

УДК 541.64:577.1:615

Т.Л. ЮРКШТОВИЧ, Н.В. ГОЛУБ*, Н.К. ЮРКШТОВИЧ, П.М. БЫЧКОВСКИЙ, Р.И. КОСТЕРОВА, В.А. АЛИНОВСКАЯ

Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Беларусь, Минск, 220030

e-mail: natali.golub@tut.by

Микрогели фосфатов крахмала для контролируемого выделения биомакромолекул

В системе ортофосфорная кислота—мочевина получены гелеобразующие фосфаты крахмала с содержанием фосфорнокислотных групп 2,1—3,8 ммоль/г. В опытах *in vitro* изучена скорость деградации фосфатов крахмала в буферном растворе в отсутствие и в присутствии α -амилазы. Показано, что фосфаты крахмала восприимчивы к ферментативной деградации, однако по мере роста количества фосфатных групп скорость биодеструкции постепенно понижается. Продемонстрирована принципиальная возможность использования микрогелей со средними размерами 7,8—60,1 мкм для создания систем с контролируемым выделением интерферон-альфа-2b.

Ключевые слова: микрогели, пролонгированная форма интерферон-альфа-2b, скорость высвобождения рекомбинантного интерферона-альфа 2-b, фосфат крахмала.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-3-67-77

Гидрогели микро- и наноразмеров представляют большой интерес в качестве средств доставки не только низкомолекулярных соединений, но и биополимеров — белков, пептидов, генов, нуклеиновых кислот и др. [1—4]. Известно [5, 6], что включение биомакромолекул в состав микрогелей изменяет их фармакокинетический профиль, параметры эффективности и безопасности, обеспечивает пролонгированное действие и снижение количества побочных эффектов.

Микрогели представляют собой пористые хорошо набухающие микроразмерные частицы, пространственная сетка которых состоит из попеременно-сшитых макромолекул. Для получения микрогелей используют природные или синтетические полимеры, медико-биологические свойства

которых удовлетворяют жестким требованиям фармакологии: низкая токсичность, биосовместимость, способность к биodeградации в живом организме без образования токсичных продуктов распада и т.д.

Среди производных полисахаридов особое внимание как компонент систем доставки лекарств привлекает фосфат крахмала (ФК), получаемый путем этерификации ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины. ФК отвечает критериям биосовместимости и биорезорбируемости, характеризуется низким уровнем токсичности, обладает собственной противоопухолевой активностью [7]. Наличие в составе микрогелей ФК функционально активных групп позволяет включать в них биомакромолекулы основного и цвиттерийонного

Юркштович Татьяна Лукинична, Голуб Наталья Васильевна, Юркштович Николай Константинович, Бычковский Павел Михайлович, Костерова Раиса Ивановна, Алиновская Валентина Александровна.

Список сокращений: ГПЗ — глюкопиранозное звено; Е — международная единица активности; ФБР — фосфатный буферный раствор; ФК — фосфат крахмала.

* Автор для переписки.

характера не только путем диффузии в гидрофильную сетку, но и посредством образования полиэлектролитных комплексов. Получение пролонгированных форм биомакромолекул на основе разрабатываемых микрогелей ФК исключает использование токсичных низкомолекулярных веществ (сшивающих агентов) и растворителей, что упрощает и удешевляет технологию получения таких форм и снижает вероятность инактивации белка.

Несмотря на это, сведения об использовании гидрогелей на основе ФК для создания пролонгированных лекарственных средств в литературе отсутствуют.

Целью данной работы являлось получение и изучение свойств микрогелей ФК, оценка возможности создания на их основе систем с контролируемым выделением биомакромолекул.

В качестве модельного лекарственного вещества выбран интерферон-альфа-2b, представляющий собой белок с молекулярной массой 18,5 кДа, имеющий доступные для связывания с ФК аминокислотные группы. Известно [8], что в режиме моно- или комбинированной терапии интерферон-альфа-2b эффективен для лечения онкологических (хронического миелоидного лейкоза, множественной миеломы, злокачественной меланомы и др.) и вирусных (хронических вирусных гепатитов, герпетических поражений и ОРВИ) заболеваний.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы. В качестве исходных материалов и реагентов использованы картофельный крахмал (содержание амилозы 23,8%), ортофосфорная кислота ($\rho_4^{20} = 1,698$ г/мл; концентрация (С) = 85,4%), мочевины марки «х.ч.» (ЗАО «Вектон», Россия), рекомбинантный интерферон-альфа-2b (получен в Республиканском научно-практическом центре гематологии и трансфузиологии МЗ РБ). Фермент панкреатическая α -амилаза человека был изготовлен Sigma-Aldrich Corp. (США); использовали соли производства ОАО «Белреахим» (Беларусь) и «Реахим» (Россия).

Получение микрогелей фосфатов крахмала. Образцы ФК были получены путем этерификации крахмала смесью ортофосфорной кислоты и мочевины при мольном соотношении ГПЗ— H_3PO_4 — $(\text{NH}_2)_2\text{CO} = 1,0 : (0,4—0,8) : 4,0$ в течение 4 ч при температуре 125° и давлении 0,08—0,20 атм [9, 10].

В образцах ФК определяли содержание фосфора (C_P , ммоль/г) реакцией с молибдатом аммония [11] и азота (C_N , ммоль/г) методом Кьельдаля [12]. ИК-спектры образцов регистрировали при комнат-

ной температуре на инфракрасном спектрофотометре Thermo Nicolet FT-IR Nexus. Препарирование образцов осуществляли методом прессования с бромидом калия.

Для получения микрогелей 0,1% суспензии ФК обрабатывали ультразвуком при следующих условиях процесса: 1) мощность 1 Вт/см²; температура около 40±5°С; время 45 мин; 2) мощность 30 Вт/см²; температура около 0±2°С; время 15 мин;

Определение размера частиц. Морфологию структурных элементов, составляющих частицы модифицированного крахмала, изучали с использованием электронного микроскопа LEO 1420 (Германия). Размер и объемное содержание частиц разного размера в суспензии оценивали с помощью анализатора размера частиц Master sizer 3000 (Великобритания).

Определение степени набухания. Степень набухания (Q , г/г) определяли гравиметрически по разности массы набухшего и высушенного образцов [10].

Определение потери массы ФК в буферном растворе в присутствии и в отсутствие α -амилазы. Потерю массы нативного крахмала и микрогелей ФК (средний диаметр 600 мкм) в условиях *in vitro* определяли гравиметрически [13, 14]. Для этого навеску образца (0,5 г) помещали в 50 мл фосфатного буферного раствора (ФБР), рН 6,8, содержащего 11,7 мг хлорида натрия. Концентрация α -амилазы в ФБР составляла 0,01% или 1,2 Е/мл. Значение рН, измеренное до и после хранения образцов в растворах, оставалось постоянным и равным 6,8.

