

ВЛИЯНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНЫМ ЭЛЕКТРОННЫМ ПУЧКОМ НА ПРОФИЛЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ХЛОРАМФЕНИКОЛА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

© 2023 г. А. А. Волохова^{a, b, *}, Д. В. Пономарев^c, И. А. Курзина^a, С. И. Твердохлебов^b

^aНациональный исследовательский Томский государственный университет, Ленина пр., 36, Томск, 634050 Россия

^bНациональный исследовательский Томский политехнический университет,
НОЦ им. Б.П. Вейнберга ИЯТШ, пр. Ленина, 30, Томск, 634050

^cНациональный исследовательский Томский политехнический университет, Научно-производственная лаборатория
“Импульсно-пучковых, электроразрядных и плазменных технологий” ИШНПТ, пр. Ленина, 30, Томск, 634050 Россия

*E-mail: rapollinariya@gmail.com

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 11.01.2023 г.

Принята к публикации 11.01.2023 г.

В работе представлены результаты тестирования свойств антибактериальных нетканых волокнистых материалов на основе полимолочной кислоты с инкорпорированных хлорамфениколом. Показано, что воздействие импульсным электронным пучком увеличивает скорость высвобождения хлорамфеникола в среду фосфатно-солевого буфера. Причем количество высвободившегося вещества из обработанных образцов достоверно больше таковой для необработанных образцов в течение пяти дней эксперимента.

Ключевые слова: импульсный электронный пучок, биodeградируемые полимеры, модифицирование полимеров

DOI: 10.31857/S0023119323030178, **EDN:** KIPECN

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики являются одним из важнейших классов лекарственных препаратов. Антибактериальная терапия является неотъемлемой частью не только лечения непосредственно бактериальных поражений, но и в обязательном порядке используется для профилактики инфицирования в травматологии и ортопедии.

Между тем, традиционные методы введения препаратов — системная терапия (инъекции) и пероральный прием (таблетки, суспензии), имеют ряд ограничений. В частности, это высокий риск возникновения нежелательных побочных эффектов, особенно у пациентов с ослабленными функциями организма, а также, что не менее важно, неизбежное развитие антибиотикорезистентности — выработанной устойчивости бактерий к препарату, при котором его применение становится неэффективным. Основным подходом к предотвращению указанных событий является снижение системной концентрации препарата: необходимо достичь минимальной подавляющей концентрации вещества в локальном окружении области имплантации/поражения, максимально

снижая количество вещества, попадающего в общий кровоток и органы.

Данный подход возможно реализовать с помощью использования нового типа лекарственных форм — твердые лекарственные формы с локальным высвобождением.

При выборе “носителей” важно удовлетворить следующим требованиям к используемым материалам — биodeградируемость и биорезорбируемость (носитель должен самостоятельно раствориться в организме до нетоксичных компонентов и эти компоненты должны быть безопасно выведены организмом), соответствие установленным параметрам смачиваемости (чем больше смачиваемость поверхности материалов водой, тем быстрее идет высвобождение) и биомеханическим характеристикам места имплантации (эластичность), а также биосовместимость — в общем случае иметь низкий риск отторжения организмом.

Скаффолды на основе полимолочной кислоты (ПЛА) являются подходящими кандидатами по указанным требованиям. Полимолочная кислота показала свою эффективность в качестве матери-

ала для имплантатов, она имеет высокий уровень биосовместимости, биодegradируема и биорезорбируема [1].

Нельзя не отметить и немаловажный аспект применения описываемых изделий — необходимая стерилизация. Однако применение наиболее распространенных методов стерилизации — обработка горячим паром, автоклавирование, сухая термическая обработка, химическая и УФ-стерилизация неприменимы к тонким полимерным изделиям, которыми являются скаффолды, так как это приводит к деструкции материала. Решением являются использование этиленоксида или обработка электронным пучком [2].

Применение импульсного электронного пучка интересно еще и тем, что оно может одновременно выступать в роли стерилизующего воздействия и оказывать влияние на физико-химические свойства материалов, тем самым позволяя контролировать высвобождение загруженного препарата.

