

УДК 577.151.45

©Коллектив авторов

**БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ
С ЭКСТРАКТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ:
ПОЛУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО
ДИОКСИДА УГЛЕРОДА И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ**

**Е.А. Марквичева^{1*}, Е.Н. Антонов², А.В. Попова², С.Э. Богородский²,
В.В. Лихарева¹, Б.М. Фельдман³, С.М. Струкова⁴, В.К. Попов², Л.Д. Румш¹**

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; тел.: +7(495) 336-06-00; факс: +7(495) 335-10-11; эл. почта: lemark@mx.ibch.ru

²Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН

³Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научный центр "НИОПИК""

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Получены биodeградируемые микрочастицы на основе поли-D,L-лактида, содержащие смесь водорастворимых экстрактов подорожника (*Plantago major*) и календулы (*Calendula officinalis* L.) (ЭПК). Для получения полимерных микрочастиц с включенными в них биомолекулами был предложен разработанный ранее метод, основанный на использовании сверхкритического диоксида углерода (ск-СО₂). При этом микрочастицы с инкапсулированным в них ЭПК получали двумя различными способами: 1) путём монолитизации порошковой смеси полилактида с экстрактом подорожника и календулы под воздействием ск-СО₂ с последующим механическим криоизмельчением образовавшегося композита (метод монолитизации) и 2) путём распыления этой смеси, пластифицированной в ск-СО₂, в ресивер атмосферного давления (метод распыления). Была изучена кинетика выхода ЭПК из микрочастиц в модели *in vitro* и показано, что она зависит от способа получения микрочастиц, их структуры и исходного соотношения полимер/ЭПК. На модели ацетатной язвы желудка у крыс продемонстрировано, что высвобождающийся из микрокапсул ЭПК способствует ускорению репарации тканей.

Ключевые слова: поли-D,L-лактид, биodeградируемые микрочастицы, сверхкритический диоксид углерода, экстракты подорожника и календулы, язва желудка.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. С развитием сверхкритических флюидных технологий (СКФТ) появились новые возможности для разработки перспективных высокоэффективных препаратов с пролонгированным и/или контролируемым высвобождением лабильных биоактивных терапевтических агентов без использования каких бы то ни было органических растворителей [1]. В качестве таких агентов могут использоваться пептиды, белки, в том числе различные ферменты, высокомолекулярные и низкомолекулярные гормоны, ДНК и олигонуклеотиды, а также биофлавоноиды и другие биоактивные соединения. В настоящее время микрокапсулы и микрочастицы на основе биodeградируемых полимеров находят все более широкое применение при разработке новых эффективных форм доставки лекарств. Разрабатываемый нами на протяжении последних лет метод получения микрочастиц из пластифицированных под действием сверхкритических флюидов (СКФ) полимеров, позволяет получать биodeградируемые микрочастицы, однородно наполненные как растворимыми, так и нерастворимыми в ск-СО₂ биоактивными соединениями [2-3]. При этом формирование микрочастиц можно проводить при физиологических температурах и в отсутствие органических растворителей, которые часто являются основной причиной потери активности биоактивными молекулами. “Сухая” (без использования растворителей) и низкотемпературная (~40°C) технология формирования микрочастиц с включёнными в них биоактивными молекулами основана на явлениях снижения температуры стеклования, пластификации, набухания и/или вспенивания аморфных и частично кристаллических полимеров при их взаимодействии со ск-СО₂.

Целью настоящего исследования было получение с помощью СКФТ полимерных микрочастиц на основе поли-D,L-молочной кислоты с включёнными в них биомолекулами, исследование кинетики выхода этих биомолекул в модели *in vitro* и изучение возможности применения этих микрочастиц для ускорения процесса репарации тканей в модели *in vivo*.

МЕТОДИКА. В работе использовали поли-D,L-лактид, Purasorb® (“Purac”, Нидерланды) с молекулярной массой $M_w \sim 16000$ и D,L-полилактид с $M_w \sim 84000$ (“Alkermes Inc.”, США), а также водорастворимые экстракты подорожника (*Plantago major*) и календулы (*Calendula officinalis*), предоставленные ФГУП “НИОПИК”. Диоксид углерода марки о.с.ч. (99,99%) производства Балашихинского кислородного завода (Московская обл.) использовался в экспериментах без дополнительной очистки. Для анализа формы, размеров и морфологии полученных микрочастиц и структур использовали флуоресцентную микроскопию (микроскоп Micros MC 300F, Австрия) и сканирующую электронную микроскопию (LEO 1450 Carl Zeiss, Германия). Для получения микрочастиц использовали экспериментальную установку, описанную ранее [4]. Для определения количества ЭПК, включившегося с микрочастицы, проводили полный гидролиз образцов при 50°C в течение 3 часов. Затем раствор центрифугировали, фильтровали, а количество ЭПК определяли спектрофотометрически (Beckman DU-70, при $\lambda = 330$ нм) с помощью предварительно построенной калибровочной кривой.