После инкубации в течение определенного времени в ФБР образцы количественно отделяли от раствора на стеклянном фильтре (размер пор 40 мкм), промывали водой для удаления фосфатов натрия и калия и сушили при температуре 50° под вакуумом. Потерю массы образца (Δm , %) определяли по формуле:

$$\Delta m = \frac{m_{\text{исх}} - m}{m_{\text{исх}}} \cdot 100, \%,$$

где $m_{\text{исх}}$ и m — масса сухих образцов до и после нахождения в фосфатном буферном растворе в течение указанного времени.

Определение восстанавливающей способности гидролизатов крахмала и фосфата крахмала. Восстанавливающую способность данных соединений, в состав которых входят моно-, ди- и олигосахариды, определяли иодометрическим методом [15] и выражали как число гидролизованых α -1,4-гликозидных связей (Σn), соответствующую

щее по восстанавливающей способности количества молей глюкозы, в пересчете на 1 г образца:

$$\Sigma n = \frac{(V_k - V_o) \cdot T \cdot V}{V_1 \cdot m},$$

где V_k — объем раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, использованный при титровании раствора иода в контрольном опыте, мл; V_o — объем раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, использованный при титровании избытка раствора иода, мл; T — титр раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, н.; V и V_1 — общий объем раствора и объем отобранной аликвоты, соответственно, мл; m — масса образца, г.

Рентгенофазовый анализ образцов проводили на рентгеновском дифрактометре HZG-4A (Carl Zeiss, Jena) с использованием излучения CuK_{α} , Ni-фильтра и поточечной записи. Препарирование образцов осуществляли методом холодного прессования полимера в виде монолитных круглых таблеток.

Получение интерполиэлектrolитного комплекса ФК и интерферон-альфа-2b. Интерполиэлектrolитные комплексы ФК с содержанием интерферон-альфа-2b 82 мкг/мг получали путем набухания 0,01 г образцов ФК в 1 мл раствора интерферона ($2 \cdot 10^8$ Е/мл) и последующего лиофильного высушивания.

Определение степени высвобождения интерферон-альфа-2b из микрочастиц. Нагруженные белком микрочастицы ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды до достижения 1%-ной концентрации ФК и помещали в стакан, содержащий 9 мл фосфатного буферного раствора (рН 6,8). Высвобождение интерферон-альфа-2b из микрочастиц в ФБР изучали при температуре $37 \pm 0,5^\circ$ и скорости перемешивания 300 об/мин. Через заданные интервалы времени (30 мин, 1 ч, 3, 6, и 24 ч)

отбирали по 0,3 мл смеси и одновременно в стакан добавляли 0,3 мл ФБР для поддержания постоянного объема. Для отделения наиболее мелких микрочастиц, находящихся в ФБР после выхода белка в раствор, отобранную смесь (0,3 мл) центрифугировали (60 мин, 10000 г). Затем из полученного супернатанта вновь отбирали аликвоту (0,1 мл) и определяли количество десорбированного белка в нем методом Брэдфорд [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность систем адресной доставки зависит от свойств полимера-носителя, определяющих кинетику высвобождения лекарства из фазы микрогелей.

В табл. 1 приведены результаты изменения функционального состава фосфатов крахмала в зависимости от соотношения компонентов в реакционной смеси. Видно, что с ростом концентрации H_3PO_4 увеличивается содержание фосфора и азота, входящих в состав фосфатных и карбаматных групп. Наличие в ФК фосфорсодержащих и карбаматных групп подтверждено методом ИК-спектроскопии [10]. В ИК-спектрах всех модифицированных образцов крахмала присутствуют полосы поглощения в области $950\text{—}1050\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания групп C—O—P , P—O—P и P—O—N) и $1210\text{—}1240\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания группы P=O), что свидетельствует о наличии фосфатных групп; регистрируется также интенсивная полоса поглощения вблизи 1710 см^{-1} , обусловленная асимметричными валентными колебаниями связей C=O в карбаматных группах.

Как видно из табл. 1, по мере роста концентрации H_3PO_4 в составе этерифицирующей смеси в

Таблица 1
Table 1

Условия синтеза и физико-химические свойства фосфатов крахмала Condition for synthesis and physicochemical properties of starch phosphates

Образец Sample	Мольное соотношение ГПЗ— H_3PO_4 — $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ Molar ratio of GPC— H_3PO_4 — $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	Выход гель-фракции, % Yield of gel fraction, %	Q , г/г Q , g/g	Химический состав	
				C_P , ммоль/г C_P , mmol/g	C_N , ммоль/г C_N , mmol/g
ФК ₁ SP ₁	1:0,4:4,0	78,3	29,5	2,4	1,1
ФК ₂ SP ₂	1:0,6:4,0	96,7	23,8	3,4	1,2
ФК ₃ SP ₃	1:0,8:4,0	98,3	14,4	3,8	1,4

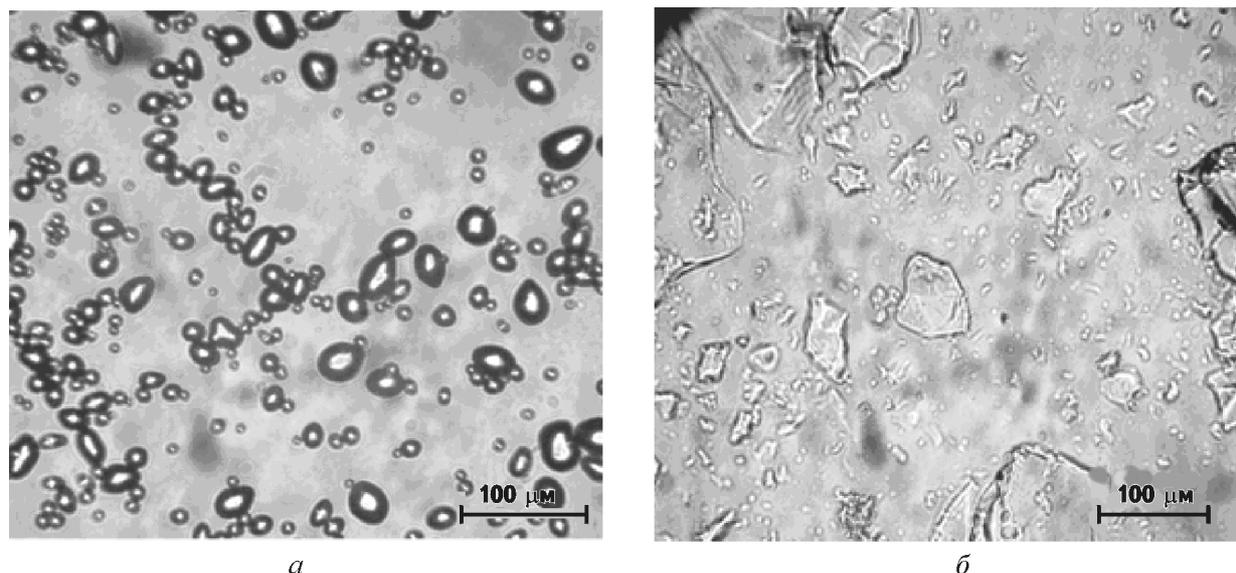


Рис. 1. Микрофотографии крахмала (а) и фосфатов крахмала (ФК₂, см. табл. 1) (б), набухших в воде

