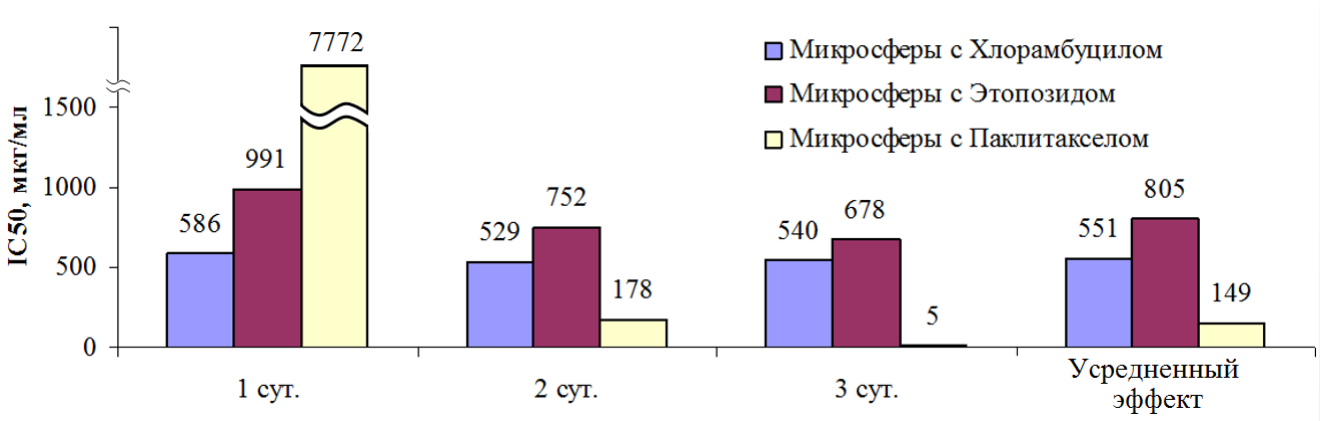


Рис. 75. Значения IC_{50}, рассчитанные для ингибирующего эффекта микросфер, содержащих различные противоопухолевые ЛВ: хлорамбуцил, этопозид и паклитаксел на клетки линии MFC-7 при инкубации в течение 1, 2 и 3 суток и для усредненного эффекта по всей продолжительности эксперимента.

В первых трех категориях диаграммы значения IC_{50} соответствуют срокам инкубации микросфер в течение 1, 2 и 3 суток, соответственно. Последняя категория

соответствует усредненному ингибирующему эффекту, рассчитанному из усредненных показателей выживаемости клеток за время проведения всего эксперимента.

При анализе данной диаграммы видно, что наименьшее усредненное значение IC_{50} имеют микросферы с паклитакселом, что свидетельствует об их максимальной противоопухолевой эффективности *in vitro*. Необходимо отметить также, что противоопухолевая эффективность микросфер с паклитакселом многократно возрастает с увеличением срока инкубации с клетками, что свидетельствует об их выраженном пролонгированном эффекте. Высокие значения IC_{50} связаны, по-видимому, с медленным высвобождением паклитаксела в 1-ые сутки, что согласуется с данными кинетики его высвобождения из микросфер, в результате чего цитотоксическая концентрация не достигалась. Косвенно об этом свидетельствует то, что паклитаксел в традиционной лекарственной форме — Таксол проявлял свою максимальную эффективность уже на 1-ые сутки. Подобный возрастающий противоопухолевый эффект с течением времени наблюдается и у микросфер с этопозидом, но в гораздо меньшей степени.

Усредненная противоопухолевая эффективность у микросфер, содержащих этопозид, оказалась минимальной, многократно уступающей эффективности микросфер с паклитакселом. Это, по-видимому, связано с противоопухолевой активностью самого действующего вещества, которое значительно уступает по этому параметру паклитакселу. Промежуточное значение по параметру усредненного IC_{50} заняли микросферы с хлорамбуцилом, однако их цитотоксический эффект практически не зависел от времени. Это может быть связано с кинетикой высвобождения хлорамбуцила из микросфер, а именно, с выраженным «взрывным эффектом» высвобождения ЛВ в 1-ые сутки. В этом случае, максимальный цитотоксический эффект, как и в случае с традиционными лекарственными формами достигается в 1-ые сутки и далее не возрастает.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что биополимерные сферы без лекарственных веществ являются биосовместимыми с опухолевыми клетками и не проявляют цитотоксичности. Полимерные сферы с этопозидом и хлорамбуцилом имеют различное токсичное воздействие на культуру опухолевых клеток, а именно, хлорамбуцил действует активнее и сильнее подавляет рост культивируемых клеток за короткое время (80% за 24 часа), что согласуются с данными по кинетике высвобождения, (рис. 58 и табл. 8) где отмечено, что за первые сутки эксперимента высвобождение ЛВ из матрицы полимера достигает 76%. Этопозид действует слабее (процент подавления роста клеток за 48 часов не превышает 20%), однако в дальнейшем (по данным исследования кинетики высвобождения *in vitro*) имеет длительный пролонгирующий эффект высвобождения, что может быть оптимально при проведении длительной химиотерапии. Представленные данные позволяют предположить, что хлорамбуцил может быть использован для нанесения первичного шокового удара на опухолевые клетки с дальнейшим длительным поддерживающим цитотоксическим эффектом.

Этопозид, напротив, может быть использован для проведения длительной онкотерапии, так как позволяет поддерживать действующую терапевтическую дозу благодаря постоянному длительному постоянному высвобождению. Таким образом, на основании анализа кинетики высвобождения изученных ЛВ in vitro, а также анализа результатов экспериментов с использованием культуры опухолевых клеток выявлены принципиальные отличия полученных пролонгированных лекарственных форм хлорамбуцила и этопозида. Результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания и изучения новых малотоксичных лекарственных форм этопозида и хлорамбуцила с контролируемым высвобождением. Также возможно создание двойной лекарственной формы с включением как этопозида, так и хлорамбуцила для достижения гарантированного терапевтического эффекта.

Таким образом, микросферы с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ значительно различаются по характеру их цитотоксической активности, который

зависит как от собственной противоопухолевой активности инкапсулированного действующего ЛВ, так и, по-видимому, от кинетики высвобождения ЛВ из микросфер. Наиболее выраженную пролонгированную противоопухолевую активность продемонстрировали микросферы, содержащие паклитаксел, что позволило использовать их в дальнейшем в исследованиях *in vivo*.