Анализ кинетики выхода ЭПК из полимерных микрочастиц проводили следующим образом. Аликвоту микрочастиц (10 мг) помещали в 2 мл физиологического раствора и медленно перемешивали на качалке (G24 Enviromental incubator shaker, New Brunswick, США) до получения однородной суспензии. Через каждые 15 минут образцы центрифугировали при 16000 g, отбирали супернатант и фильтровали через бумажный фильтр. Затем определяли количество экстракта в супернатантах спектрофотометрически, как описано выше, а оставшийся осадок (микрочастицы) вновь помещали в 2 мл физиологического раствора и повторяли все описанные выше процедуры.

Эксперименты по заживлению язвы проводили на 12 беспородных крысах-самцах весом 200-250 г, используя модифицированный метод Okabe et al. [5], как описано ранее [6]. Все эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными

Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным. Через 2 часа после операции животным опытной группы ($n=6$) через зонд вводили в желудок 20 мкл микрокапсул с ЭПК в 300 мкл 0,5 % раствора альгината Na. Контрольным животным вводили 20 мкл пустых микрочастиц поли-D,L-лактида ($n=6$). На 3 и 7 сутки эксперимента проводили морфометрический анализ области повреждения. Достоверность различий показателей между сравниваемыми группами оценивали по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В данной работе в качестве биodeградируемого полимера была выбрана поли-D,L-молочная кислота (поли D,L-лактид) – алифатический полиэфир с аморфной структурой. Это было обусловлено, с одной стороны, тем, что данный материал широко используется для создания рассасывающихся хирургических нитей, хирургических имплантатов, сосудистых эндопротезов, а также систем с контролируемым выделением лекарств [7]. С другой стороны, аморфная структура поли-D,L-лактида позволяет использовать ск- CO_2 для его эффективной пластификации [2].

Что касается выбора ЭПК в качестве биоактивного соединения, известно, что препараты на основе календулы и подорожника широко используются в медицине для лечения различных заболеваний ротовой полости и глотки, при ранениях и ссадинах, а также для лечения гастритов, дуоденитов, язвенной болезни желудка, двенадцатиперстной кишки и заболеваний кишечника [8, 9]. Кроме того, ранее нами было показано, что ЭПК, инкапсулированный в микрокапсулы на основе природных полисахаридов (хитозана и χ -каррагинана), способствует ускорению процесса репарации тканей на модели язвы желудка крысы [8]. В то же время, выбор ЭПК был обоснован еще и тем, что биофлавоноиды (основной биоактивный компонент ЭПК) легко тестировать при включении в поли-D,L-лактидные микрочастицы как качественно (с помощью флуоресцентной микроскопии), так и количественно (методом спектрофотометрии, при $\lambda=330$ нм).

Получение и исследование микрочастиц с включенным в них ЭПК. Для включения ЭПК в полимерные микрочастицы использовалось явление пластификации аморфных алифатических полиэфиров в сверхкритическом CO_2 [11]. ЭПК смешивали с порошком поли-D,L-лактида (средний размер частиц 10-20 мкм) в соотношении 10 и 20 % масс. от смеси ЭПК-полимер и помещали в камеру высокого давления, куда затем подавали CO_2 , давление доводили до 10 или 20 МПа при температуре 40°C. После этого в течение 30 минут проводили интенсивное перемешивание пластифицированной полимерной массы с помощью механического смесителя на магнитной муфте. Окончательное формирование микрочастиц проводилось двумя различными способами:

1. После сброса давления CO_2 в камере получали пористый полимерный композит (метод монолитизации) с однородно включенными в него частицами ЭПК, который затем размалывался в мелкодисперсный порошок ротационной мельницей с использованием сухого льда. Полученный порошок фракционировали путем просеивания через сита с размером ячеек 100 и 200 мкм. В данном способе использовался поли-D,L-лактид с $M_w \sim 84000$.