Fig. 1. A microphotograph of water-swollen starch (а) and starch phosphates (SP₂, Table 1) (б)

образцах ФК увеличивается содержание фосфатных групп и уменьшается их равновесная степень набухания. Набухшие в воде микрогели ФК представляют собой прозрачные без видимых уплотнений многогранники различных размеров и формы (рис. 1). Самые мелкие частицы (1—3 мкм) имеют близкую к сферической форму, однако присутствуют и частицы в форме полосок, многоугольников, а также массивные ассоциаты и конгломераты, являющиеся, вероятнее всего, результатом агрегации двух, трех или значительно большего числа сферических частиц.

Типичное распределение набухших частиц по размерам, полученное с использованием метода рассеяния лазерного излучения, приведено на рис. 2. Видно (см. рис. 2, а), что все образцы независимо от условий фосфорилирования характеризуются асимметричным распределением частиц; при этом объемное содержание микрогелей с размером > 300 мкм постепенно растет при переходе от ФК с низкой степенью набухания (для ФК₃ этот показатель составляет 45%) к гидрогелям с более высокой степенью набухания (для ФК₂ эта величина равна 55%, для ФК₁ — 70%). Согласно литературным данным [17], наличие агрегатов с размерами ≥ 250 мкм в инъекционной системе адресной доставки лекарств нежелательно из-за риска эмболии сосудов за счет попадания крупных частиц в капилляры. В связи с этим образовавшиеся агрегаты разрушались путем УЗ-обработки 0,1%-ных суспензий микрогелей ФК при двух режимах мощности ульт-

развука: 1 и 30 Вт/см². Как показали результаты исследования (см. рис. 2, б и с), средний размер частиц образцов ФК после УЗ-воздействия значительно уменьшается и составляет для первого режима 50,4—60,1 мкм (см. рис. 2, с), для второго — 7,8—13,5 мкм (см. рис. 2, б). Такие микрочастицы ФК могут быть применены для получения инъекционных систем с контролируемым выделением биомакромолекул.

Степень набухания микрогелей относится к наиболее важным характеристикам систем контролируемой доставки биомакромолекул, поскольку этот показатель определяет не только кинетику деградации гидрогелей, но и приемлемую скорость подачи лекарства в пораженный орган [18]. Из табл. 1 следует, что варьирование количества ортофосфорной кислоты в фосфорилирующей смеси позволяет получить гидрогели с содержанием фосфатных групп 2,4—3,8 ммоль/г и одновременно с различной степенью набухания (29,5—14,4 г/г). Согласно литературным данным [10], уменьшение степени набухания по мере роста содержания фосфорсодержащих групп связано с образованием в продуктах реакции не только монозамещенных, но и двузамещенных эфиров, которые выступают в качестве межмолекулярных сшивок (рис. 3).

Наличие в составе ФК гидролитически и ферментативно разрушаемых связей (в группах С—О—Р и Р—О—Р, α-1,4-гликозидные связи) определяет возможность протекания процесса биodeградации гидрогелей согласно механизмам

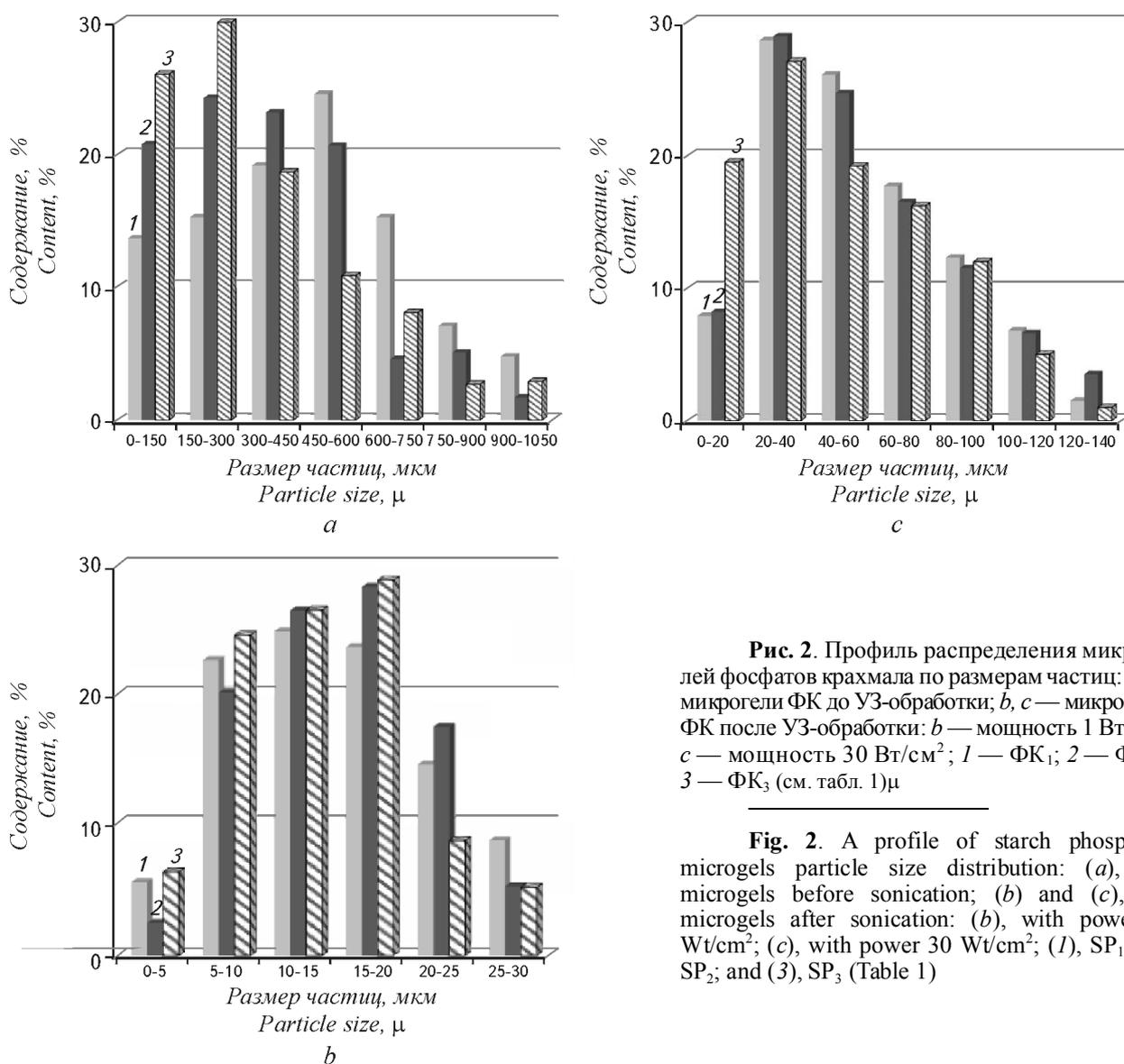


Рис. 2. Профиль распределения микрогелей фосфатов крахмала по размерам частиц: *a* — микрогели ФК до УЗ-обработки; *b, c* — микрогели ФК после УЗ-обработки: *b* — мощность 1 Вт/см²; *c* — мощность 30 Вт/см²; 1 — ФК₁; 2 — ФК₂; 3 — ФК₃ (см. табл. 1)μ

