

# НОВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## КИНЕТИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МЕТИЛУРАЦИЛА ИЗ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Е. Н. Антонов<sup>1</sup>, Д. В. Бутнару<sup>2</sup>, А. З. Винаров<sup>2</sup>, Е. В. Истранова<sup>2</sup>,  
С. А. Минаева<sup>1</sup>, В. К. Попов<sup>1</sup>

Методом сверхкритической флюидной монолитизации без использования органических растворителей и высоких температур сформированы биорезорбируемые полилактогликолидные матриксы-носители, содержащие 20 массовых % 6-метилурацила (МУ). Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света исследовано распределение МУ по объему матриксов и изучена кинетика его высвобождения из полученных носителей в раствор фосфатно-солевого буфера. Показано, что за первые сутки пребывания носителей в буферном растворе выходит не более 15 – 20 %, содержавшегося в них МУ. После этого кинетика высвобождения МУ выходит на практически линейный режим с одновременным замедлением процесса его выхода. К 40 сут наблюденный количество метилурацила, вышедшего в раствор, составило в среднем 80% от значения его исходной концентрации в носителях. Таким образом, на модели МУ показано, что разработанные биорезорбируемые и биоактивные композиты могут быть использованы в качестве матриксов-носителей для адресной и пролонгированной доставки лекарственных препаратов, обеспечивающих плавный и продолжительный выход инкапсулированных в них веществ.

**Ключевые слова:** 6-метилурацил; полилактогликолид; кинетика высвобождения; сверхкритический диоксид углерода; спектроскопия комбинационного рассеяния.

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка и создание новых лекарственных форм адресного и пролонгированного действия является одной из основных тенденций развития современной фармации [12]. Применение лекарственных форм с пролонгированным и локальным характером выделения биологически активного вещества (БАВ) уменьшает его терапевтическую дозу, снижает флуктуации концентраций препарата в крови и сокращает риск возникновения побочных эффектов, по сравнению с таблетированными или инъекционными формами [11].

В тканевой инженерии БАВ являются одними из основных факторов, определяющих направление и скорость формирования новых тканей [10]. Среди БАВ большой интерес представляют метаболические препараты, являющиеся универсальными клеточными стимуляторами [3], а метилурацил является одним из наиболее известных таких препаратов. Он обладает регенеративным, иммуностимулирующим и противовоспалительным свойствами, эффективно ускоряя заживление ран [1, 4].

Использование биорезорбируемых полимерных материалов, таких, например, как алифатические поли-

эффиры, в качестве матриксов-носителей БАВ позволяет осуществлять однократный ввод лекарственной формы без необходимости ее последующего извлечения. Скорость высвобождения БАВ из матриксов в окружающие ткани определяется его диффузией, а также скоростью биodeградации самих матриксов и, соответственно, зависит от их состава, структуры, геометрических, морфологических и физико-химических характеристик.

Из всего многообразия различных методов включения БАВ в полимерные носители, применяемых сегодня в фармации, методы, основанные на использовании сверхкритических флюидных технологий (СКФ) [7, 9], обладают целым рядом неоспоримых преимуществ. Это обусловлено, в первую очередь, отсутствием необходимости использования токсичных органических растворителей (ацетон, хлороформ, и др.), следовые количества которых чрезвычайно трудно и дорого удалять из конечных продуктов [6, 13]. Все процессы могут быть реализованы практически при комнатной температуре (35 – 40 °С), что позволяет существенно расширить номенклатуру применяемых термочувствительных полимерных матриксов и содержащихся в них термолабильных биоактивных соединений [8].

В настоящей работе методом СКФ монолитизации смесей мелкодисперсных порошков 6-метилурацила (МУ) и полилактогликолида (ПЛГ) в сверхкритиче-

<sup>1</sup> Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, 142190, Москва, г. Троицк, ул. Пионерская, д. 2.