2. Пластифицированную в ск- CO_2 смесь низкомолекулярного поли-D,L-лактида ($M_w \sim 16000$) с ЭПК инжестировали в ресивер атмосферного давления через сопло диаметром 200 мкм с помощью импульсного дозатора (метод распыления) [4].

Следует отметить, что оба метода обеспечивают формирование полимерных микрочастиц, однородно наполненных ЭПК за счёт их простого механического перемешивания в атмосфере ск- CO_2 без использования органических растворителей.

На рисунке 1 представлены микрофотографии исходного порошка ЭПК (рис. 1 а и 1 с), а также ЭПК, инкапсулированного в микрочастицы (рис. 1 б и 1 д), которые были получены методом распыления. Анализ полученных фотографий свидетельствует о равномерном распределении порошка ЭПК (размер частиц 10-25 мкм) в полимерные микрочастицах (50–100 мкм).

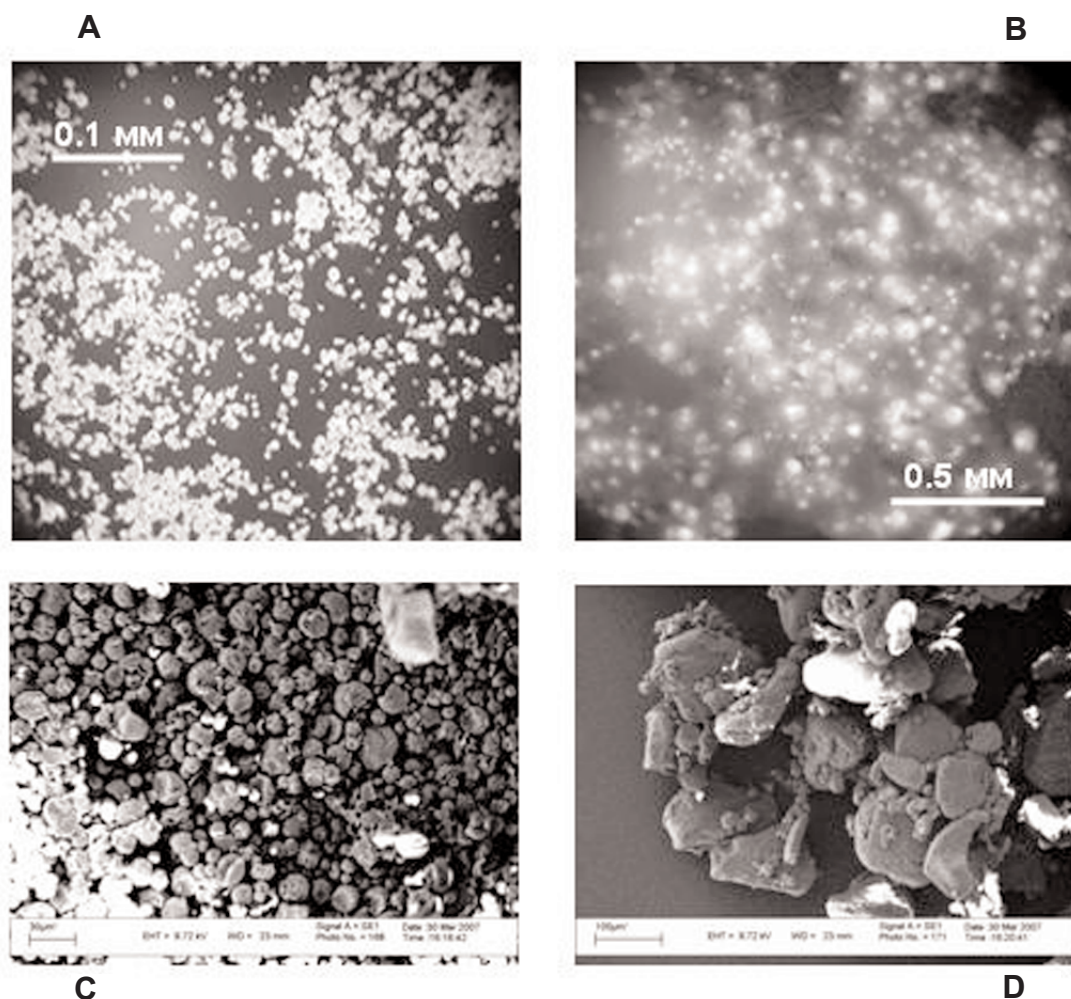


Рисунок 1.