5.4. Оценка острой токсичности биополимерных микросфер с инкапсулированным паклитакселом *in vivo*

Для проверки острой токсичности были получены микросферы с повышенным содержанием паклитаксела — 20%. Для оценки выживаемости мышей при применении препарата паклитаксела в полимерной форме были проведены эксперименты *in vivo* на мышах, результаты которых приведены в табл. 9.

Группа	Под гуппа	Препараты	Пало/ всего	Сроки гибели, сут
1. Отрицательный контроль чистые микросферы без ЛВ	1.1	Микросферы, 320 мг/кг	0/6	–
	1.2	Микросферы, 800 мг/кг	0/6	–
	1.3	Интактный контроль	0/6	–
2. Опыт - биополимерные микросферы (содержание паклитаксел 20±1%)	2.1	Микросферы, 320 мг/кг	0/6	–
	2.2	Микросферы, 160 мг/кг	0/6	–
	2.3	Микросферы, 80 мг/кг	0/6	–
3. Положительный контроль, препарат Таксол	3.1	Таксол, 64 мг/кг	6/6	0,0,0,0,0,1
	3.2	Таксол, 32 мг/кг	6/6	1,1,4,4,6,8
	3.3	Таксол, 16 мг/кг	1/6	5

Таблица. 9. Оценка острой токсичности биополимерных микросфер при внутрибрюшинном введении мышам-самцам линии 006.

Если при введении препарата Таксол в дозе 16-32 мг на кг наблюдается 100% смертность животных, то при введении паклитаксела, инкапсулированного в микросферы в той же дозе, смертность не наблюдается, что свидетельствует о значительном снижении токсичности инкапсулированного паклитаксела.

Таким образом, на основании изучения биосовместимости, химиотерапевтической активности *in vitro* и оценки острой токсичности *in vivo* биополимерных микросфер, инкапсулированных паклитакселом, можно сказать, что созданная лекарственная форма паклитаксела на основе ПОБ обладает длительным контролируемым высвобождением ЛВ при сохранении высокой эффективности, а также является малотоксичной по сравнению с традиционным препаратом Таксол.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее десятилетие в развитых странах — США, странах Европейского Союза, Японии и в активно развивающихся странах — Китае, Южной Корее, Индии идет интенсивная разработка и исследование систем контролируемого высвобождения. В настоящее время лекарственные препараты пролонгированного действия отечественного производства на основе биорезорбируемых пластиков отсутствуют. На мировом рынке уже существует ряд лекарственных систем на основе микросфер и микрокапсул, производимые крупнейшими фармацевтическими компаниями: Рисполент Конста (Янсен-Силаг, Бельгия-Швейцария); Вивитрол (Alkemes, США); Нутропин-Депо (Alkermes/Genentech, США); Золадекс (Zeneka, Великобритания) и др. Анализ мирового рынка медицинских препаратов и научных разработок свидетельствует о том, что в качестве наиболее перспективных полимерных продуктов для разработки биополимерных лекарственных систем, удовлетворяющих фармакологическим критериям, предлагаются биодеградабельные полимерные материалы/изделия на основе полилактидов, полигликолидов и особенно поли(3-гидроксибутирата) (ПОБ). Однако, использование синтетических полимеров, полилактидов, полигликолидов и их сополимеров, сопряжено с рядом трудностей, связанных с их относительно низкой биосовместимостью и развитием хронической воспалительной тканевой реакции в ответ на имплантацию этих полимеров.

В настоящее время поли-3-оксибутират и его сополимеры привлекают большое внимание для применения в медицине. Являясь продуктом современной биотехнологии, экологически совместимый ПОБ обладает широким спектром полезных эксплуатационных характеристик, среди которых, прежде всего, следует отметить биосовместимость и способность к биодеградации в организме с образованием нетоксичных конечных продуктов. Поэтому материалы/изделия на основе ПОБ следует рассматривать как чрезвычайно перспективные для контакта с биологическими средами живого организма.

В нашей лаборатории получены патенты РФ на штамм и способ получения ПОБ и его сополимеров (патент РФ на изобретение № 2307159 от 06.05.2006 "Штамм бактерий Azotobacter chroococcum 12А – продуцент поли-3-оксибутирата и сополимера 3-оксибутирата с 3-оксивалератом") и на способ очистки ПОБ (патент РФ на изобретение № 2333962 от 17.10.2006 "Способ выделения полигидроксибутирата из сухой биомассы микроорганизма"). Разработана технология получения ПОБ медицинского назначения (ТУ 9393-001-02-69-544-1-00 "Медицинский биополимер поли-3-оксибутират"). Получены сертифицированные токсикологические заключения ВННИИМТ МЗ РФ на ПОБ медицинского назначения (Токсикологическое заключение ВНИИМТ МЗ № 38899 от 10.01.2000 г.) и медицинские изделия на его основе — пародонтологические мембраны с инкапсулированным в полимерной матрице лекарственным веществом, индометацином (Токсикологическое заключение ВНИИМТ МЗ № 379-06 от 03.10.2006). Разработаны и запатентованы медицинские изделия на основе ПОБ (патент РФ на изобретение № 2316290 от 21.11.2005 "Сетчатый эндопротез для восстановительной хирургии"). Также запатентована "Биологически активная полимерная композиция" (патент РФ на изобретение № 2318535 от 10.10.2006).

Созданные лекарственные формы на основе ПОБ с контролируемым высвобождением цитостатиков требуют дальнейших исследований и доклинических испытаний и могут явиться основой для создания новых малотоксичных противоопухолевых лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением.

Результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания новых малотоксичных лекарственных форм этопозида, паклитаксела и хлорамбуцила (в том числе двойной лекарственной формы) с контролируемым высвобождением.

ВЫВОДЫ

1) Получены биополимерные микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата методом одноэтапного эмульгирования с инкапсулированными цитостатиками: дексаметазоном, хлорамбуцилом, этопозидом, паклитакселом, метотрексатом, доксорубицином.
2) Анализ профилей высвобождения цитостатиков из микросфер с использованием математической модели нулевого порядка дает количественное описание «берст»-эффекта на начальной стадии высвобождения, а с помощью моделей «Higuchi» и «Peppas-Korsmeyer», показано, что ранняя стадия высвобождения имеет диффузионный характер по Фику. По модели диффузии Фика рассчитаны коэффициенты диффузии. Анализ данных с помощью модели первого порядка указывает, что на поздней стадии высвобождения хлорамбуцила происходит гидролитическая деструкция полимера.
3) Установлено, что профиль высвобождения цитостатических лекарственных веществ из микросфер соответствует динамике контролируемого высвобождения. Из изученных микрочастиц с включением цитостатиков наиболее оптимальным кинетическим показателям пролонгированного высвобождения отвечают микрочастицы с включением паклитаксела.
4) Противоопухолевая активность *in vitro* микросфер с различными ЛВ: паклитакселом, этопозидом и хлорамбуцилом зависит как от кинетики высвобождения ЛВ из микрочастиц, так и от биологической активности действующего ЛВ на опухолевые клетки линии MFC-7 *in vitro*.
5) Биополимерные микросферы с инкапсулированным ПКЛ обладают меньшей токсичностью и большей эффективностью по сравнению с традиционным препаратом Таксол, что доказано опытами, проведенными как на культуре

клеток, так и в экспериментах *in vivo*, что служит предпосылкой для создания малотоксичной лекарственной формы ПКЛ на основе биополимера ПОБ.