Fig. 2. A profile of starch phosphate microgels particle size distribution: (*a*), SP microgels before sonication; (*b*) and (*c*), SP microgels after sonication: (*b*), with power 1 Wt/cm²; (*c*), with power 30 Wt/cm²; (1), SP₁; (2), SP₂; and (3), SP₃ (Table 1)

ферментативного и химического гидролиза. Для выяснения влияния каждого из видов деструкции полимерной сетки на глубину биодegradации ФК в модели *in vitro* использовали методы гравиметрии, определения восстанавливающей способности гидролизатов, сканирующей электронной микроскопии, элементного анализа и рентгенофазового анализа. Проведено сопоставление степени дегradации микрогелей ФК и зерен картофельного крахмала.

Выдерживание крахмала в ФБР в течение 1—21 сут сопровождалось потерей 0,5—2,6% массы образцов, что связано исключительно с проникновением мелкодисперсных частиц образцов через поры фильтра при разделении твердой фазы и раствора. Введение в ФБР 0,01% α-амилазы при-

водит к увеличению потери массы крахмала за счет ферментативного гидролиза.

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что в отличие от нативного крахмала образцы ФК чувствительны к неферментативной деструкции: по мере увеличения срока хранения в ФБР возрастают потери массы микрогелей, степень набухания, уменьшается содержание фосфора. В результате растет длина отрезка макромолекул между двумя сшивками, уменьшается компактность полимерной сетки.

Подтверждением изменения структуры гидрогелей ФК в результате неферментативной деструкции полимерной сетки являются данные электронной микроскопии (рис. 4). Видно, что выдерживание образцов ФК в ФБР в течение 1 сут приво-

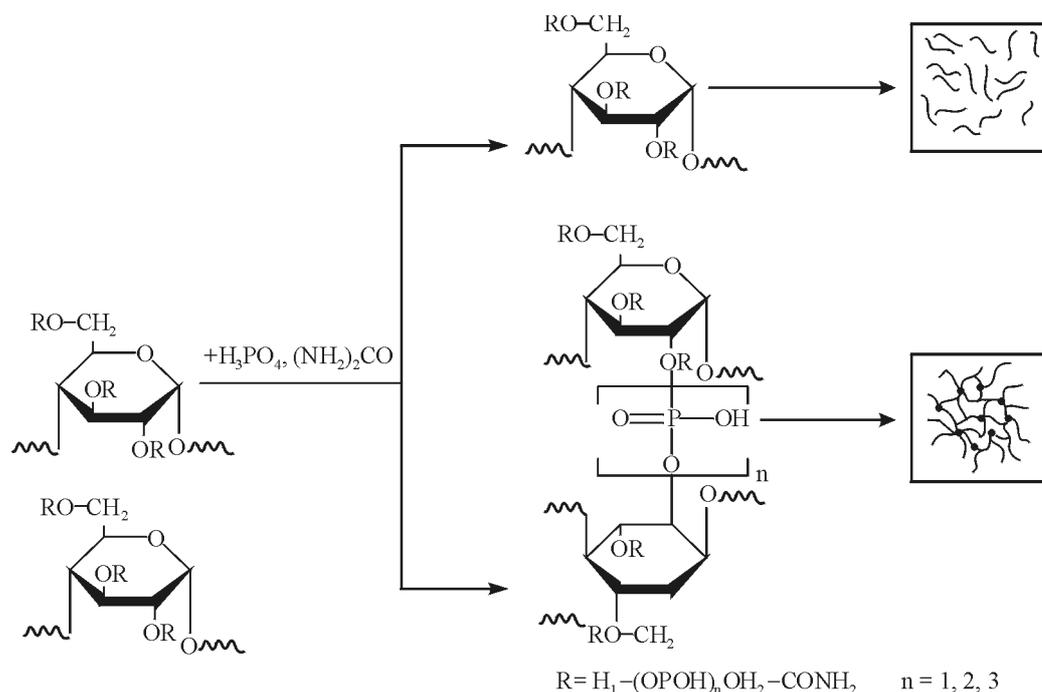


Рис. 3. Схема этерификации крахмала в системе ортофосфорная кислота—мочевина

Fig. 3. A scheme for starch etherification in orthophosphoric acid—urea system

дит к увеличению размеров пор полимерной сетки, утончению ее стенок. К 7-м суткам наблюдается объемное разрушение частиц на более мелкие фрагменты (микро- и наночастицы). Вероятно, под воздействием ФБР (ионная сила 0,4) нарушается система водородных связей, связывающая более мелкие частицы в конгломераты и агрегаты, что приводит к их распаду.

В то же время, наблюдаемые изменения надмолекулярной структуры ФК при хранении в буферном растворе нельзя однозначно связать с протеканием гидролиза двузамещенных эфиров, а также расщеплением фосфатных связей (P—O—P) с выделением ортофосфорной кислоты. Нами установлено, что при выдерживании ФК в ФБР имеет место вымывание фосфорилированных декстринов, олиго- и моносахаридов, которые образовались ранее на стадии фосфорилирования крахмала и находились внутри сетки микрогелей. Присутствие этих веществ было подтверждено окрашиванием надосадочного раствора в красно-бурый цвет при добавлении иода. Таким образом, приведенные факты свидетельствуют о том, что белок может высвобождаться за счет объемного разрушения полимерной сетки, причем не только в виде отдельных макромолекул, но также в форме комплексов с фосфатами декстрина, олиго- и моносахаридов.

