

Исследование кинетики высвобождения гентамицина из биорезорбируемых полимерных матриц методом спектроскопии комбинационного рассеяния

Е. Н. Антонов, И. В. Вахрушев, С. А. Минаева, В. К. Попов

С помощью сверхкритических флюидных (СКФ) технологий получены пористые матрицы на основе полилактогликолида и гентамицина, предназначенные для адресной доставки бактерицидных лекарственных средств в ткани организма и обеспечения их пролонгированного действия. Методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) *in vitro* изучена кинетика высвобождения антибиотика из биорезорбируемых полимерных матриц (не содержащих следов токсичных органических растворителей) в раствор фосфатно-солевого буфера. Изучена кинетика выхода инкапсулированного в матрицы гентамицина в буферный раствор. Разработанная методика спектроскопии КР позволяет проводить оперативное определение скорости высвобождения различных биоактивных веществ из полимерных матриц в реальном масштабе времени.

Ключевые слова: полимерные матрицы, тканевая инженерия, эндопротезирование, сверхкритические флюиды (СКФ), инкапсуляция антибиотиков, кинетика высвобождения, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Porous scaffolds based on polylactic-co-glycolic acid and gentamicin for targeted and controlled antibacterial drugs delivery have been fabricated using supercritical fluid technologies. Antibiotic release kinetics from bioresorbable polymer matrixes (comprising no traces of toxic organic solvents) into phosphate-buffered solution (PBS) was studied *in vitro* by Raman spectroscopy. Kinetics of encapsulated gentamicin release into PBS was studied. Developed methodology for release kinetics study based on Raman spectroscopy is applicable for *in situ* analysis of various bioactives and polymers.

Keywords: polymer matrixes, controlled drug delivery, supercritical fluid technologies, encapsulated antibiotics, drug release kinetics, Raman spectroscopy.

Введение

В хирургии для предотвращения развития инфекций в области эндопротеза используют различные методы — от традиционной блокады бактерицидными препаратами (за счет периодических инъекций) до передовых средств их адресной и пролонгированной доставки на основе биорезорбируемых матриц-носителей [1]. При этом чрезвычайно важно обеспечивать требуемый уровень концентрации этих препаратов в соответствии с выбранной стратегией постоперационной терапии [2]. Включение гентамицина (антибиотика широкого спектра действия из группы аминогликозидов, подавляющего бактериальный синтез белков и высокоактивного по отношению к аэробным грамотрицательным бакте-

риям) в акриловый костный цемент на основе полиметилметакрилата (ПММА) — один из распространенных методов его адресной доставки в инфицированную зону [3, 4]. Недостатком систем на основе ПММА является их низкая биологическая совместимость (обусловленная присутствием остаточных токсичных мономеров), довольно часто приводящая к развитию воспалительных процессов [5] и биостабильность, требующая повторной операции по удалению имплантата в случаях его нежелательного присутствия в организме после выполнения им своих функций. Для устранения указанных недостатков активно разрабатываются системы адресной доставки на основе биodeградируемых полимеров, как биологического происхождения (коллаген [6, 7], хитозан [8, 9]), так и синтетических полимеров [10, 11].

Преимущество биодegradуемых материалов заключается в том, что пролонгированное воздействие фармпрепарата может быть достигнуто однократным введением системы в область возможного воспаления без последующего оперативного извлечения имплантата. Скорость высвобождения биоактивных компонентов из полимерной матрицы на начальном этапе определяется скоростью их диффузии с поверхности имплантата. По мере биодegradации полимера начнется их выход из внутренних областей вплоть до полного растворения исходного материала матрицы-носителя в организме. Кинетика процесса будет определяться специфическими свойствами самих лекарственных субстанций, химической структурой, геометрией, пористостью и морфологией полимерной матрицы, а также локальными свойствами окружающей имплантат среды. Оценки скоростей высвобождения биоактивных соединений из матриц-носителей, сделанные на основе имеющихся аналогов, могут дать только очень приблизительные значения и для каждой конкретной системы доставки необходимо проведение соответствующих исследований.

Цель настоящей работы — изучение методом спектроскопии КР кинетики высвобождения *in vitro* гентамицина в раствор фосфатно-солевого буфера из пористых биорезорбируемых полилактогликолидных матриц, полученных с помощью сверхкритического диоксида углерода (ск- CO_2).

Материалы и методы

Для получения биоактивных полимерных матриц использовали мелкодисперсные порошки гентамицина с размером частиц 5 – 100 мкм (ОАО “Синтез”, Курган, Россия) и полилактогликолида “PURASORB” PDLG5002 (50% звеньев молочной кислоты и 50% гликолевой кислоты, приведенная вязкость 0,2 дл/г) компании PURAC Biochem bv (Нидерланды). Диоксид углерода (марки ОСЧ, ГОСТ 8050-85) производства Балашихинского кислородного завода применяли без какой-либо дополнительной очистки.