<sup>2</sup> Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

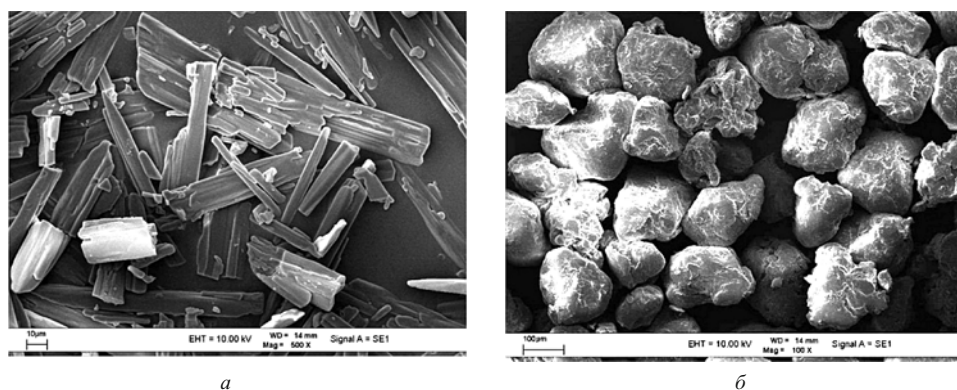


Рис. 1. Микрофотографии исходных порошков МУ (*а*) и PDLG 7507 (*б*). Цена деления шкалы 10 мкм (*а*) и 100 мкм (*б*).

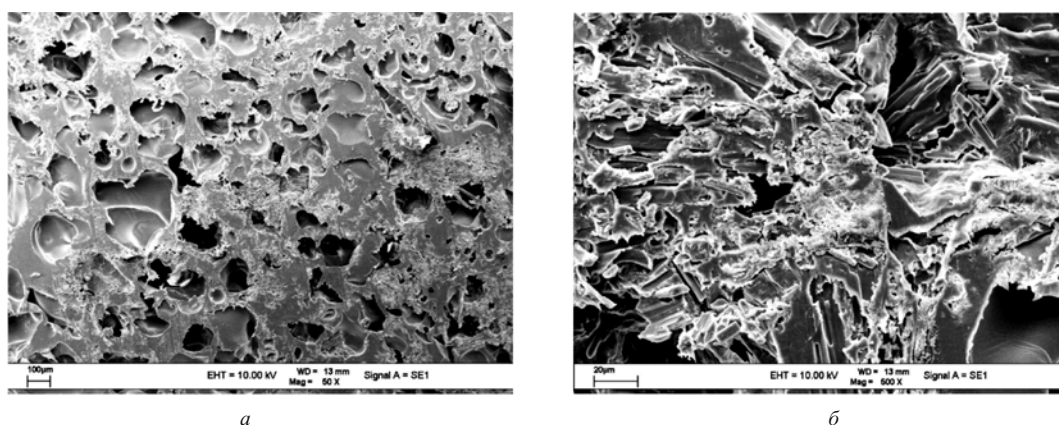


Рис. 2. Микрофотографии поверхности среза матрикса. Цена деления шкалы 100 мкм (*а*) и 20 мкм (*б*).

ском диоксиде углерода (ск-СО<sub>2</sub>) получены биорезорбируемые матриксы-носители и изучена кинетика высвобождения из них МУ в раствор фосфатно-солевого буфера.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для формирования биоактивных носителей использовался один из изомеров МУ — 6-метилурацил (2,4-диоксо-6-метил-1,2,3,4-тетрагидропиримидин, производства ОАО Нижфарм) и полилактогликолид марки PDLG 7507 — сополимер молочной (75 %) и гликолевой (25 %) кислот с приведенной вязкостью 0,7 дл/г (производства PURAC Biochem bv, Нидерланды).