При добавлении α -амилазы в фосфатный буферный раствор наблюдается более существенная потеря массы образцов ФК, уменьшение содержания в них фосфора, увеличение степени их набухания, а также гидролиз α -1,4-гликозидных связей макромолекул, т.е. микрогели ФК сохраняют восприимчивость к ферментативной деградации (см. табл. 2 и 3, рис. 5). Уровень потери массы и число гидролизованных гликозидных связей зависят от количества фосфорсодержащих групп в образцах ФК и уменьшаются в ряду $ФК_1 > ФК_2 > ФК_3$ (см. табл. 2, рис. 5). Степень деградации менее «сшитого» $ФК_1$ сопоставима со скоростью деструкции нативного крахмала. Так, если потеря массы гидрогеля $ФК_1$, выдержанного в течение 7 дней в ФБР в присутствии α -амилазы, составляет 16,9%, то для нативного крахмала этот показатель равен 17,5%. Образцы ФК с более высоким содержанием фосфатных групп и меньшей степенью набухания, т.е. с более «сшитой» компактной структурой, в меньшей мере подвержены ферментативной деструкции, чем нативный крахмал (см. табл. 2, рис. 5).

Анализ кинетики деструкции ФК и нативного крахмала в течение 21 дня свидетельствует о том, что она состоит из двух стадий: в течение первых четырнадцати дней снижение массы и гидролиз α -1,4-гликозидных связей происходят наиболее интенсивно; после 14 сут скорость деструк-

Зависимость физико-химических свойств нативного и фосфорилированного крахмала от времени выдерживания в фосфатном буферном растворе и 0,01%-ном растворе α -амилазы
Dependency of physicochemical properties of native and phosphorylated starches on time of holding in phosphate buffer and 0.01% α -amylase solution

Раствор Solution	Время выдерживания, сут Time of incubation, day	Показатель Characteristics	Образец Sample			
			Нативный крахмал Native starch	ФК ₁ SP ₁	ФК ₂ SP ₂	ФК ₃ SP ₃
ФБР Phosphate buffer	1	$\Delta m, \%$	1,5	2,5	2,3	2,1
		$Q, \text{г/г}$ $Q, \text{g/g}$	1,1	31,0	24,2	14,9
		$C_p, \text{ммоль/г}$ $C_p, \text{mmol/g}$	—*	2,4	2,9	3,5
	7	$\Delta m, \%$	1,5	6,5	5,7	5,2
		$Q, \text{г/г}$ $Q, \text{g/g}$	1,1	32,5	26,5	15,5
		$C_p, \text{ммоль/г}$ $C_p, \text{mmol/g}$	—	2,3	3,0	3,3
0,01 %-ный раствор α -амилазы в ФБР 0,01 % solution of α -amylase in phosphate buffer	1	$\Delta m, \%$	10,6	7,9	3,0	2,5
		$Q, \text{г/г}$ $Q, \text{g/g}$	1,1	30,6	24,9	15,7
		$C_p, \text{ммоль/г}$ $C_p, \text{mmol/g}$	—	2,3	2,7	3,0
	7	$\Delta m, \%$	17,5	16,9	10,9	9,4
		$Q, \text{г/г}$ $Q, \text{g/g}$	1,2	33,2	30,2	16,1
		$C_p, \text{ммоль/г}$ $C_p, \text{mmol/g}$	—	2,2	2,6	2,9

*(-) означает “Не определяли”.

ции значительно снижается (см. рис. 5). Очевидно, первая стадия отражает распад макромолекул полисахарида в наиболее доступных для фермента областях структуры, в то время как следующая связана с постепенным разрушением α -1,4-гликозидных связей в менее доступных участках. Для подтверждения изменения надмолекулярной структуры ФК, подвергнутых воздействию раствора α -амилазы в ФБР в течение разного времени, был использован метод рентгенофазового анализа.

Дифрактограммы, представленные на рис. 6, а, свидетельствуют о том, что основные рефлексы, характерные для кристаллической структуры нативного крахмала ($2\theta = 17,0^\circ, 19,5^\circ$ и $22,1^\circ$), полностью исчезают в образцах ФК. Видно, что для диф-

рактограммы ФК₂ характерно наличие широкой полосы с максимумом около $2\theta = 21,0^\circ$, что указывает на аморфную структуру микрогелей. Однако по мере увеличения времени воздействия α -амилазы до 21 дней высота пика полосы $2\theta = 21,0^\circ$ постепенно увеличивается и сам пик смещается в область $2\theta = 19,5^\circ$. Этот факт свидетельствует о том, что для образцов, подвергнутых длительному воздействию фермента, характерно возрастание упорядоченности структуры.

Следует отметить, что более низкая скорость биодеструкции гидрогелей ФК по сравнению с нативным крахмалом является их несомненным преимуществом, обеспечивающим более длительное время пребывания в организме.