6) Получены микросферы с включением наночастиц металлов золота и железа, на основе которых возможна разработка систем направленной доставки цитостатиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипов С.А., Дамбаев Г.Ц., Ермаков А. Е., Федущак Т.А., Уймин М.А. Экспериментальное обоснование применения магнитоуправляемых липосомальных композитов в противоопухолевом лечении// Российский биотерапевтический журнал, 2009, т. 8 (1), с. 4.

2. Белоусов Ю.Б., Леонова М.В., Белоусов Д.Ю. и др. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии. Руководство для практикующих врачей/ под общ. ред. Ю.Б. Белоусова, М.В. Леоновой. – М.: Бионика, 2002, - 368 с.

3. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Каплун А.П., Шкворченко Д.О., Новиков С.В. Липосомы как средство направленной доставки лекарственных средств в задний отрезок глаза// Российский биотерапевтический журнал, 2009, т. 8 (1), с. 4.

4. Водовозова Е.Л., Моисеева Е.В., Кузнецова Н.Р., Бовин Н.В. Противоопухолевое действие липосом, несущих липофильные коньюгаты метотрексата и сиалил-Льюис X, на мышиной модели Т-лимфолейкоза// Российский биотерапевтический ж-л, 2009, т. 8(1) 2009г, с.4-5.

5. Горчакова Н.А., Гудивок Я.С., Гунина Л.М. и др. Фармакология спорта/ под общ. ред. С.А. Олейника, Л.М. Гуниной, Р.Д. Сейфулы /Москва: Олимпийская литература, 2010, 631-639 с.

6. Григоръева Е.Ю., Стукалов Ю.В., Колдаева Е.Ю., Барышников А.Ю. Конструкции на основе дендримеров нового класса для таргетной радиотерапии онкологических заболеваний// Российский биотерапевтический ж-л, 2009, т. 8(1), с. 5-6.

7. Коржавых Э. А., Румянцев А.С. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и действием// Российские аптеки, 2003, № 4, с. 6.

8. Кузнецова Д.С., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии// Современные технологии в медицине, 2014, т. 6(4), с. 201.

9. Кулаков А.А., Григорьян А.С. Биодеградируемые полимерные материалы медицинского назначения (основные направления исследований и перспективы их развития)// Стоматология, 2014, т. 2, с. 63-64.

10. Марченко М.М., Копильчук Г.П., Кеца О.В. Влияние липосомной формы 5-(5',6' бензкумароил-3')-метиламиноурацила на детоксикационную систему карциномы Герена крыс-опухоленосителей// Российский биотерапевтический ж-л, 2009, т. 8(1), с. 21.

11. Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бунятян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая/ под ред. А.Н. Миронова// М.: Гриф и К, 2012, - 944 с.

12. Петров В.И. Клиническая фармакология и фармакотерапия в реальной врачебной практике// Москва: ГОЭТАР-Медиа, 2011, - 107 с.

13. Пинаев Г.П., Полянская Г.Г. под ред. Каталог РККК. Каталог Российской коллекции клеточных культур. Санкт-Петербург Омск: ОмГПУ. Биол.серия, вып.5 (на русском и англ. яз.), 1999, - 429 с.

14. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров/ Москва: Наука, 1978, - 328 с.

15. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. Биосовместимые материалы: Учебное пособие// Изд-во "МИА", 2011, 544 с.

16. Семчиков Ю.Д. Высокомолекулярные соединения/ Москва — Н. Новгород: Изд-во НГУ, Академия, 2003, - 368 с.

17. Соснов А.В., Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Gakh A.A., Станъков И.Н., Садовников С.В. Использование наномолекул для создания систем доставки лекарств// Российский биотерапевтический ж-л, 2009, т. 8(1), с. 11.

18. Тазина Е.В., Полозкова А.П., Игнатьева Е.В., Орлова О.JI., Оборотова Н.А. Выбор оптимального соотношения препарат/липиды для загрузки доксорубицина в термолипосомы// Российский биотерапевтический ж-л, 2009, т. 8(1), с. 11.

19. Тазина Е.В., Игнатьева Е.В., Полозкова А.П., Орлова ОЛ., Оборотова Н.А. Технология получения и анализ термозависимой липосомальной лекарственной формы доксорубицина// Химико-фармацевтический ж-л, 2008, т. 42(12), с. 3035.

20. Трещалин И.Д., Переверзева Э.Р., Бодягин Д.А. и др. Изменение токсикологического профиля доксорубицина, ассоциированного с наночастицами// Российский биотерапевтический ж-л, 2009, т. 8(1), с. 23-24.

21. Штильман М.И. Технология полимеров медико-биологического назначения. Полимеры природного происхождения// Учебное пособие, 2-е изд., М.:Лаборатория знаний, 2016, -33 с.

22. Agrawal C.M., Athanasiou K.A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants// J. Biomed. Mater. Res., 1997, v. 38(2), p. 105-114.

23. Ainaoui A. and Vergnaud J.M. Effect of the nature of the polymer and of the process of drug release (diffusion or erosion) for oral dosage forms// Comput TheorPolym Sci, 2002, v. 10, p. 383-390.

24. Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H. Properties of poly(P-hydroxybutyrate) as a solution// Macromol., 1976, v. 9, p. 774-780.

25. Andreopoulos A.G., Hatzi E.C., Doxastakis M. Controlled release systems based on polylactic acid). An in vitro and in vivo study// J. Mater. Sci. Mater. Med., 2000, v. 11, p. 393-397.

26. Arifin D.Y., Lee L. Y., Wang C.H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems// Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, v. 58, p. 1274–1325.

27. Atkins T.W., Peacock S.J. In vitro biodegradation of poly(beta-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres exposed to Hanks' buffer, newborn calf serum, pancreatin and synthetic gastric juice// J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 1996, v. 7, p. 1075-84.