Фотографии исходного порошка смеси экстрактов подорожника и календулы (а, с) и ЭПК, инкапсулированного в микрочастицы поли-D,L-лактида (b, d) методом распыления их смеси, пластифицированной в ск-СО₂. Флуоресцентная микроскопия (а, b) и сканирующая электронная микроскопия (с, d).

Исследование кинетики выхода ЭПК из микрочастиц в модели in vitro. Кинетика выхода ЭПК в модели *in vitro* из микрочастиц, полученных методом монолитизации, представлена на рисунке 2, а методом распыления – на рисунке 3. Как видно из этих рисунков, скорость выхода ЭПК, включенного в полимерные микрочастицы, весьма высокая. Для микрочастиц, содержащих 10% и 20% масс. ЭПК в смеси ЭПК/полимер, полученных методом монолитизации, количество вышедшего в течение первого часа ЭПК составляет 34% и 40% от начального, соответственно (рис. 2). В случае микрочастиц, полученных методом распыления (рис. 3) при давлении в камере 10 МПа, эти величины были 45% до 70% для образцов, содержащих 10% и 20% ЭПК в смеси ЭПК-полимер, соответственно, в то время как при давлении 20 МПа в супернатантах было обнаружено 38% (для образцов, содержащих 10% ЭПК) и 62% ЭПК (для образцов, содержащих 20% ЭПК).

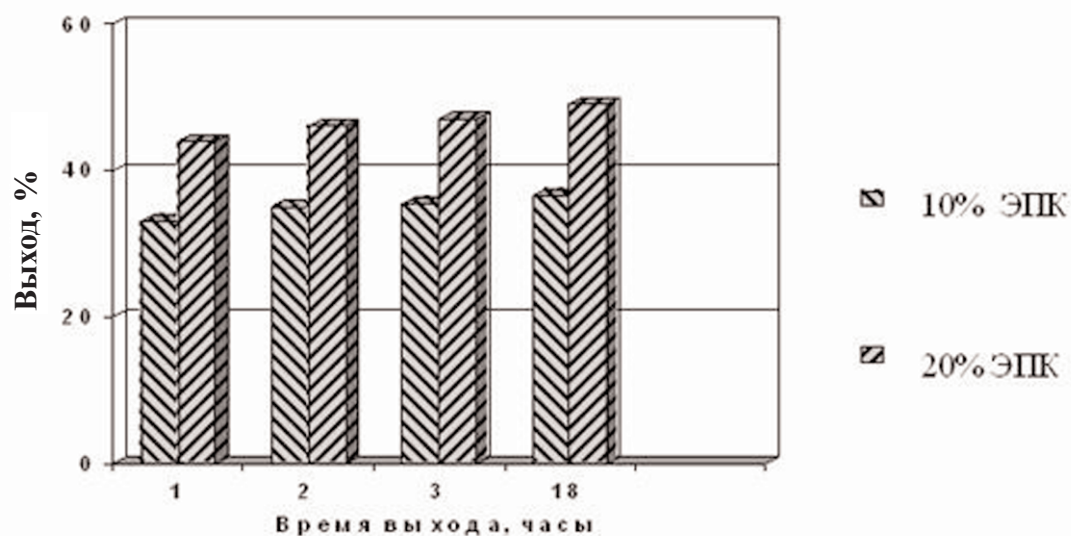


Рисунок 2.

Кинетика выхода ЭПК из микрочастиц, отличающихся по содержанию ЭПК (10 и 20%) и полученных методом монолитизации, с последующим криоизмельчением при давлении ск- CO_2 10 МПа.