В работе [3] с использованием установки ТЕА-500 (Томск, Россия) была проведена обработка скаффолдов на основе ПЛА импульсным электронным пучком. Облучение проводилось на воздухе, при комнатной температуре и влажности с выводом пучка через титановую фольгу толщиной 50 мкм. Образцы обрабатывались 1, 2, 5 и 10 импульсами. Чтобы избежать чрезмерного повышения температуры образца во время облучения электронным пучком, между каждым импульсом был установлен 1-минутный период охлаждения. Температура во время обработки электронным пучком была ниже 40°C. Были достигнуты следующие поглощенные дозы: 26,3, 52,6, 131,5 и 263 кГр. Таким образом, каждый импульс соответствовал дозе ~26 кГр. Было показано, что обработка приводит к снижению молекулярной массы полимера, увеличению кристалличности при дозах поглощения до 150 кГр и возникновению фазовых переходов в кристаллитах полимера. При этом морфология поверхности материалов не претерпевала значительных изменений, и деструкция материала и возникновение дефектов поверхности не наблюдались. Таким образом, было продемонстрировано, что воздействие импульсным электронным пучком может быть эффективно применено для неразрушающего манипулирования физико-химическими свойствами волокнистых скаффолдов на основе ПЛА.

В развитие этой работы на том же оборудовании был проведен ряд экспериментов по изучению влияния обработки электронным пучком на высвобождение ибупрофена [4] и парацетамола [5] из скаффолдов на основе поликапролактона (ПКЛ). Обработка производилась при поглощенной дозе 25 кГр (1 импульс) с сохранением параметров, указанных в работе [3]. Было показано, что обработка позволяет значительно увеличить скорость высвобождения препарата из волокон при сохранении механических свойств материалов.

Таким образом, была продемонстрирована реальная возможность применения импульсных электронных пучков в создании средств адресной доставки (САД) и контролируемого высвобождения лекарственных средств.

С другой стороны, выбор лекарственного препарата также имеет большое значение для разработки САД. Главным образом, препарат должен обладать местным действием, то есть быть эффективным без метаболизирования в печени и иметь выраженный локальный эффект. Антибиотик хлорамфеникол является высокоэффективным бактериостатическим средством, он доступен, хорошо изучен, и практика применения его в медицинской практике насчитывает десятки лет. Однако системное введение хлорамфеникола связано с высоким риском возникновения опасных побочных эффектов и серьезным токсическим действием на организм [6]. Более того, резистентность к хлорамфениколу развивается сравнительно быстро. Локальное применение препарата позволяет избежать подобных негативных последствий (например, широко распространенная мазь “Левомеколь”).

Ранее, нами было успешно проведено инкорпорирование хлорамфеникола в скаффолды на основе ПЛА [7]. Удалось получить образцы с соотношением ПЛА : хлорамфеникол 2 : 1 в сухом веществе. Полученные образцы подвергались воздействию плазмы магнетронного разряда, что приводило к увеличению скорости высвобождения. Более того, были проведены тесты антибактериальной активности. Было показано, что в условиях статичной среды такие скаффолды проявляют бактериостатические свойства в течение 7 дней, а в условиях смены среды (при моделировании инфильтрации биологических жидкостей) — от 3 до 4 дней в зависимости от вида бактерий.

Подводя итог, можно заключить, что комбинация хлорамфеникол — ПЛА является перспективным объектом для исследования влияния воздействия импульсным электронным пучком на физико-химические свойства фармакологически активных скаффолдов и кинетику высвобождения лекарственных средств.

Цель данной работы заключается в изучении влияния обработки импульсным электронным пучком на высвобождение хлорамфеникола из образцов полимерных скаффолдов на основе ПЛА, полученных методом электроспиннинга.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Полимолочная кислота (ПЛА, поли-(L-лактид)) в виде гранул (Corbion Puras, Нидерланды) и растворитель — гексафторизопропанол (ГФИП) (ЭКОС-1, Россия) были использованы для приготовления прядильных растворов в соотношении в смеси ПЛА : ГФИП — 3 мас./мас. %. Для по-

лучения скаффолдов с инкорпорированным хлорамфениколом (ХФ) к прядильному раствору ПЛА : ГФИП добавлялся порошок хлорамфеникола (Фармстандарт, Россия), концентрации хлорамфеникола – 50 мас./мас. % (к массе ПЛА).

Скаффолды были получены методом электро-спиннинга на установке Nanon-01 (МЕСС СО., Япония) при следующих параметрах процесса: скорость подачи раствора – 3 мл/ч, формирующее напряжение – 20 кВ.