28. Baker R. Controlled release of biologically active agents/ Academic Press, New York, 1987.

29. Berkland C., King M., Cox A., Kim K.K. and Pack D.W. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate// J. Control Release, 2002, v. 82, p. 137-147.

30. Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes// Mater Today, 2010, v. 13(1-2), p. 24-30.

31. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems// Biochem (Moscow) Sup. Series B Biomed. Chem, 2011, v. 5, p. 10-21.

32. Bostman O., Pihlajamaki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review// Biomaterials, 2000, v. 21(24), p. 2615-2621.

33. Brannon-Peppas L. Polymers in Controlled Drug Delivery// Med. Plastics and Biomater., 1997, v.3, p. 46-50.

34. Braunecker J., Baba M., Milroy G.E. and Cameron R.E. The effects of molecular weight and porosity on the degradation and drug release from polyglycolide// Int. J. Pharm., 2004, v. 282, p. 19-34.

35. Brem H., Piantadosi S., Burger P.C., Walker M., Selker R., Vick N.A., Blak K., Sisti M., Brem S., Mohr G., Muller P., Morawetz R., Schold S.C. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas// Lancet, 1995, v. 345, p. 1008–1012.

36. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis// Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, v. 54, p. 631-651.

37. Buntner B., Nowak M., Kasperczyk J., Ryba M., Grie P., Walski M., Dobrzynski P., Bero M. The application of microspheres from the copolymers of lactide and ε-caprolactone to the controlled release of steroids// J. Control.Release, 1998, v. 56, p. 159-167.

38. Burke T.G., Mi Z. Ethyl substitution at the 7 position extends the half-life of 10-hydroxycamptothecin in the presence of human serum albumin// J. Med. Chem., 1993, v. 36(17), p. 2580-2582.

39. Cai H., Hu X.D., Yu D.H., LI S.X., Tian X., Zhu Y.X. Combined DNA vaccine encapsulated in microspheres enhanced protection efficacy against Mycobacterium tuberculosis infection of mice// Vaccine, 2005, v. 23, p. 4167-4174.

40. Cameron D.A., Ritchie A.A., Langdon S., Anderson T.J., Miller W.R. Tamoxifen induced apoptosis in ZR-75 breast cancer xenograft santedates tumour regression// Breast Cancer Res Treat, 1997, v. 45, p. 99-107.

41. Carino G.P., Mathiowitz E. Oral insulin delivery// Adv. Drug Deliv. Rev., 1999, v. 35, p. 249-257.

42. Chen G.Q. and Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials// Biomaterials, 2005, v. 26, p. 6565–6578.

43. Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Sung J., Luther G., Gu F.X., Levy-Nissenbaum E., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C. Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery// Biomaterials, 2007, v. 28, p. 869–876.

44. Choi M.H., Yoon S.C. Polyester biosynthesis characteristics of Pseudomonas citronellis grown on various carbon sources, including 3-methyl-branched substrates// Appl. Environ. Microbiol., 1994, v. 60, p. 3245-3254.

45. Chowdhury A.A. Poly-b-hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym// Archiv für Mikrobiologie, 1963, v. 47, p. 167-200.

46. Coenen A., Bernaerts K., Harings J., Jockenhoevel S., Ghazanfari S. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers// Acta Biomaterialia, 2018, v. 79, p. 60-82.

47. Coombes A.G.A., Rizzib S.C., Williamson M., Barralet J.E., Downes S., Wallace W.A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery// Biomaterials, 2004, v. 25(2), p. 315-325.

48. Correa M.C.S., Rezende M.L., Rosa D.S., Agnelli J.A.M., Nascente P.A.P. Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation// Polym. Test., 2008, v. 27, p. 447-452.

49. Crank J. The Mathematics of Diffusion// Clarendon Press, Oxford, 1975.

50. Davis J.B. Cellular lipids of a Nocardia grown on propane and n-butane// Appl. Microbiol., 1964, v. 12, p. 301-304.

51. Dawes E.A., Senior P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms// Adv. Microb. Physiol., 1973, v. 10, p. 135-266.

52. de Lima G.R. et al. Effects of low dose tamoxifen on normal breast tissue from premenopausal women// Eur. J. Cancer, 2003, v. 39, p. 891-898.

53. de Smet M., Eggink G., Witholt B., Kingma J. Characterization of intracellular inclusions formed by Pseudomonas oleovorans during growth on octane// J. Bacteriol., 1983, v. 154, p. 870-878.

54. Defail A.J., Edington H.D., Matthews S., Lee W.C., Marra K.G. Controlled release of bioactive doxorubicin from microspheres embedded within gelatin scaffolds// J. Biomed. Mater. Res. A, 2006, v. 79(4), p. 954-962.

55. Delafield F. P., Doudoroff M., Palleroni N.J., Lusty C.J., Contopoulos R. Decomposition of poly-β-hydroxybutyrate by Pseudomonas// J. Bacteriol., 1965, v. 90, p. 1455-1466.

56. Deng Y., Lin X.S., Zheng Z., Deng J.G., Chen J.C., Ma H., Chen G.-Q. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro// Biomaterials, 2003, v. 24(23), p. 4273-4281.

57. Dillen K., Vandervoort J., Van den Mooter G., Verheyden L., Ludwig A. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. // Int. J. Pharm., 2004, v. 275(1-2), p. 171-187.

58. Doi Y., Kanesawa Y., Kunioka M. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)// Macromolecules, 1990a, v. 23, p. 26-31.

59. Doi Y., Microbial Polyesters// VCH, New York, 1990b, p. 89-98.

60. Doi Y., Segawa A., Kawaguchi Y., Kunioka M. Cyclic nature of poly(3-hydroxybutyrate) metabolism in Alcaligenes eutrophus // FEMS Microbiol. Lett., 1990c, v. 67, p. 165-170.

61. Doi Y., Segawa A., Kunioka M. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Alcaligenes eutrophus// Int. J. Biol. Macromol., 1990d, v. 12(2), p. 106-111.

62. Dong Y., Feng S.S. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs// Biomaterials, 2005, v. 26, p. 6068-6076.

63. Doudoroff M., Stanier R.Y. Role of poly-β-hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria// Nature, 1959, v. 183, p. 1440-1442.

64. Dunne M., Bibby D.C., Jones J.C., Cudmore S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles// J. Control. Release, 2003, v. 92, p. 209-219.

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

66. Eggink G., van der Wal H., Huijberts G. Production of poly-3-hydroxyalkanoates by Pseudomonas putida during growth on long-chain fatty acids// In: Novel biosynthetic biodegradable polymers of industrial interest from microorganisms (E.A. Dawes, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1990, p. 37-48.