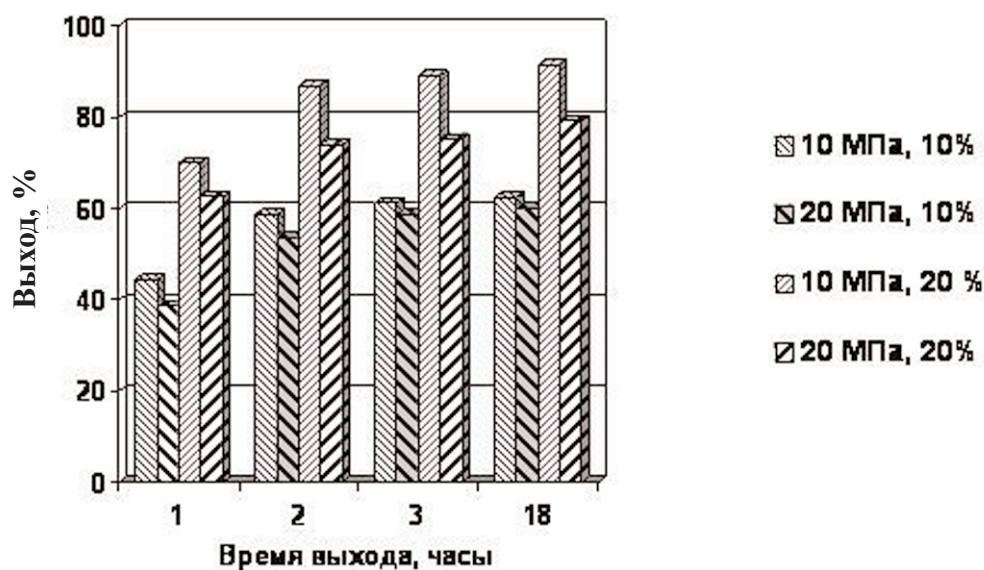


Рисунок 3.

Кинетика выхода ЭПК из микрочастиц, полученных методом распыления пластифицированных смесей порошков ПЛ + ЭПК (10 и 20 вес.%) при различных давлениях ск- CO_2 .

Высокая скорость выхода объясняется, главным образом, тем, что основными компонентами ЭПК являются низкомолекулярные биофлавоноиды, которые достаточно быстро высвобождаются из пористой полилактидной матрицы. Как видно, в случае использования метода распыления скорость выхода ЭПК из микрочастиц несколько выше, чем при методе монолитизации. Увеличение давления в камере со ск- CO_2 от 100 атм до 200 атм приводит к некоторому

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

замедлению выхода ЭПК из микрочастиц, что можно объяснить, вероятно, формированием более плотной (менее пористой) структуры микрочастиц. Таким образом, скорость высвобождения ЭПК из полимерных полилактидных частиц зависит от способа их получения и соотношения полимер/ЭПК.

Применение микрочастиц с включённым в них ЭПК для репарации тканей в модели in vivo. На следующем этапе, для изучения способности включенного в микрокапсулы ЭПК ускорять репарацию тканей, были проведены эксперименты *in vivo* на модели язвы желудка у крыс. Поскольку в случае микрокапсул, полученных методом монолитизации, выход ЭПК был несколько медленнее, чем для микрокапсул, полученных методом распыления, именно эти микрокапсулы были использованы в экспериментах *in vivo*. Степень репарации тканей определяли:

- 1) по изменению площади язвы;
- 2) с помощью гистологических исследований срезов образцов ткани, взятой в очаге язвообразования.

Исследование площади язвы показало, что на 3 сутки эксперимента в опытной группе животных площадь язв уменьшалась в 9 раз, а на 7 сутки – в 3 раза по сравнению с контрольной группой животных.

Клеточный состав подслизистого слоя желудка на 3 и 7 сутки после операции представлен на рисунке 4, а морфологические изменения подслизистого слоя желудка у крыс - на рисунках 5 и 6.