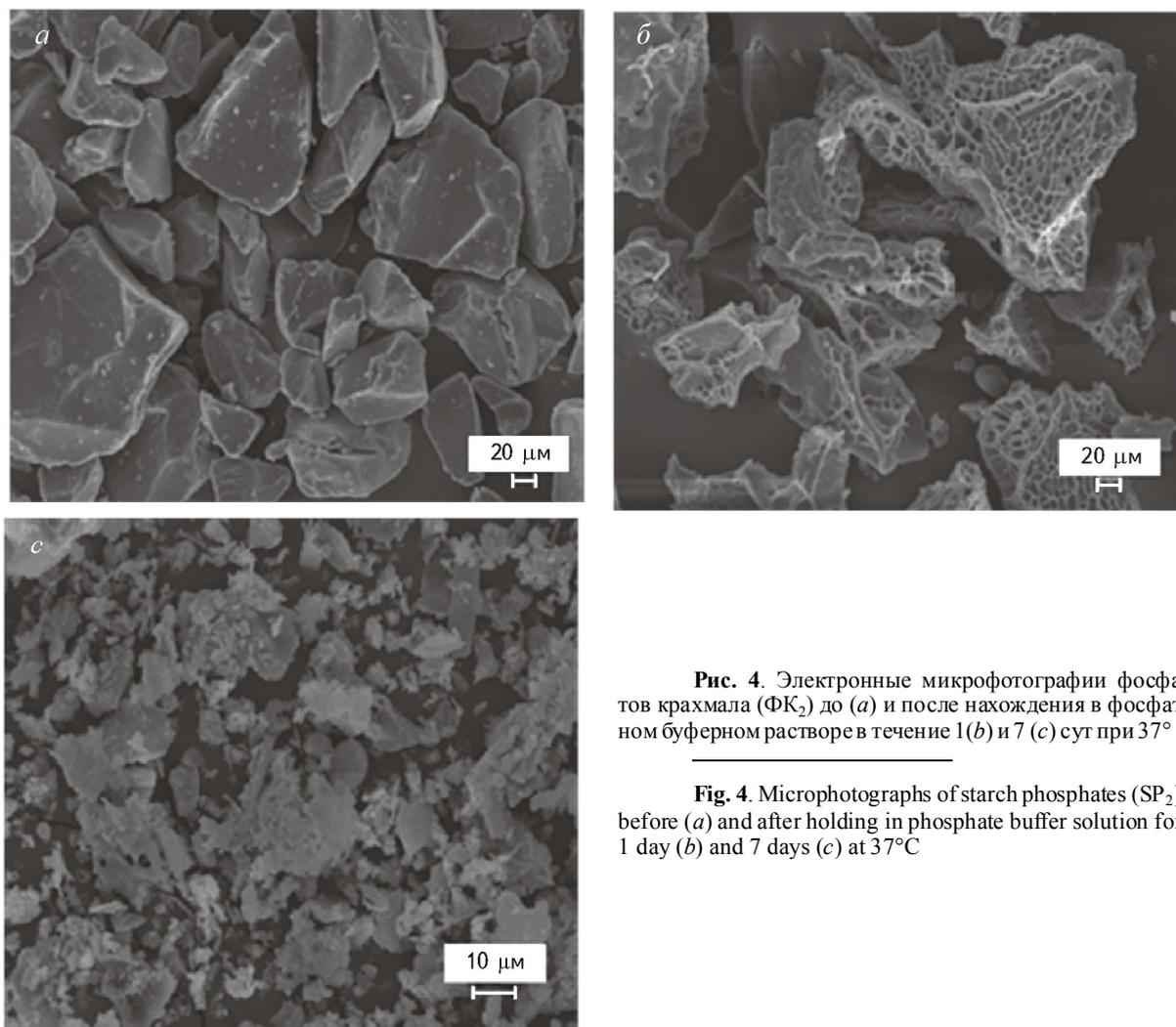


Рис. 4. Электронные микрофотографии фосфатов крахмала (ФК₂) до (а) и после нахождения в фосфатном буферном растворе в течение 1(б) и 7 (с) сут при 37°

Fig. 4. Microphotographs of starch phosphates (SP₂) before (a) and after holding in phosphate buffer solution for 1 day (b) and 7 days (c) at 37°C

С целью изучения принципиальной возможности получения на основании ФК систем с контролируемым выделением биомакромолекул нами были получены микрогели с включенным интерферон-альфа-2b.

На рис. 7 приведены зависимости, характеризующие высвобождение интерферон-альфа-2b в ФБР из микрочастиц, различающихся размерами и степенью набухания. Видно, что варьируя свойства микрогелей можно контролировать не только количество первоначального выброса интерферон-альфа-2b, который быстро создает цитотоксический эффект в опытах *in vitro* на монослойной культуре опухолевых клеток *HeLa*, но и период постепенного и непрерывного высвобождения остального количества цитокина. Из рис. 7 следует, что процесс высвобождения интерферон-альфа-2b из частиц размером 56,0—60,1 мкм с достаточно высокой степенью набухания (23,8—29,5 г/г) состоит из нескольких стадий, каждой из которых

соответствует определенный участок на кривой. Первая фаза процесса заключается в быстрой десорбции макромолекул белка (33% в течение 30 мин); при этом практически сразу создается ударная концентрация цитокина. Затем процесс высвобождения переходит во вторую стадию, характеризующуюся практически постоянной скоростью, которую определяют диффузия и разрушение полимерной сетки микрогелей [19]. Для микрогелей ФК со степенью набухания 23,8 г/г, но имеющих меньший размер (7,8 мкм), а также гидрогелей с относительно низкой степенью набухания (14,4 г/г) начальная скорость высвобождения интерферона очень высока (57,3—70,3% в течение первых 30 мин), т.е. процесс носит «взрывной» характер. Этот факт свидетельствует о том, что интерферон-альфа-2b адсорбирован не только внутри частиц, но и на их поверхности.

Таким образом, путем этерификации крахмала в системе ортофосфорная кислота—мочеви-

Таблица 3
Table 3

Зависимость потери массы и степени набухания крахмала и фосфата крахмала (ФК₂) от срока хранения в фосфатном буферном растворе в присутствии и в отсутствие α-амилазы
Dependency of mass loss and swelling degree of starch and starch phosphates (SP₂) on time of holding in phosphate buffer with or without α-amylase

Время хранения, сут Time of incubation, dsy	Крахмал Starch				ФК ₂ SP ₂			
	Потеря массы (Δm), % Mass loss (Δm), %		Степень набухания (Q), г/г Swelling degree (Q), g/g		Потеря массы (Δm), % Mass loss (Δm), %		Степень набухания (Q), г/г Swelling degree (Q), g/g	
	без фермента without enzyme	в присутствии фермента in the occipence of enzyme	без фермента without enzyme	в присутствии фермента in the occipence of enzyme	без фермента without enzyme	в присутствии фермента in the occipence of enzyme	без фермента without enzyme	в присутствии фермента in the occipence of enzyme
0	–	–	1,0	1,0	–	–	23,8	23,8
3 ч	2,6	9,3	1,0	1,2	0,05	0,09	23,6	25,2
1	1,5	10,6	1,1	1,2	2,30	3,00	24,2	24,9
3	2,3	15,4	1,1	1,1	2,30	3,50	26,5	26,9
7	0,5	17,5	1,1	1,2	5,70	10,90	26,5	30,2
14	2,4	33,6	1,1	1,2	5,90	16,20	29,9	30,4
21	2,1	32,4	1,0	1,3	6,00	17,10	29,5	30,5

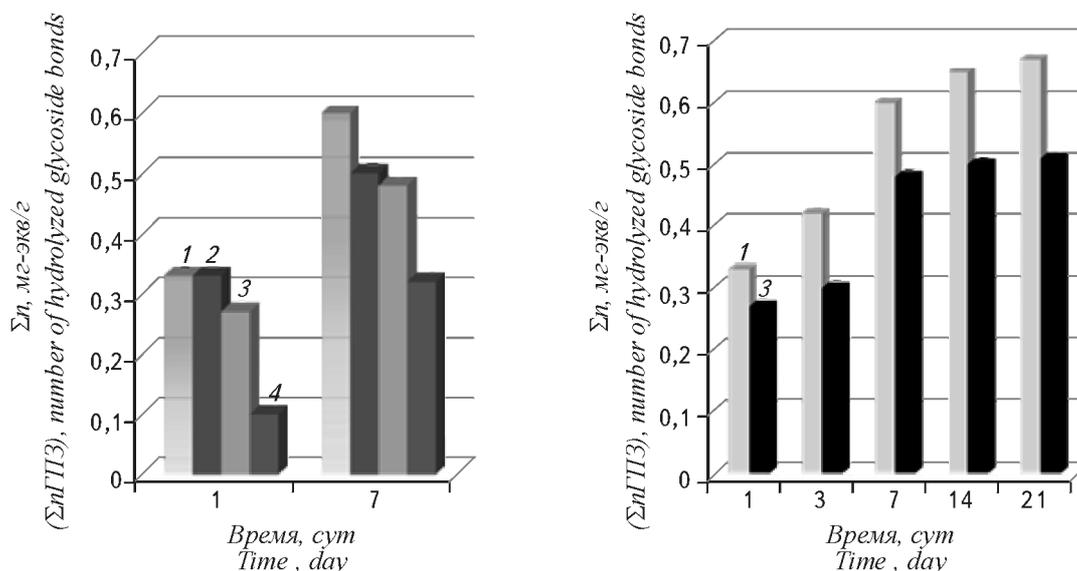


Рис. 5. Влияние времени инкубации нативного крахмала и фосфатов крахмала в растворе α-амилазы на количество гидролизованных гликозидных связей (ΣnГПЗ): 1 — крахмал; 2 — ФК₁; 3 — ФК₂; 4 — ФК₃. Левая часть рисунка отличается от правой длительностью эксперимента и количеством исследованных образцов