67. Embleton J.K., Tighe B.J. Polymers for biodegradable medical devices. Microencapsulation studies: characterization of hydrocortisone-loaded poly-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate microspheres// J. Microencapsul., 2002, v. 19, p. 737-752.

68. Ertl B., Platzer P., Wirth M., Gabor F. Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin// J. Control. Release, 1999, v. 61, p. 305-317.

69. Faisant N., Akiki J., Siepmann F., Benoit J.P., Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory// Int. J. Pharm., 2006, v. 314, p. 189-197.

70. Feng S., Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers// J. Control. Release, 2001, v. 71, p. 53-69.

71. Findlay R.H., White D.C. Polymeric beta- hydroxyalkanoates from environmental samples and Bacillus megaterium// Appl. Environ. Microbiol., 1983, v. 45, p. 71-78.

72. Fonseca C., Simoes S., Gaspara R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity// J. Contr. Rel., 2002, v. 83(2), p. 273–286.

73. Freier T., Kunze C., Nischan C., Kramer S., Sternberg K., Sass M., Hopt U.T., Schmitz K.P. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate)// Biomaterials, 2002, v. 23, p. 2649-2657.

74. Frieberg S. and Zhu X.X. Polymer microspheres for controlled drug release// IntJPharm, 2004, v. 19, p. 282-287.

75. Fritzsche K., Lenz R.W., Fuller R.C. Bacterial polyesters containing branched poly(β-hydroxyalkanoate) units// Int. J. Biol. Macromol., 1990b, v. 12, p. 92-101.

76. Fritzsche K., Lenz R.W., Fuller R.C. Production of unsaturated polyesters by Pseudomonas oleovorans// Int. J. Biol. Macromol., 1990a, v. 12, p. 85-91.

77. Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery// Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., 2012; v. 29(1): p. 1-63.

78. Gavard R., Dahinger A., Hauttecoeur B., Reynaud C. Degradation du lipide β-hydroxybutyrique par un extrait enzymatique de Bacillus megaterium I. depolymerase A.// C.R. Acad. Sci. Paris, 1966, v. 263, p. 1273-1275.

79. Gebauer B., Jendrossek D. Assay of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase Activity and Product Determination// Appl. Environ Microbiol., 2006, v. 72, p. 6094-6100.

80. Gogolewski S., Jovanovic M., Perren S.M., Dillon J.G., Hughes M.K. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA)// J. Biomed. Mater. Res., 1993, v. 27(9), p. 1135-48.

81. Gomes M.E., Ribeiro A.S., Malafaya P.B., Reis R.L. and Cunha A.M. A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: morphology, mechanical and degradation behavior// Biomaterials, 2001, v. 22, p. 883–889.

82. Griebel R., Merrick J.M. Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate, effect of mild alkaline extraction on native poly-β-hydroxybutyrate granules// J. Bacteriol., 1971, v. 108, p. 782-789.

83. Griffith L.G. Polymeric biomaterials// Acta Mater, 2000, v. 48, p. 263-277.

84. Gryparis E.C., Hatziapostolou M., Papadimitriou E., Avgoustakis K. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells// Eur. J. Pharm. Biopharm., 2007, v. 67(1), p. 1-8.

85. Gu F.X., Karnik R., Wang A.Z., Alexis F., Levy-Nissenbaum E., Hong S., Langer R.S., Farokhzad O.C. Targeted nanoparticlesfor cancer therapy// Nano Today, 2007, v. 2(3), p. 14-21.

86. Gupte A., Ciftci K. Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres// Int. J. Pharm., 2004, v. 276(1-2), p. 93-106.

87. Hatefi A. and Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems// J. Controlled Release, 2002, v. 80, p. 9-28.

88. Haywood G.W., Anderson A.J., Ewing D.F., Dawes E.A. Accumulation of a poly-hydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by Pseudomonas sp. strain NCIMB40135// Appl. Environ. Microbiol., 1990, v. 56, p. 3354-3359.

89. Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions// J. Pharm. Sci., 1961, v. 50, p. 874-875.

90. Howard D., Partridge K., Yang X., Clarke N.M., Okubo Y., Bessho K., Howdle S.M., Shakesheff K.M., Oreffo R.O. Immunoselection and adenoviral genetic modulation of human osteoprogenitors: in vivo bone formation on PLA scaffold// Biochem. Biophys. Res. Commun, 2002, v. 299, p. 208-215.

91. Hu F.X., Neoh K.G., Kang E.T. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles// Biomaterials, 2006, v. 27, p. 5725–5733.

92. Huang R., Reusch R.N. Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of Escherichia colill// J. Biol. Chem., 1996, v. 271(36), p. 196-202.

93. Huo D., Deng S., Li L., Ji J. Studies on the poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres of cisplatin for lung-targeting// Int. J. Pharm., 2005, v. 289(1-2), p. 63-67.

94. Husmann M., Schenderlein S., Luck M., Lindner H., Kleinebudde P. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method// Int. J. Pharm., 2002, v. 242, p. 277-280.

95. Hutmacher D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives// J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2001, v. 12(1), p. 107–124.

96. Hyvonen S., Peltonen L., Karjalainen M., Hirvonen J. Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly(l-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate// Int. J. Pharm., 2005, v. 295 (1-2), p. 269-281.

97. Ichihara T., Sakamoto K., Mori K., Akagi M. Transcatheter Arterial Chemoembolization Therapy for Hepatocellular Carcinoma Using Polylactic Acid Microspheres Containing Aclarubicin Hydrochloride// Cancer Research, 1989, v. 49, p. 4357-4362.

98. Ignatius A.A., Claes L.E. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(l, dl-lactide) and poly(1-lactide-co-glycolide)// Biomaterials, 1996, v. 17(8), p. 831-839.

99. Iordanskii A.L, Zaikov G.E.The General Aspects of Diffusion of Water in Polymers// International Journal of Polymeric Materials, 1994, v. 24(1-4) p.193-209.

100. Jackson J.K., Smith J., Letchford K., Babiuk K.A., Machan L., Signore P., Hunter W.L., Wang K., Burt H.M. Characterization of perivascularpoly(lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel// Int. J. Pharm., 2004, v. 283, p. 97-109.

101. Jensen T.E., Sicko L.M. Fine structure of poly-β -hydroxybutyric acid granules in a blue-green alga Chlorogloea fritschii// J. Bacteriol., 1971, v. 106, p. 683-686.

102. Jeon O., Kang S.W., Lim H.W., Chung J.H., Kim B.S. Long-term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin-conjugated poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel// Biomaterials, 2006, v. 27, p. 1598-1607.