Пористые полимерные матрицы, содержащие гентамицин, формировали с помощью СКФ монолитизации смеси исходных компонентов с последующим вспениванием полилактогликолида при сбросе давления диоксида углерода. Эти процессы базируются на хорошо известных явлениях снижения температуры стеклования T_g и пластификации аморфных или частично-кристаллических полимеров при их взаимодействии с СКФ, в качестве которого обычно используется сверхкритический диоксид углерода (ск- CO_2) [12]. Установка для получения

образцов биоактивных матриц детально описана в [13]. Смесь порошков полимера (95 вес.%) и гентамицина (5 вес.%) загружали в тефлоновую пресс-форму, которую помещали в камеру высокого давления, уплотняли, продували и заполняли CO_2 . Обработку проводили при давлении диоксида углерода 10 МПа и температуре 40°C в течение 1 ч. Затем, в течение 15 мин давление снижали до атмосферного и далее пресс-форму выдерживали 12 ч, для полного удаления CO_2 из полученных образцов и их окончательного отверждения. В результате формировалась твердая полимерная структура заданной формы, пористости и размера, с распределенным по ее поверхности и объему гентамицином.

Для изучения кинетики высвобождения гентамицина из полученных матриц их помещали в стеклянные емкости объемом 4 мл, в которые добавляли по 3 мл раствора фосфатно-солевого буфера с pH = 7,4 (ПанЭко, Москва). Скорость выхода гентамицина в буферный раствор при температуре 37°C определяли методом КР-спектроскопии по изменению во времени интегральной интенсивности аналитических полос антибиотика.

Измерения проводили на дисперсионном спектрометре комбинационного рассеяния Almega XR (Thermo Scientific, США). Длина волны возбуждающего лазера 785 нм. Длительность регистрации спектра, при которой достигалось оптимальное сочетание сигнал-шум, составляла 10 мин.

Морфологию поверхности и внутренней структуры изучали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) на микроскопе LEO 1450.

Результаты и обсуждение

Для выбора аналитических полос КР и определения оптимальных параметров процесса проведения кинетических измерений отдельно были получены КР-спектры исходного порошкообразного гентамицина, раствора фосфатно-солевого буфера с pH = 7,4 и раствора гентамицина в фосфатно-солевом буфере (рис. 1).

На рис. 2 представлены структуры порошка исходного гентамицина и его механической смеси с мелкодисперсным порошком полилактогликолида. Частицы гентамицина имеют практически сферическую форму с диаметром от 5 до 50 мкм, а полимер состоит из частиц нерегулярной формы размером до 100 мкм.

На рис. 3 показан общий вид полученных полимерных матриц, содержащих гентамицин.

Пористость образцов определяли по формуле $\Omega = 1 - m/m_0$, где m — масса пористой матрицы, а

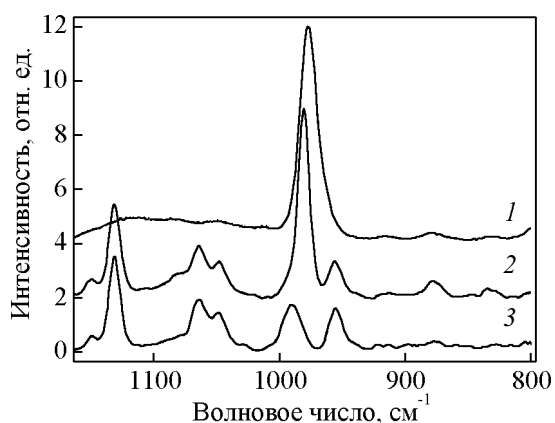


Рис. 1. КР-спектры: 1 – исходного порошка гентамицина, 2 – раствора гентамицина в буферном растворе, 3 – фосфатно-солевого буфера.

m_0 — масса монолитного (исходного) полимера равного объема плотностью $1,21 \text{ г/см}^3$. Характерная пористость экспериментальных образцов биоактивных матриц (определяемая соотношением объема пресс-формы и массы загружаемой в нее смеси

исходных компонентов, температурой и давлением диоксида углерода, а также условиями его сброса) составила порядка 50 – 55 об. %.

Для определения количества вышедшего в буферный раствор гентамицина методом КР-спектроскопии была выбрана аналитическая полоса с максимумом в районе 978 см^{-1} . Эта полоса обусловлена валентным колебанием сульфатной группы гентамицина $\nu_1(\text{SO}_4^{2-})$ [14]. Она слабо маскируется спектром буферного раствора (рис. 1).

Так как стекло имеет свой КР-спектр, было подобрано оптимальное положение емкости, при котором вклад стекла в интегральный спектр минимален, а от буферного раствора — максимален.