Fig. 5. Effect of time of incubation of native starch and starch phosphates in α-amylase solution on number of hydrolyzed glycoside bonds. (1), starch; (2), SP₁; (3), SP₂; and (4), SP₃. Right and left parts of figure differ in time of experiment and number of samples

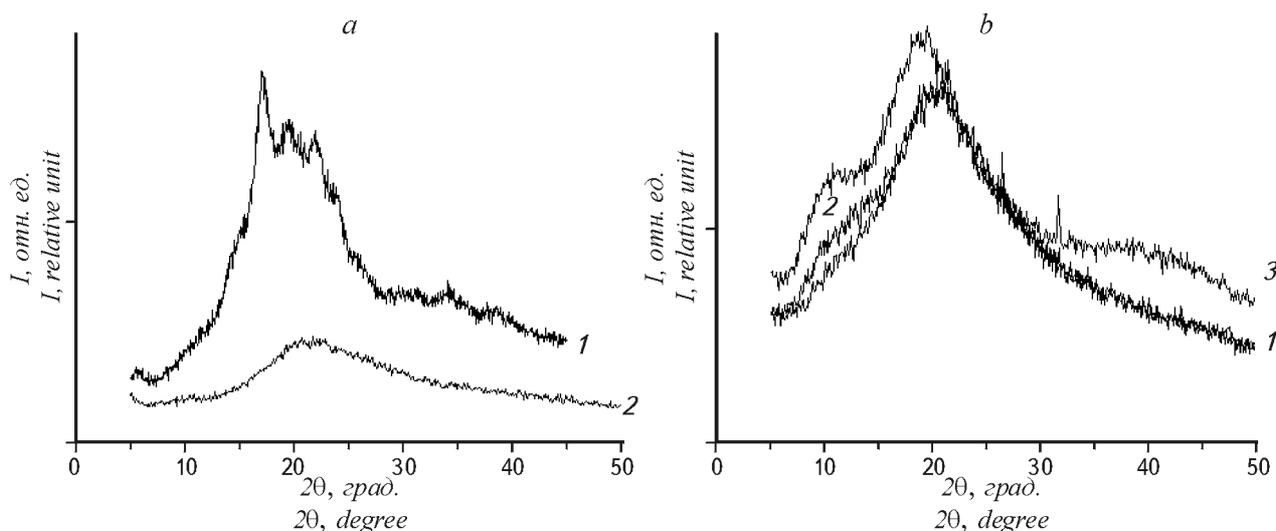


Рис. 6. Дифрактограмма крахмала и ФК₂ с содержанием фосфатных групп 3,4 ммоль/г до (а) и после (б) ферментативного гидролиза. а: 1 — крахмал; 2 — ФК₂; б: 1 — гидролиз в течение 1 ч; 2 — гидролиз в течение 7 сут; 3 — гидролиз в течение 21 сут

Fig. 6. A diffractogram of starch and SP2 with phosphate group content of 3.4 mol/g before (a) and after (b) enzymatic hydrolysis. (a): (1) — starch; (2) — SP₂; (b): (1) — hydrolysis for 1 h; (2) — hydrolysis for 7 days; and (3), hydrolysis for 21 days

на и последующей ультразвуковой обработки модифицированного крахмала синтезированы микрогели с содержанием фосфора 2,4—3,8 ммоль/г (7,4—11,8 %) и средним диаметром 7,8—60,1 мкм. Установлено, что гидрогели ФК деградируют в ФБР (рН 6,8) при температуре 37° и степень деградации увеличивается в присутствии α-амилазы. При этом общий уровень деструкции микрогелей постепенно уменьшается по мере роста количества введенных в крахмал фосфатных групп и, как следствие, понижения степени набухания образцов. Показано, что профиль высвобождения ин-

терферон-альфа-2b из микрочастиц зависит от их размеров и степени набухания.

Получено 17.03.16

ЛИТЕРАТУРА

1. Tomme, S.R.V. Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications / S.R.V. Tomme, W.E. Hennik // Expert Rev. Med. Devices. — 2007. — V. 4. — P. 147—164.
2. Peppas, N.A. Stimuli-sensitive Protein Delivery Systems / N.A. Peppas, B. Kim // J. Drug Del. Sci. Tech. — 2006. — V. 16. — P. 11—18.

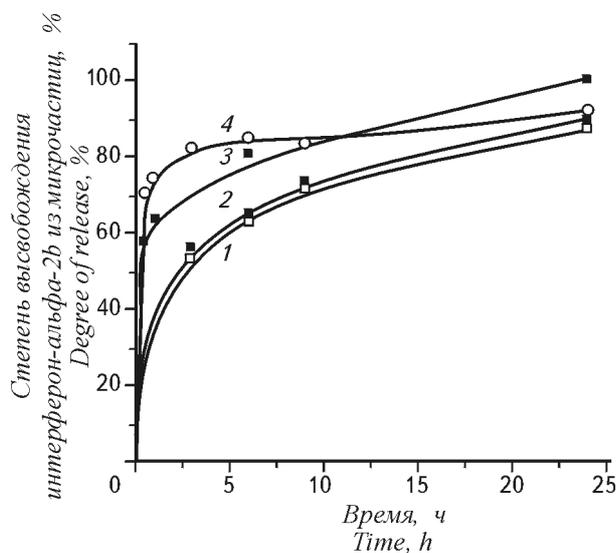


Рис. 7. Влияние степени набухания (кривые 1, 3) и размеров микрочастиц (кривые 2, 4) на кинетический профиль высвобождения интерферон-альфа-2b из фазы ФК: 1 — ФК₁ (размеры 56,0—60,1 мкм, степень набухания 29,5 г/г); 2 — ФК₂ (размеры 56,0—60,1 мкм, степень набухания 23,8 г/г); 3 — ФК₃ (размеры 56,0—60,1 мкм, степень набухания 14,4 г/г); 4 — ФК₂ (размеры 7,8 мкм, степень набухания 23,8 г/г)

Fig. 7. Effect of swelling (curves 1, 3) and microparticle size (curves 2, 4) on kinetic profile of interferon alpha-2b release from SP phase: (1), SP₁ (56.0—60.1 м, swelling degree of 29.5 g/g); (2), SP₂ (56.0—60.1 м, swelling degree of 23.8 g/g); (3), SP₃ (56.0—60.1 м, swelling degree of 14.4 g/g); (4), SP₂ (7.8 м, swelling degree of 23.8 g/g)