103. Jeong S.I., Kim S.H., Kim Y.H., Jung Y., Kwon J.H., Kim B.S., Lee Y.M. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering// J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 2004, v. 15(5), p. 645-660.

104. Jia Y., Yuan W., Wodzinska J., Park C., Sinskey A. J. and Stubbe, J. Mechanistic studies of Class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from Ralstonia eutropha: Class I and III synthases share a similar catalytic mechanism// Biochemistry, 2001, v. 40, p. 1011-1019.

105. Kanamala M., Wilson W., Yang M., Palmer B., Wu Z. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review// Biomaterials, 2016, v. 85 p. 152-167.

106. Kassab A.C., Xu K., Denkbas E.B., Dou Y., Zhao S., Piskin E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent// J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 1997, v. 8, p. 947-961.

107. Kipper M.J., Shen E., Determan A. and Narasimhan B. Design of an injectable system based on bioerodible polyanhydride microspheres for sustained drug delivery// Biomaterials, 2002, v. 23, p. 4405-4412.

108. Kisanga E.R. et al. Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial// Clin. Cancer Res., 2004, v. 10, p. 2336-43.

109. Kominek L.A., Halvorson H.O. Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate and acetoin in Bacillus cereus// J. Bacteriol., 1965, v. 90, p. 1251-1259.

110. Kosenko R.Y., Pankova Y.N., Iordanskii A.L., Zaikov G.E. Controlled Release of the Antiseptic From Poly(3-hydroxybutyrate) Films. Combination of Diffusion and Zero Order Kinetics// J. Balkan Tribological Assoc., 2007, v. 13, p. 242-248.

111. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P. and Peppas N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers/ Int. J. Pharm., 1983, v. 15, p. 25-35.

112. Kumar R., Bakowsky U., Lehr C.M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers// Biomaterials, 2004, v. 25, p. 1771-1777.

113. Langer R., Vacanti J.P. Tissue Engineering // Science, New Series, 1993, v. 260(5110), p. 920-926.

114. Lanza R., Langer R., Vacanti J. Principles of Tissue Engineering// 2nd edition, San Diego, California, Academic Press, 2000, p. 995.

115. Lemoigne M. Produit de deshydratation et de polymerisation de l'acide β-oxybutyrique// Bull. Soc. Chim. Biol., 1926, v. 8, p. 770-82.

116. Li H., Chang J. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite microspheres// J. Control. Release, 2005, v. 107, p. 463-73.

117. Liggins R.T., Burt H.M. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers// Int. J. Pharm., 2001, v. 222, p. 19–33.

118. Liggins R.T., Burt H.M. Paclitaxel-loaded poly(l-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release// Int. J. Pharm., 2004, v. 282, p. 61–71.

119. Lina R., Nga L.S., Wang C.H. In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles// Biomaterials, 2005, v. 26(21), p. 4476–4485.

120. Liu X., Heng W.S., Paul, Li Q., Chan L.W. Novel polymeric microspheres containing norcantharidin for chemoembolization// J. Control. Release, 2006, v. 116, p. 35-41.

121. Loo C.Y., Sudesh K. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties// Malays. Polym. J., 2007, v. 2, p. 31-57.

122. Lusty C.J., Doudoroff M. Poly-β -hydroxybutyrate depolymerase of Pseudomonas lemoignei// Biochemistry, 1966, v. 56, p. 960-965.

123. Lyons F., Partap S., O'Brien F.J. Part 1: scaffolds and surfaces// Technol Health Care, 2008, v. 16(4), p. 305-317.

124. Machida Y., Onishi H., Kurita A., Hata H., Morikawa A., Machida Y. Pharmacokinetics of prolonged-release CPT-11-loaded microspheres in rats// J. Control. Rel., 2000, v. 66, p. 159-175.

125. Macrae R.M., Wilkinson J.R. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of Bacillus cereus and Bacillus megaterium// J. Gen. Microbiol., 1958, v. 19, p. 210-222.

126. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy// Materials Science and Engineering, 2016, v. C60, p. 569-578.

127. Menei P., Daniel V., Montero-Menei C., Brouillard M., Pouplard-Barthelaix A., Benoit J.P. Biodegradation and brain tissue reaction to poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres// Biomaterials, 1993, v. 14(6), p. 470-478.

128. Merrick J.M., Doudoroff M. Depolymerization of poly-β-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system// J. Bacteriol., 1964, v. 88, p. 60-71.

129. Merrick J.M., Yu C.J. Purification and properties of a D(-)-β-hydroxybutyric acid dimer hydrolase from Rhodospirillum rubrum// Biochemistry, 1966, v. 5, p. 3563-3568.

130. Meyer A. Praktikum der botanischen bakterienkunde// Jena, 1903.

131. Mo Y., Lim L.Y. Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate// J. Control. Release, 2005, v. 107(1), p. 30-42.

132. Mu L., Feng S.S. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers// J. Control. Rel., 2001, v. 76, p. 239-254.

133. Mu L., Feng S.S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS// J. Control. Release, 2003, v. 86, p. 33-48.

134. Nemati F., Dubernet C., Fessi H., Colin de Verdi6re A., Poupon M.F., Puisieux F., Couvreur P. Reversion of multidrug resistance using nanoparticles in vitro: influence of the nature of the polymer// Int. J. Pharm., 1996, v. 138, p. 237-246.

135. Naito M., Yokoyama T., Hosokawa K., Nogi K. Nanoparticle Technology Handbook, Third Edition// Elsevier, 2018, p. 904

136. Nguyen A., Marsaud V., Bouclier C., Top S., Vessieres A., Pigeon P., Gref R., Legrand P., Jaouen G., Renoir J.M. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment// Int. J. Pharm., 2008, v. 347, p. 128-135.

137. Oeding V., Schlegel H. G. β-ketothiolase from Hydrogenomonas eutropha H16 and its significance in the regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism// Biochem. J., 1973, v. 134, p. 239-248.

138. Ouyang Q., Wang H., Cheng L., Sun Y. Effect of boric acid on the stabilization of poly(acrylonitrile-co-itaconic acid)// J. Polym. Res., 2007, v. 14(6), p. 497-503.

139. Painbeni T., Venier-Julienne M.C., Benoit J.P. Internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) BCNU-loaded microspheres. Influence on drug stability// Eur. J. Pharm. Biopharm., 1998, v. 45, p. 31-39.

140. Pavlov E., Zakharian E., Bladen C., Diao C. T. M., Grimbly C., Reusch R.N., French R. J. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction// Biophysical Journal, 2005, v. 88, p. 2614-2625.