Для количественной калибровки были приготовлены растворы гентамицина в фосфатно-солевом буфере с концентрациями 4; 2; 1; 0,5 мг/мл. Для каждого из них был получен индивидуальный КР-спектр и измерена интегральная интенсивность пика гентамицина 978 см^{-1} . Полученные данные в дальнейшем использовали для построения кривой кинетики выхода гентамицина из полилактогликолидной матрицы.

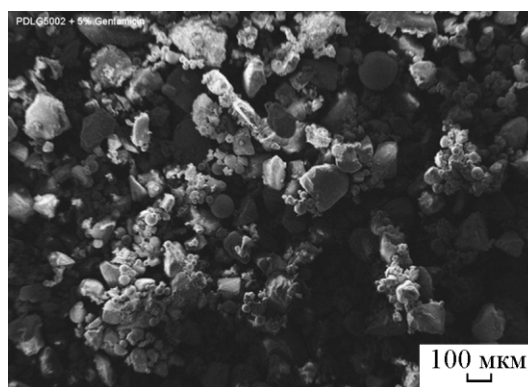
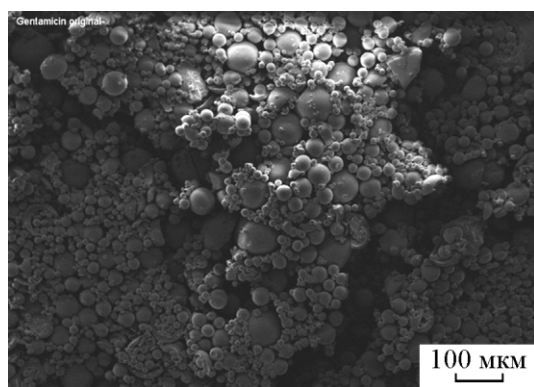


Рис. 2. РЭМ исходного гентамицина (а) и его смеси с мелкодисперсным полилактогликолидом (б).

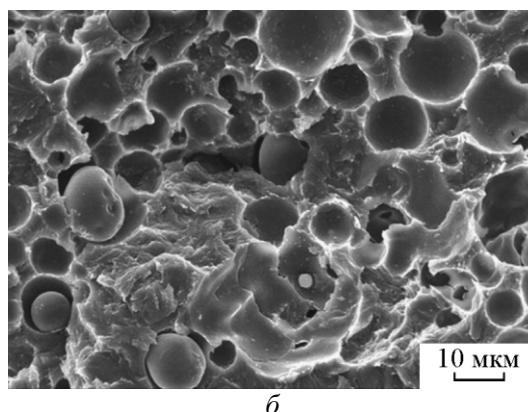
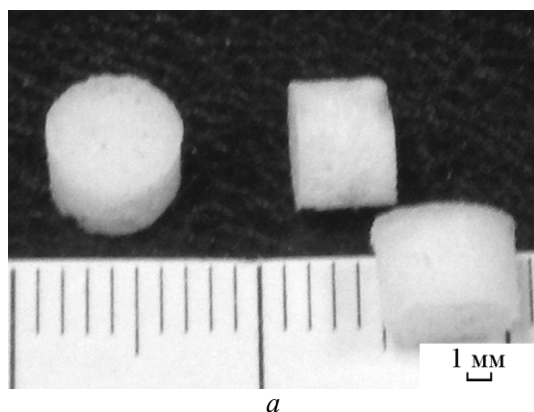


Рис. 3. Образцы полилактогликолидных матриц с гентамицином (деление линейки – 1 мм) (а) и их микроструктура (б).

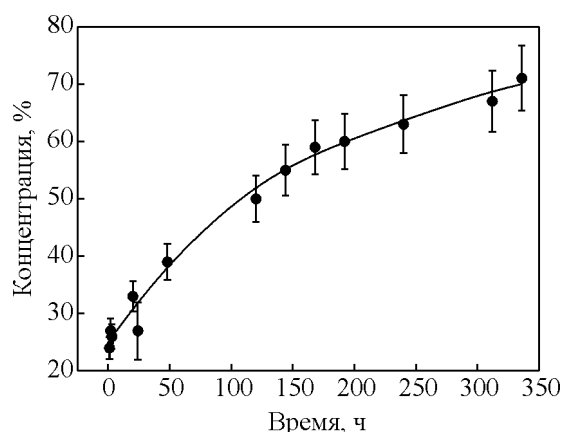


Рис. 4. Кинетика высвобождения гентамицина из полимерной матрицы в буферный раствор.

Для этого КР-спектры растворов регистрировали через определенные промежутки времени после помещения образцов в фосфатно-солевой буфер. Измеряли интегральную интенсивность аналитической полосы гентамицина, и, соответственно, определяли его концентрацию в растворе (рис. 4). За 100% была принята концентрация, при условии выхода в раствор всего количества гентамицина, инкапсулированного в полимерный образец.