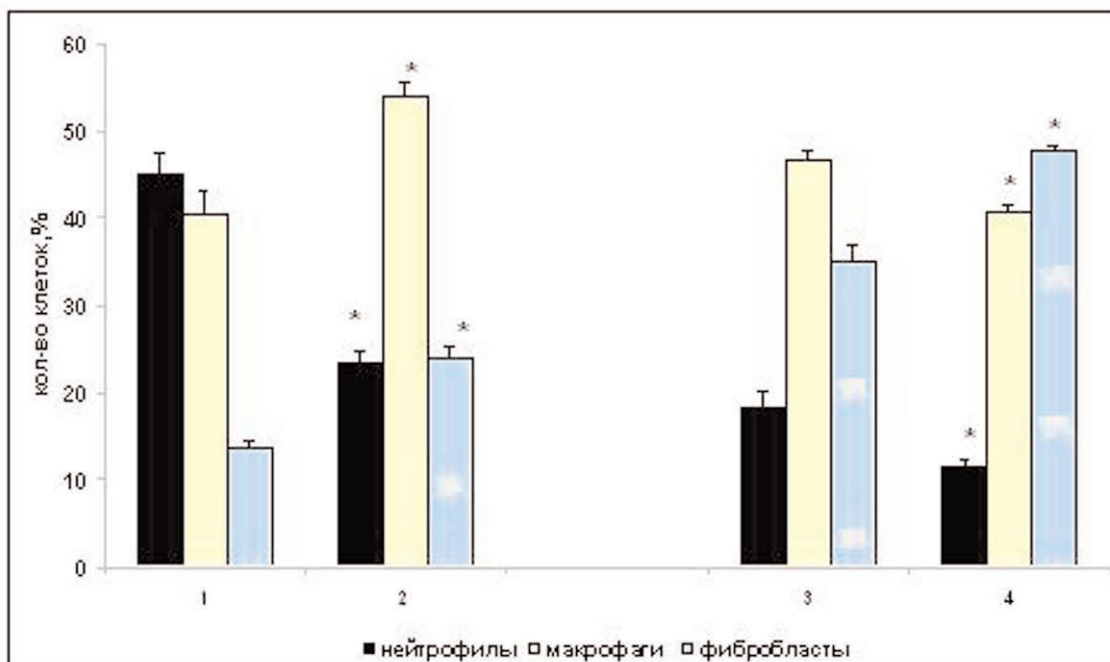


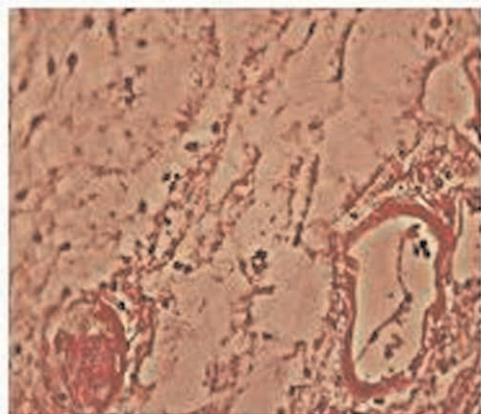
Рисунок 4.

Влияние ЭПК, включенного в микрочастицы на основе поли-D,L-лактида на процесс заживления язвы желудка у крыс. Клеточный состав подслизистого слоя желудка на 3 и 7 сутки после операции.

- 1 – клеточный состав образцов, взятых у животных контрольной группы (n=3), получавших пустые микрочастицы (3 сутки язвообразования).
- 2 – клеточный состав образцов, взятых у животных опытной группы (n=3), получавших микрочастицы с экстрактом календулы и подорожника (3 сутки язвообразования).
- 3 - клеточный состав образцов, контрольная группа животных (n=3), получавших пустые капсулы (7 сутки язвообразования).
- 4 - клеточный состав образцов, взятых у животных опытной группы (n=3), получавших капсулы с экстрактом календулы и подорожника (7 сутки язвообразования).

* - $p < 0,05$.

А



Б

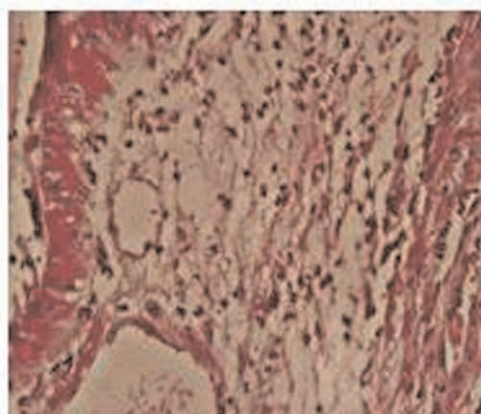


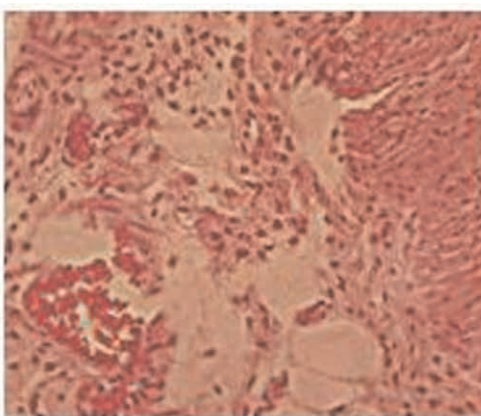
Рисунок 5.

Морфологические изменения подслизистого слоя желудка у крыс на 3 сутки эксперимента.