141. Peppas N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers// Pharm. Acta Helv., 1985, v. 60, p. 110-111.

142. Pillai O. and Panchagnula R. Polymers in drug delivery// Curr. Opin. Chem. Biol., 2001, v. 5, p. 447-51.

143. Qu X.H., Wu Q., Zhang K.Y., Chen G.Q. In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions// Biomaterials, 2006, v. 27(19), p. 3540-3548.

144. Ranade V.V. and Hollinger M.A. Drug Delivery Systems — Pharmacology and Toxicology// 2nd edition, Boca Raton, Florida, Taylor & Francis Routledge, 2004.

145. Rehm B.H., Antonio R.V., Spiekermann P., Amara A.A., Steinbüchel A. Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from Ralstonia eutropha: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model// Biochim. Biophys. Acta., 2002, v. 1594(1), p. 178-190.

146. Reusch R.N. Biological complexes of poly-P-hydroxybutyrate. FEMS Microbiol. Rev., 1992, 103, 119-130.

147. Rivera-Briso A.L., Serrano-Aroca A. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications// Polymers, 2018, v. 10(7), p. 732.

148. Robinson J.R. and Lee V.H.L. Controlled Drug Delivery// Fundamentals and Applications, 2nd edition, New York, Marcel Dekker, 1987.

149. Roy S., Pal M., Gupta B.K. Indomethacin-Loaded Microspheres: Design and Preparation by a Multiple-Emulsification Technique and Their in Vitro Evaluation// Pharm. Res., 1992, v. 9, p. 1132-1136.

150. Rudge S.R. et al. Preparation, characterization, and performance of magnetic iron–carbon composite microparticles for chemotherapy// Biomaterials, 2000, v. 21, p. 1411-1420.

151. Rudge S., Peterson C., Vessel C., Koda J., Stevens S., Catterall L. Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier// J. Controlled Release, 2001, v. 74, p. 335-340.

152. Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G.K., Neuenschwander P., and Suterl U.W. Characterization of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts to particles of short-chain poly [(R)-3-hydroxybutyric acid// J. Biomed. Mater. Res., 1996, v. 30, p. 429-439.

153. Saito T., Tomita K., Juni K., Ooba K. In vivo and in vitro degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in rat// Biomaterials, 1991, v. 12, p. 309-312.

154. Salman M.A., Sahin A., Onur M.A., Oge K., Kassab A., Aypar U. Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro release and epidural analgesic effect in rats// Acta Anaesthesiol. Scand., 2003, v.47, p. 1006-1012.

155. Sastre R.L., Olmo R., Teijon C., Muniz E., Teijon J.M., Blanco M.D. 5-Fluorouracil plasma levels and biodegradation of subcutaneously injected drug-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers// Int. J. Pharm., 2007, v. 338(1-2), p. 180-190.

156. Schlegel H.G., Gottschalk G., Bartha R. Formation and utilization of poly-β-hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (Hydrogenomonas)// Nature, 1961, v. 191, p. 463-465.

157. Schlegel H.G. Die Speicherstoffe von Chromatium okenii// Arch. Mikrobiol., 1962, v. 42, p. 110-116.

158. Sendil D., Gursel I., Wise D.L., Hasirci V. Controlled release of antiseptic drug from poly(3-hydroxybutyrate)-based membranes combination of diffusion and kinetic mechanisms // J. Control. Release, 1999, v. 59, p. 207-217.

159. Senior P.J., Dawes E.A. Poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in Azotobacter beijerinkii// Biochem. J., 1971, v. 125, p. 55-66.

160. Senior P.J., Dawes E.A. The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in Azotobacter beijerinkii// Biochem. J., 1973, v. 134, p. 225-238.

161. Shiraki M., Endo T., Saito T. Fermentative production of (R)-(-)-3-hydroxybutyrate using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of Ralstonia eutropha and recombinant Escherichia coli// J. Biosci. Bioeng., 2006, v. 102(6), p. 529-34.

162. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Puzyr A.P. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media// L. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2005, v. 16, p. 643-657.

163. Shum-Tim D., Stock U., Hrkach J., Shinoka T., Lien J., Moses M.A., Stamp A., Taylor G., Moran A.M., Landis W., Langer R., Vacanti J.P., Mayer J.E. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer// The Annals of Thoracic Surgery, 1999, v. 68 p. 2298-2304.

164. Siegel R.A., Kost J. and Langer R. Mechanistic studies of macromolecular drug release from macroporous polymers. I. Experiments and preliminary theory concerning completeness of drug release// J. Control. Release, 1989, v.8(3), p. 223-236.

165. Siepmann J. and Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose// Advd.Drug Deliv.Rev., 2001, v. 48, p. 139-157.

166. Siepmann J., Faisant N., Benoit J.P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations//Pharm. Res., 2002, v. 19, p. 1885-1893.

167. Siepmann J., Elkharraz K., Siepmann F., Klose D. How Autocatalysis Accelerates Drug Release from PLGA-Based Microparticles: A Quantitative Treatment//Biomacromolecules, 2005, v. 6, p. 2312-2319.

168. Siepmann J., Siepmann F. Microparticles used as drug delivery systems// Colloid Polym. Sci., 2006, v. 133, p. 15-21.

169. Singh M., Vajdy M., Gardner J., Briones M., O'Hagan D. Mucosal immunization with HIV-1 gag DNA on cationic microparticles prolongs gene expression and enhances local and systemic immunity// Vaccine, 2002, v. 20, p. 594-602.

170. Singh U.V., Udupa N. In vitro characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumor// Pharm. Acta Helv., 1997, v. 72(3), p. 165-173.

171. Slepecky R.A., Law J.H. Synthesis and degradation of poly-β-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of Bacillus megaterium// J. Bacteriol., 1961, v. 82, p. 37-42.

172. Solheim E., Sudmann B., Bang G., Sudmann E. Biocompatibility and effect on osteogenesis of poly(ortho ester) compared to poly(DL-lactic acid)// J. Biomed. Mater. Res., 2000, v. 49(2), p. 257-263.

173. Stapp C. Uber die reserveinhaltstoffe und den schlein von Azotobacter chroococcum// Zentbl Bakteriol II, 1924, v. 61, p. 276-92.

174. Steinbuchel A., Valentin H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids// FEMS Microbiol. Lett., 1995, v. 128, p. 219-228.

175. Stockdale H., Ribbons D.W., Dawes E.A. Occurence of poly-β-hydroxybutyrate in the Azotobacteriaceae// J. Bacteriol., 1968, v. 95, p. 1798-1803.