За первый час из образцов выходит до 25%, а за первые двое суток до 40% инкапсулированного в матрицы гентамицина. На пятые сутки, после суммарного выхода 50% гентамицина, кинетика его высвобождения становится практически линейной, вплоть до 14 суток (максимальное время наблюдения), когда величина его общего выхода из матрицы-носителя составила 70%.

Выводы

1. Методом СКФ монолитизации смеси порошков гентамицина и полилактогликолида получены бактерицидные пористые матрицы для адресной и пролонгированной доставки лекарственных веществ.

2. Изучена кинетика высвобождения гентамицина из биорезорбируемых полимерных матриц в раствор фосфатно-солевого буфера методом спектроскопии комбинационного рассеяния *in vitro*.

3. Разработана универсальная методика на основе КР-спектроскопии, которая позволяет проводить оперативное определение скорости высвобождения биоактивных веществ из полимерных матриц в реальном масштабе времени.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№11-02-12114) и Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 16.513.11.3019)

Литература

1. Vert M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2009, v. 20, p. 437 – 446.
2. Roberts J.A., Lipman J. Antibacterial dosing in intensive care: pharmacokinetics, degree of disease and pharmacodynamics of sepsis. *Clin. Pharmacokinet.*, 2006, v. 45, p. 755 – 773.
3. Wahlig H., Dingeldein E., Bergmann R., Reuss K. The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1978, v. 60-B, p. 270 – 275.
4. Hill J., Klenerman L., Trustey S., Blowers R. Diffusion of antibiotics from acrylic bone-cement in vitro. *J. Bone J. Surg.*, 1977, v. 59B, p. 197 – 199.
5. Wimhurst J.A., Brooks R.A., Rushton N. Inflammatory responses of human primary macrophages to particulate bone cements in vitro. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2001, v. 83-B, p. 278 – 282.
6. Светухин А.М., Блатун Л.А., Вишневский А.А. и др. Профилактика госпитальной инфекции при реконструктивно-восстановительных операциях с помощью пролонгированной формы гентамицина на коллагеновой основе. *Клиническая фармакология и терапия*, 1998, т. 7, № 2, с. 30 – 33.
7. Leyh R.G., Bartels C., Sievers H.-H., Adjuvant treatment of deep sternal wound infection with collagenous gentamycin. *Ann. Thorac. Surg.*, 1999, v. 68, p. 1648 – 1651.
8. Aimin C., Chunlin H., Juliang B. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1999, v. 366, p. 239 – 247.
9. Wedmore I., McManus J.G., Pusateri A.E., Holcomb J.B. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J. Trauma*. 2006, v. 60, p. 655 – 658.
10. Garvin K.L., Miyano J.A., Robinson D. Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *J. Bone Joint. Surg. Am.*, 1994, v. 76, p. 1500 – 1506.
11. Prior S., Gamazo C., Irache J.M., Merkle H.P., Gander B. Gentamicin encapsulation in PLA:PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *Int. J. of Pharmaceutics*, 2000, v. 196, p. 115 – 125.
12. Гумеров Ф.М., Сабирзянов А.Н., Гумерова Г.И. Суб- и сверхкритические флюиды в процессах переработки полимеров. Казань: Фэн, 2000, 328 с.
13. Попов В.К., Краснов А.П., Воложин А.И., Хоудл С.М. Новые биоактивные композиты для регенерации костных тканей. *Перспективные материалы*, 2004, № 4, с. 49 – 57.
14. Aghatabay N.M., Mahmiani Y., Cevik H., Guzin F., Dulger B. Synthesis, FT-Raman, FT-IR, NMR spectroscopic characterization and antimicrobial activity of new mixed aza-oxo-thia macrocyclic compounds. *Structural Chemistry*, 2008, v. 19, p. 833 – 842.

Статья поступила в редакцию 24.05.2012 г.

Антонов Евгений Николаевич — Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, (г. Троицк, Москва), кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области медицинской физики, сверхкритических флюидных технологий. E-mail: e_n_antonov@mail.ru.

Вахрушев Игорь Викторович — Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН (г. Москва), кандидат биологических наук, младший научный сотрудник. Специалист в области клеточной биологии и тканевой инженерии. E-mail: vakhrunya@gmail.com.

Минаева Светлана Анатольевна — Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН (г. Троицк, Москва), младший научный сотрудник. Специалист в области биофизики и спектроскопии комбинационного рассеяния. Ведет переписку с редакцией. E-mail: minaeva.svetlana@gmail.com.

Попов Владимир Карпович — Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, (г. Троицк, Москва), кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией. Специалист в области сверхкритических флюидных технологий, нано- и микроструктур, биофизики. E-mail: popov@laser.ru.