3. Oh, J.K. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications / J.K. Oh, D.I. Lee, J.M. Park // *Progr. Polymer Sci.* — 2009. — V.34. — P. 1261—1282.
4. Ansary, R.H. Biodegradable Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-Based Micro/Nanoparticles for Sustained Release of Protein Drugs / R.H. Ansary, M. B. Awang, M.M. Rahman // *Trop. J. Pharm. Res.* — 2014. — V. 13. — N 7. — P. 1179—1190.
5. Гельперина С.Э. Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц / С.Э. Гельперина, В. И. Швец // *Биотехнология.* — 2009. — № 3. — С. 8—23.
Gelperina, S.E. Systems for delivery of drugs based on polymeric nanoparticles / S.E. Gelperina, and V.I. Shvets // *Biotekhnologiya (Biotechnology).* — 2009. — N 3. — P. 8—23.
6. Губайдуллина А.А. Микрочастицы хитозана для получения пролонгированной формы альфа-интерферона / А.А. Губайдуллина, Г.И. Смагина, А.И. Мелентьев, М.М. Алсынбаев // *Биотехнология.* — 2010. — № 5. — С. 37—45.
Gubaidullina, A.A. Chitosan microparticles for obtaining of prolonged form of alfa-interferon / A.A. Gubaidullina, G.I. Smagina, A.I. Melentiev, and M.M. Alsynbaev // *Biotekhnologiya (Biotechnology).* — 2010. — N 5. — P. 37—45.
7. Алиновская В.А. Микро- и наногели фосфатов полисахаридов как носители противоопухолевых веществ / В.А. Алиновская, Т.Л. Юркштович, Н.В. Голуб, П.М. Бычковский, Р.И. Костерова, С.О. Соломевич, Н.К. Юркштович // *Рос. биотерапевт. журн.* — 2013. — Т. 12. — № 2. — С.4.
Alinovskaya, V.A. Micro- and nanogels of polysaccharide phosphates as carriers for antitumor compounds / V.A. Alinovskaya, T.L. Yurkshtovich, N.V. Golub, P.M. Bychkovskii, R.I. Kosterova, S.O. Solomevich, and N.K. Yurkshtovich // *Rossiiskii Terapevticheskii Zhurnal (Russian Therapeutical J.).* — 2013. — V. 12. — N 2. — P.4.
8. Ершов Ф.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). — М.: ГЭОТАР—Медиа, 2005. — 356 с.
Ershov, F.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs). — Moscow: GEOTAR—Media, 2005. — 356 p.
9. Heinze, U. New starch phosphate carbamides of high swelling ability: synthesis and characterization / U. Heinze, D. Rlemm, E. Unger, F. Pieschel // *Starch.* — 2003. — V. 55. — P. 55—60.
10. Голуб Н.В. Получение, структура и свойства гидрогелей на основе фосфатов крахмала / Н.В. Голуб, Р.И. Костерова, В.А. Алиновская, С.А. Беляев, Т.Л. Юркштович // *Вестн. БГУ. Сер. 2.* — 2008. — № 3. — С. 29—33.
Golub, N.V. Obtaining, structure and properties of hydrogels based on starch phosphates / N.V. Golub, R.I. Kosterova, V.A. Alinovskaya, S.A. Belyaev, and T.L. Yurkshtovich // *Vesti BGU (Proceedings of Belorussian State University). Ser. 2.* — 2008. — N 3. — P. 29—33.
11. Corbridge, D.E.C. Phosphorus: chemistry, biochemistry and technology. — London, New York: Boca Raton, 2013. — 1439 p.
12. Губен-Вейль А. Методы органической химии. — М.: Химия, 1967. — 1032 с.
Guben Weil, A. Methods in organic chemistry. — Moscow: Khimiya, 1967. — 1032 p.
13. Jong, S.J. Physically crosslinked dextran hydrogels by stereo-complex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior / S.J. Jong, B. van Eerdenbrugh, C.F. van Nostrum, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink // *J. Control. Rel.* — 2001. — V. 71. — P. 261—275.
14. Azevedo, H.S. *In vitro* assessment of the enzymatic degradation of several starch based biomaterials / H.S. Azevedo, F.M. Gama, R.L. Reis // *Biomacromolecules.* — 2003. — V. 4. — N 4. — P. 1703—1712.
15. US Pharmacopeia and National Formulary USP 30 — NF 25. US Pharmacopeial Convention. — Inc.: Rockville, MP, 2007.
16. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: учебное пособие. — М.: Высшая школа, 2003. — 478 с.
Knorre, D.G., and Myzina, S.D. Biological chemistry: A manual. — Moscow: Vysshaya Shkola, 2003. — 478 p.
17. Yapar, E.A. Injectable in situ forming microparticles: A novel drug delivery system / E.A. Yapar, Ö. Inal, Y. Ozkan, T. Baykara // *Trop. J. Pharm. Res.* — 2012. — V.11. — N 2. — P.307—318.
18. Pitarresi, G. Biodegradable hydrogels obtained by photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives / G. Pitarresi, F.S. Palumbo, G. Giammona, M.A. Casadei, F. M. Morraci // *Biomaterials.* — 2003. — V. 24. — P. 4301—4313.
19. Siepmann, J. How Autocatalysis Accelerates Drug Release from PLGA-Based Microparticles: A Quantitative Treatment / J. Siepmann, K. Elkharraz, F. Siepmann, D. Klose // *Biomacromolecules.* — 2005. — V. 6. — N 4. — P. 2312—2319.

T.L. YURKSHTOVICH, N.V. GOLUB*,
N.K. YURKSHTOVICH, P.M. BYCHKOVSKII,
R.I. KOSTEROVA, and V.A. ALINOVSKAYA

The Belorussian State University Research Institute for Physicochemical Problems, 220030, Minsk Belarus

e-mail: natali.golub@tut.by

Microgels of Starch Phosphates for the Controlled Release of Biomacromolecules

Hydrogels on the basis of starch phosphates containing 2.1—3.8 mmol/g of phosphoric acid groups have been prepared by etherification of starch in an orthophosphoric acid-urea system. In *in vitro* experiments, the rate of starch phosphates degradation in a phosphate buffer in the absence and presence of α -amylase in the reaction mixture was studied. It was shown that phosphate starch is available for enzymatic hydrolysis; however, the rate of biodegradation was gradually reduced with increasing amounts of phosphate groups. The possibility of using microgels with average sizes 7.8—60.1 μm to create systems with interferon alpha-2b controlled release was demonstrated.

Key words: microgels, a prolonged form of -interferon alpha-2b, recombinant interferon alpha-interferon release, starch phosphates.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 2, P. 67—77.

* Authors for correspondence.