Композитные матриксы формировались методом СКФ монолитизации смеси исходных порошковых компонентов. Этот процесс базируется на явлении снижения температуры стеклования  $T_g$  и пластификации аморфных или частично-кристаллических полимеров при их взаимодействии с СКФ, в качестве которого обычно используется ск-СО<sub>2</sub> [2]. Экспериментальные образцы биоактивных матриксов формировались на установке, подробно описанной в [5]. Для этого смесь порошков полимера (80 вес. %) и МУ (20 вес. %) перемешивалась в агатовой ступке и загружалась в тефлоновую пресс-форму. Пресс-форма поме-

щалась в камеру высокого давления, которая затем уплотнялась, продувалась и заполнялась СО<sub>2</sub>. Процесс обработки содержимого пресс-формы проводился при давлении диоксида углерода 10 МПа и температуре 40 °С в течение 1 ч. По его завершению в течение 15 мин проводился сброс давления до атмосферного значения. При этом формировалась пористая полимерная структура заданной формы и размера с распределенным по ее поверхности и объему МУ. После сброса давления пресс-форму выдерживали в атмосферных условиях в течение 12 ч, необходимых для полного удаления СО<sub>2</sub> из полученных матриксов и их окончательного отверждения.

На рис. 1 представлены микрофотографии порошков исходного МУ и PDLG 7507. Частицы МУ имеют игольчатую форму длиной от 20 до 100 мкм (рис. 1, *а*). Порошок PDLG 7507 готовили размолот исходных гранул полимера роторной мельницей и последующим просеиванием через сита с калиброванными ячейками. Для экспериментов была отобрана фракция с размером частиц от 100 до 200 мкм (рис. 1, *б*).

Кинетика высвобождения МУ из сформированных матриксов определялась с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) по изменению во времени интегральной интенсивности выбранной ана-

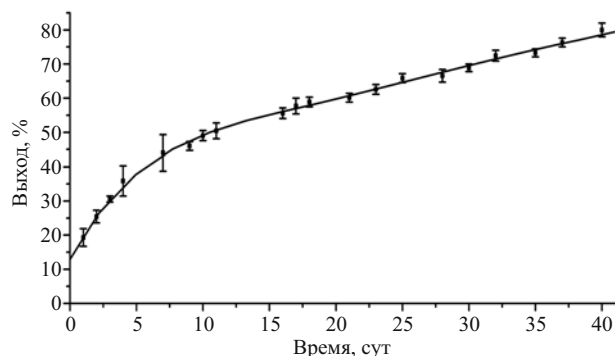


Рис. 3. Кинетика высвобождения МУ из полимерного матрикса в буферный раствор.

литической полосы. Для этого исследуемые носители помещались в стеклянные емкости, в которые затем добавлялось по 3 мл раствора фосфатно-солевого буфера с  $\text{pH} = 7,4$  (ПанЭко, Москва). Емкости термостатировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  и через определенные промежутки времени измеряли концентрации МУ, вышедшего в раствор. Измерения проводили на дисперсионном спектрометре комбинационного рассеяния Alpha XR (Thermo Scientific, США). Длина волны возбуждающего лазера 785 нм. Длительность регистрации спектра, при которой достигалось оптимальное отношение сигнала к шуму, составляла 10 мин. Измерения проводились по 3 образцам с последующим усреднением результатов.

Структуру полученных образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе LEO 1450 (Карл Цейс, Германия). Для этого образцы наклеивались на проводящую (углеродную) клейкую ленту, на которую затем методом плазменного напыления наносили тонкую ( $\sim 0,05 - 0,1$  мкм) пленку золота, обеспечивающую требуемую электропроводность его поверхности.

Для анализа распределения МУ внутри композита мы использовали спектроскопию КР с высоким ( $\sim 1$  мкм) пространственным разрешением. Для этого были получены КР спектры исходных МУ и PDLG 7507 и выбраны характеристические полосы, по которым затем определяли наличие или отсутствие выбранного молекулярного компонента в точке поверхности, в которой регистрировался спектр.

Спектры регистрировали при следующих параметрах: длина волны излучения лазера 785 нм, шаг сканирования 25 мкм. Время накопления одного спектра составляло 40 с. Использовали автоматическую коррекцию базовой линии.