А - Контрольная группа (введение физ.раствора). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400.

Б - Опытная группа (введение микрочастиц с ЭПК). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400.

А



Б

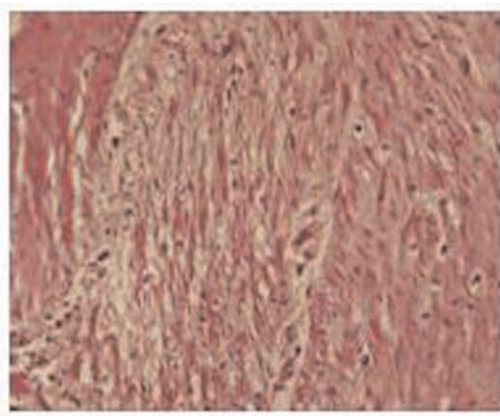


Рисунок 6.

Морфологические изменения подслизистого слоя желудка у крыс на 7 сутки эксперимента.

А - Контрольная группа (введение физ.раствора). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400.

Б - Опытная группа (введение микрочастиц с календулой и подорожником).

Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400.

Подслизистый слой у опытных животных отличался от такового в контрольной группе. Как видно из рисунков 4 и 5, на 3 сутки после операции у контрольных животных преобладали нейтрофилы ($45,1 \pm 2,4\%$) и макрофаги ($40,4 \pm 2,8\%$). В тоже время были выявлены только единичные фибробласты ($13,8 \pm 0,8\%$). У животных опытной группы наблюдали существенное увеличение количества фибробластов ($23,9 \pm 1,3\%$ по сравнению с контролем), что свидетельствовало об ускоренном созревании фибробластических предшественников, мигрирующих в зону повреждения слизистой желудка. В опытной группе содержание нейтрофилов и фибробластов было в 2 раз выше, чем в контроле. Следовательно, у животных опытной группы, получавших содержащие ЭПК микрочастицы, отмечено ускорение ранней фазы заживления вследствие усиленной миграции фибробластов в область регенерации и их последующей пролиферации.

Во второй серии экспериментов анализировали образцы срезов, взятых в очаге язвообразования на 7 день после операции (рис. 4 и 6). По сравнению с клеточным составом у соответствующих контрольных животных, в грануляционной ткани опытных животных преобладали четко ориентированные фибробластические элементы, около которых выявлялась рыхлая сеть межклеточного матрикса. Мы отмечали статистически достоверное ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой) снижение количества нейтрофилов (на 7%) и макрофагов (на 6%) и увеличение количества фибробластов (на 13%).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование ЭПК, включенного в поли-D,L-лактидные микрочастицы, при экспериментальной язве ускоряет пролиферацию фибробластов и формирование коллагеновых волокон, что способствует ускоренному процессу заживления повреждений слизистой желудка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Разработан процесс получения биodeградируемых микрочастиц 50-200 (мкм) на основе поли-D,L-лактида, содержащих ЭПК (смесь водорастворимых экстрактов подорожника и календулы) с использованием sc-CO_2 . При этом микрочастицы были получены двумя способами:

1) монолитизацией полимерного композита (аморфного алифатического полиэфира (поли-D, L-лактида) с последующим размолотом в микрочастицы (100-200 мкм) на ротационной мельнице с сухим льдом;

2) распылением пластифицированной порошковой смеси поли-D,L-лактида с водорастворимыми растительными экстрактами в ресивер атмосферного давления через сопло определенного профиля и диаметра с получением микрочастиц размером 50-200 мкм.

Исследована кинетика выхода ЭПК *in vitro* из микрочастиц, полученных этими способами. Показано, что она зависит как от способа их получения так и от давления диоксида углерода в системе и исходного соотношения полимер/ЭПК. При этом количество вышедшего в течение первого часа ЭПК можно варьировать в диапазоне 34-70% (масс) от исходного значения. Относительно высокая скорость выхода инкапсулированного экстракта (в случае метода распыления) определяется низкой молекулярной массой (M_w 16000) поли-D,L-лактида (а следовательно, и сравнительно небольшим временем биodeградации исходного полимера), а также высокопористой структурой полученных микрочастиц. Для увеличения времени высвобождения биоактивных компонентов из полимерных микрочастиц, получаемых этим методом, в дальнейшем планируется использование более высокомолекулярных полимеров с применением высокоинтенсивного акустического возбуждения с целью снижения вязкости пластифицированных в sc-CO_2 композиций.