176. Sun B., Ranganathan B., Feng S.S. Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer// Biomaterials, 2008, v. 29(4), p. 475-486.

177. Taddei P., Simoni R., Finia G. Spectroscopic study on the in vitro degradation of a biodegradable composite periodontal membrane// J. Mol. Struct., 2001, v. 565, p. 317-322.

178. Taddei P., Monti P., Simoni R. Vibrational and thermal study on the in vitro and in vivo degradation of a bioabsorbable periodontal membrane: Vicryl Periodontal Mesh (Polyglactin 910)// J. Mater. Sci. Mater. Med., 2002, v. 13, p. 59-64.

179. Taylor M. S., Daniels A. U., Andriano K. P., Heller J. Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products // J. Appl. Biomater., 1994, v. 5(2), p. 151-157.

180. Tian J., Sinskey A.J., Stubbe J. Class III Polyhydroxybutyrate Synthase: Involvement in Chain Termination and Reinitiation// Biochemistry, 2005, v. 44, p. 8369-8377

181. Timm A., Steinbuchel A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other fluorescent pseudomonads// Appl. Environ. Microbiol., 1990, v. 56, p. 3360-3367.

182. Tomoda K., Kojima S., Kajimoto M., Watanabe D., Nakajima T., Makino K. Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres// Colloids Surf. B. Biointerfaces, 2005, v. 45, p. 1-6.

183. Tsuge T., Fukui T., Matsusaki H., Taguchi S., Kobayashi G., Ishizaki A., Doi Y. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratases genes from Pseudomonas aeruginosa and their use for polyhydroxyalkanoates synthesis// FEMS Microbiol. Lett., 2000, v. 184, p. 193-198.

184. Uchida M., Natsume H., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morjmoto Y. Effects of Particle Size, Helium Gas Pressure and Microparticle Dose on the Plasma Concentration of Indomethacin after Bombardment of Indomethacin-Loaded Poly-L-Lactic Acid Micro spheres Using a Helios™ Gun System// Biol. Pharm. Bull., 2002, v. 25, p. 690-693.

185. Uchino K., Saito T., Gebauer B., Jendrossek D. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA// J. Bacteriol, 2007, v. 189 (22), p. 8250-8256.

186. Vergnaud J. M. Controlled Drug Release of Oral Dosage Forms//Ellis Horwood: Chichester, U.K., 1993.

187. Verlinden R.A., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Radecka I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates// J. Appl. Microbiol., 2007, v. 102, p. 1437-1449.

188. Wada R., Hyon S.H., Ikada Y. Kinetics of diffusion-mediated drug release enhanced by matrix degradation// J. Control. Release, 1995, v. 37, p. 151-160.

189. Wallen L.L., Rohwedder W.K. Poly-β-hydroxyalkanoate from activated sludge// Environ. Sci. Technol., 1974, v. 8, p. 576-579.

190. Wang Y.W., Wu Q., Chen G.Q. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds// Biomaterials, 2004, v. 25(4), p. 669-675.

191. Whittlesey K.J. and Shea L.D. Delivery systems for small molecule drugs, proteins and DNA: the neuroscience/biomaterial interface// Exp Neurol, 2004, v. 190, p. 1-16.

192. Williams J.M., Adewunmi A., Schek R.M., Flanagan C.L., Krebsbach P.H., Feinberg S.E., Hollister S.J., Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering// Biomaterials, 2005, v. 26(23), p. 4817–4827.

193. Winzenburg G., Schmidt C., Fuchs S. and Kissel T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems// Advd. Drug Deliv. Rev., 2004, v. 56 p. 1453-1466.

194. Xu Q., Czemuszka J.T. Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres// J. Control. Release, 2008, v. 127, p. 146-153.

195. Yadav A.K., Mishra P., Mishra A.K., Mishra P., Jain S., Agrawal G.P. Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin// Nanomedicine, 2007, v. 3(4), p. 246-257.

196. Yang X., Zhao K., Chen G.Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates// Biomaterials, 2002, v. 23(5), p. 1391-1397.

197. Yeo J.C., Muiruria J.K., Thitsartarn W., Li Z., He C. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications// Materials Science&Engineering, 2018, v. C92, p. 1092-1116

198. Yip E.Y., Wang J., Wang C.H. Sustained release system for highly water-soluble radiosensitizer drug etanidazole: irradiation and degradation studies// Biomaterials, 2003, v. 24, p. 1977-1987.

199. Yoo H.S., Park T.G. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles// J. Control. Release, 2004, v. 96(2), p. 273-283.

200. Young R.J. and Lovell P.A. Introduction to Polymers// London, Chapman & Hall, 1991.

201. Yue I.C., Poff J., Cortes M.E., Sinisterr R.D., Faris C.B., Hildgen P., Langer R., Shast V.P., A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease// Biomaterials, 2004, v. 25, p. 3743-3750.

202. Zhang H., Gao S. Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against glioma C6 cancer cells in vitro// Int. J. Pharm., 2007, v. 329(1-2), p. 122-128.

203. Zhang J., Shishatskay E.I., Volova T.G., da Silva L.F., Chen G.Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications//Materials Science&Engineering, 2018, v. C86, p. 144-150.

204. Zhang Z., Lee S.H., Feng S.S. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery// Biomaterials, 2007, v. 28, p. 1889-1899.

205. Zheng Z., Li M., Xue X.J., Tian H.L., Li Z., Chen G.Q. Mutation on N-terminus of polyhydroxybutyrate synthase of Ralstonia eutropha enhanced PHB accumulation// Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, v. 72, p. 896-905.

206. Zidan A.S., Omaima A. Formulation of anastrozole nanoparticles as biodegradable anticancer drug carriers // AAPS PharmSciTech, 2006, v. 7 (3), p. E38-E46.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на базе института биохимии им. А.Н. Баха Федерального Исследовательского Центра «Фундаментальные Основы Биотехнологии» Российской Академии Наук.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н. Бонарцевой Гарине Александровне за помощь в освоении методов и советы на всех этапах выполнения диссертации.

Автор искренне благодарен всему коллективу лаборатории азотфиксации и метаболизма азота за плодотворное сотрудничество и обсуждения результатов.

Отдельную благодарность автор выражает н.с. Махиной Татьяне Константиновне за выполнение экспериментов по биосинтезу ПОБ, к.б.н. Мышкиной Вере Леонидовне за помощь в работе с культурой, д.б.н. заведующему лабораторией Топунову Алексею Федоровичу за доброжелательное отношение и поддержку, а также в.н.с. Кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н. Бонарцеву Антону Павловичу за научное консультирование на всех этапах выполнения работы.