В качестве аналитических были выбраны близкие по интенсивности и близко лежащие полосы: метилурацила —  $1657\text{ см}^{-1}$  и полимера —  $1770\text{ см}^{-1}$ . При этом выборе запись спектров можно было осуществлять в узком спектральном диапазоне  $1600 - 1850\text{ см}^{-1}$ , что позволяло в несколько раз снизить, по сравнению с регистрацией спектра в широком диапа-

зоне, суммарное время записи спектров карты. Для области сканирования размером  $0,6 \times 2,6$  мм и расстоянии между точками регистрации спектров 25 мкм полное время записи карты составляло 24 ч. Полученные по выбранным характеристическим полосам КР-спектра карты показали равномерное распределение молекул МУ на срезе композитного матрикса.

Для проведения анализа скоростей высвобождения МУ в раствор фосфатно-солевого буфера так же, как и для построения карты КР распределения МУ, был проведен выбор аналитической спектральной полосы комбинационного рассеяния. Критерием выбора аналитической полосы в этом случае являлось получение максимальной чувствительности и точности при измерении интегральных интенсивностей спектральных полос МУ. Поскольку измерения проводились в жидкой фазе, то регистрировался спектр растворенного МУ и принимался во внимание КР-спектр самого растворителя, фосфатно-солевого буфера с  $\text{pH} = 7,4$ .

В спектрах КР растворов МУ наблюдались 2 сильные, слабо маскируемые спектром буферного раствора полосы в районе  $1238$  и  $651\text{ см}^{-1}$ , принадлежащие плоскостному деформационному колебанию C–H ( $\beta(\text{C5-H13})$ ) и дышащему колебанию ( $\nu(\text{C}_6\text{-CH}_2)$ ) бензольного кольца [14]. Для проведения количественных измерений скорости высвобождения МУ из PDLG 7507 в качестве аналитической была выбрана полоса с максимумом в районе  $651\text{ см}^{-1}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе обработки смеси порошков МУ и полимера в ск- $\text{CO}_2$  молекулы диоксида углерода проникают внутрь полимера. При этом происходит пластификация (переход в гелеобразное состояние) и набухание полилактогликолида. На этой стадии частицы БАВ интегрируются с гелеобразным полимером. При выходе системы из сверхкритических условий происходит отверждение полимера и его монолитизация вместе с находящимся в нем МУ. При использовании этого подхода требования к растворимости биоактивных компонентов в СКФ перестают быть актуальными. Исходные микрочастицы или растворенные в ск- $\text{CO}_2$  молекулы БАВ в любом случае оказываются включенными внутрь объема полимера.

Полученные композитные матриксы представляли собой цилиндры диаметром 5 мм и высотой 5 мм. Поперечный срез матрикса показан на рис. 2. Он имеет пористую структуру, пористость которой задается разницей в объемах пресс-формы и порошков исходных компонентов. В наших экспериментах пористость составляла порядка 50 – 55 об. %. Видно, что кристаллы МУ обволакиваются полимером или заключены внутри его объема. На поверхности наблюдается выход фрагментов кристаллов МУ наружу, но при этом оставшиеся их части также интегрированы в полимер (рис. 2, б).

Скорость высвобождения МУ из полимерного носителя определяли измерением интегральной интенсивности аналитической полосы  $651\text{ см}^{-1}$  КР спектра раствора через определенные промежутки времени после помещения матриц в фосфатно-солевой буфер. Предварительно была проведена калибровка установки по измерению спектров КР с использованием специально приготовленных растворов МУ с различными концентрациями (от 0,25 до 6 мг/мл).

Полученная зависимость концентрации МУ от времени представлена на рис. 3. За 100 % принималась концентрация, которая образовалась бы при условии выхода в раствор всего количества МУ, инкапсулированного с помощью ск-СО<sub>2</sub> в полимерный образец.