Изучена возможность применения микрочастиц, содержащих ЭПК, для репарации тканей в модели язвы желудка крысы и показано, что микрокапсулы с ЭПК при экспериментальной язве желудка (в модели на крысах) ускоряет пролиферацию фибробластов и формирование коллагеновых волокон, что способствует ускорению процесса заживления повреждений слизистой желудка.

Работа выполнена при поддержке Научно-технической программы “Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний” на 2007-2009 г, финансируемой правительством г. Москвы, а также грантов Российского фонда фундаментальных исследований (Проекты №№ 06-02-08125 и 08-02-12119).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kompella U.B., Koushik K.* (2001) *Chrit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **18**, 173-199.
2. *Howdle M.S., Watson M.S., Whitaker M.J., Popov V.K., Davies M.C., Mandel F.S., Wang J.D., Shakesheff K.M.* (2001) *Chem. Commun.*, 109-110.
3. *Barry J.A., Silva M.M., Popov V.K., Shakesheff K.M., Howdle S.M.* (2006) *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **364**, 249-261.
4. *Антонов Е.Н., Богородский С.Э., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А., Руми Л.Д., Попов В.К.* (2008) *Сверхкритические флюиды: Теория и Практика*, **3**(1), 34-42.
5. *Okabe H.S., Roth J.L.A., Pfeiffer C.J.* (1971) *Amer. J. Digestive disease*, **16**, 277-284.
6. *Markvicheva E., Stashevskaya K., Strukova S., Prudchenko I., Rusanova A., Makarova A., Vasilieva T., Bepalova J., Grandfils Ch.* (2006) *J. Drug Del. SCI. TECH.*, **16**(4), 321-325.
7. www.puracbiomaterials.com
8. *Исагилов Р.Р., Костылев Д.А.* (2000) *Календула*, БГАУ, Уфа.
9. *Андреева Е.А.* (2005) *Лечение подорожником*, Рипол Классик, Москва.
10. *Бородина Т.Н., Руми Л.Д., Кунижев С.М., Сухоруков Г.Б., Ворожцов Г.Н., Фельдман Б.М., Русанова А.В., Васильева Т.В., Струкова С.М., Марквичева Е.А.* (2007) *Биомед. химия*, **53**(6), 662-671.
11. *Попов В.К., Краснов А.П., Воложин А.И., Хоудл С.М.* (2004) *Перспективные материалы*, **4**, 49-57.

Поступила: 30. 10. 2008.

BIODEGRADABLE POLYMER MICROPARTICLES WITH ENTRAPPED HERBAL
EXTRACTS: PREPARATION WITH SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE
AND USE FOR TISSUE REPAIR

*E.A. Markvicheva¹, E.N. Antonov², A.V. Popova², S.E. Bogorodsky², V.V. Likhareva¹, B.M. Feldman³,
S.M. Strukova⁴, V.K. Popov², L.D. Rumsh¹*

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, 117997 Russia; tel.: +7(495) 336-06-00; fax: +7(495) 335-10-11;
e-mail: lemark@mx.ibch.ru

²Institute of Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences, Troitsk, Moscow Region

³Federal State Unitary Enterprise "State Scientific Center "NIOPIK"
(Organic Intermediates and Dyes Institute)"

⁴Moscow State University, Biological Faculty

Biodegradable microparticles based on poly-D,L-lactide with entrapped mixture of herbal water-soluble extracts of *Plantago major* and *Calendula officinalis* were prepared. For preparation of these microparticles the previously developed method based on the usage of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) was proposed. Microparticles were obtained by two techniques: 1) by preparing porous polymer monolith containing entrapped mixture of herbal extracts, which was then reduced to fine microparticles (ca. 0.1 mm) by dry ice grinding (called here as "monolithisation technique") and 2) by spraying of this polymer/extracts mixture through a jet (spray technique).

In vitro release kinetic profile of herbal extract mixture was found to depend on the microparticle preparation technique, on the microparticle structure as well as on the initial ratio polymer/extracts (w/w). The microparticles were used for gastric ulcer treatment in a rat model. The extracts released from microparticles were found to accelerate tissue repair.

Key words: poly-D,L-lactide, Biodegradable microparticles, supercritical carbon dioxide, herbal extracts, *Plantago major*, *Calendula officinalis*, gastric ulcer.