Измерения показали, что за первые сутки пребывания матриц в буферном растворе из них выходит около 20 % МУ. В последующие 3 сут суточный выход составлял приблизительно по 5 %. Затем скорость высвобождения плавно уменьшалась и после 10 сут выходила на постоянную величину (порядка 1 % в сутки). К 40 сут (окончание эксперимента) интегральная величина выхода МУ из матриц-носителей составила около 80 %.

## ВЫВОДЫ

Разработан СКФ метод включения метилурацила в биорезорбируемые полимеры без использования органических растворителей и высоких температур. На этой экспериментальной модели продемонстрирована возможность получения полимерных матриц-носи-

телей для адресной и пролонгированной (до 40 и более сут) доставки лекарственных препаратов, стимулирующих регенерацию и рост тканей различных типов.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Г. Бик, *Стоматология*, **4**, 15 – 18 (1991).
2. Ф. М. Гумеров, А. Н. Сабирзянов, Г. И. Гумерова, *Суб- и сверхкритические флюиды в процессах переработки полимеров*, ФЭн, Казань (2000).
3. Т. В. Звягинцева, И. В. Халин, *Метаболитотропная терапия хронических ран*, Харьков (2011).
4. А. Ф. Исмаилова, Ф. С. Зарудий, Д. Н. Лазарева, *Антибиот. и химиотер.*, **43**, 24 – 25 (1998).
5. В. К. Попов, А. П. Краснов, А. И. Воложин, С. М. Хоудл, *Персп. матер.*, **4**, 49 – 57 (2004).
6. S. P. Cape, J. A. Villa, E. T. S. Huang, et al., *Pharm. Res.*, **25**(9), 1967 – 1990 (2008).
7. M. J. Cocero, A. Martin, F. Mattea, S. Varona, *J. Supercrit. Fluids*, **47**, 546 – 555 (2009).
8. W. H. Hauthal, *Chemosphere*, **43**, 123 – 135 (2001).
9. S. M. Howdle, M. S. Watson, M. J. Whitaker, et al., *Chem. Commun.*, **1**, 109 – 110 (2001).
10. J. A. Hubbell, *Cur. Opinion Biotechnol.*, **10**, 123 – 129 (1999).
11. W. Jiang, R. K. Gupta, M. C. Deshpande, S. P. Schwendeman, *Adv. Drug Del. Rev.*, **57**(3), 401 – 410 (2005).
12. R. Langer, *Nature*, **392**(6679 Suppl.), 5 – 10 (1998).
13. B. Subramaniam, R. A. Rajewski, K. Snavely, *J. Pharm. Sci.*, **86**(8), 885 – 890 (1997).
14. R. Tabish, A. Shabbir, *Indian J. Phys.*, **85**(2), 239 – 260 (2011).

Поступила 19.01.15

## KINETICS OF METHYLURACIL RELEASE FROM BIORESORBABLE POLYMERIC CARRIERS

E. N. Antonov<sup>1</sup>, D. V. Butnaru<sup>2</sup>, A. Z. Vinarov<sup>2</sup>, E. V. Istranova<sup>2</sup>, S. A. Minaeva<sup>1</sup>, and V. K. Popov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences, Troitsk, Moscow oblast, 142190 Russia

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

Bioresorbable poly(lactic-co-glycolic) matrix-carriers containing 20 wt. % of 6-methyluracil (MU) have been prepared by supercritical fluid monolithization without organic solvents. Raman spectroscopy was used to analyze both the spatial distribution MU over polymer matrices and the MU release kinetics from the carrier into phosphate buffer solution. It was found that, during the first 24 h, the amount of released MU did not exceed 15 – 20 % of its encapsulated content. After that, the MU release kinetics passed to almost linear regime with simultaneous retarding of the process. On the 40th day of observation, the MU content in solution reached up to 80 % of its initial content in the carriers. Thus, using 6-methyluracil as a model, it was shown that the proposed bioresorbable and bioactive composites can be used as matrix-carriers for targeted and long-term drug release.

**Keywords:** 6-velthyluracilum; poly(lactic-co-glycolic) acids; release kinetics; supercritical carbon dioxide; Raman spectroscopy.