Облучение образцов импульсным электронным пучком проводилось на установке – ТЕА-500 (Томск, Россия) на воздухе при комнатной температуре. Вывод пучка осуществлялся через титановую фольгу толщиной 50 мкм. Параметры: диаметр электронного пучка – 5 см, ток электронного пучка – 6 кА, длительность импульса тока электронного пучка на полувысоте – 60 нс, энергия электронного пучка – 90 Дж, количество импульсов – 1 (поглощенная доза – 25 кГр).

Образцы полимерных скаффолдов размером 10×10 мм взвешивали на лабораторных весах с точностью до 0.0001 г. По формуле (1) для каждого образца вычисляли массу загруженного хлорамфеникола:

$$m_{\text{загр}} = m_{\text{обр}} C_{\text{ХФ}}, \quad (1)$$

где $m_{\text{загр}}$ – масса загруженного хлорамфеникола, $m_{\text{обр}}$ – масса исследуемого образца по результатам взвешивания, $C_{\text{ХФ}}$ – массовая доля хлорамфеникола в прядильном растворе ПЛА : ГФИП.

Образцы помещались в пробирку Эппендорфа объемом 2 мл и заливались двумя миллилитрами фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (Биолот, Россия). Через заранее определенные промежутки времени отбирались 1 мл пробы и возвращался 1 мл чистого буфера. Эксперимент проводился при температуре $T = 37^\circ\text{C}$. Полученные пробы анализировались с помощью ВЭЖХ на установке Agilent 1100 (Agilent technologies, НР, США) согласно разработанной методике: длина волны $\lambda = 278$ нм, скорость потока 1 мл/мин, колонка C18 100×4.6 мкм, размер частиц колонки 5 мкм, подвижная фаза ацетонитрил/вода 45/55 (рН 2), время элюирования 3 мин, объем пробы 5 мин. В качестве выходного сигнала анализировалась площадь под пиком, соответствующим хлорамфениколу. Все исследования проводились в пяти повторах.

Затем, с использованием калибровочных кривых, данные выходного сигнала пересчитывались на массы хлорамфеникола в пробе. Для каждой точки пересчитывалась доля высвободившегося вещества, как значение отношения массы хлорамфеникола в реакторе в данный момент времени

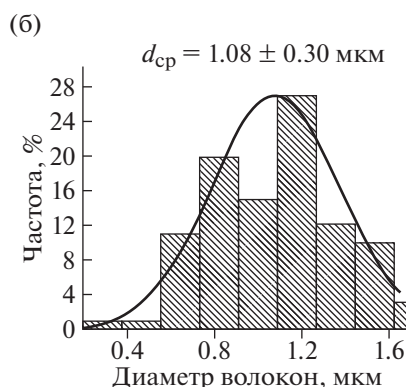
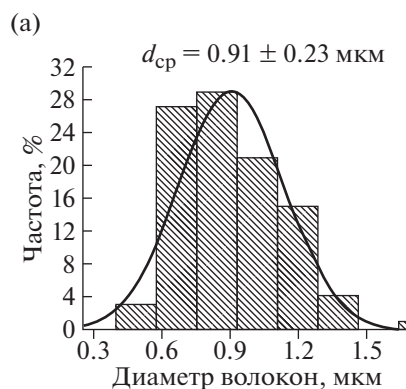
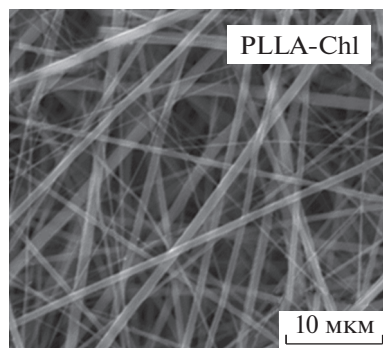
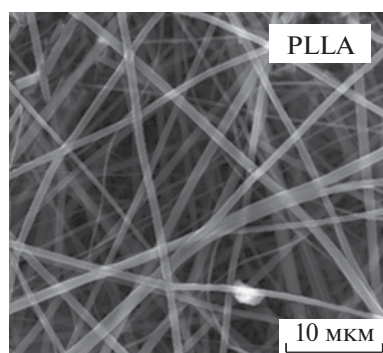


Рис. 1. СЭМ изображение поверхности скаффолдов: (а) скаффолд без добавления хлорамфеникола, (б) скаффолд с добавлением хлорамфеникола 50 мас. %.

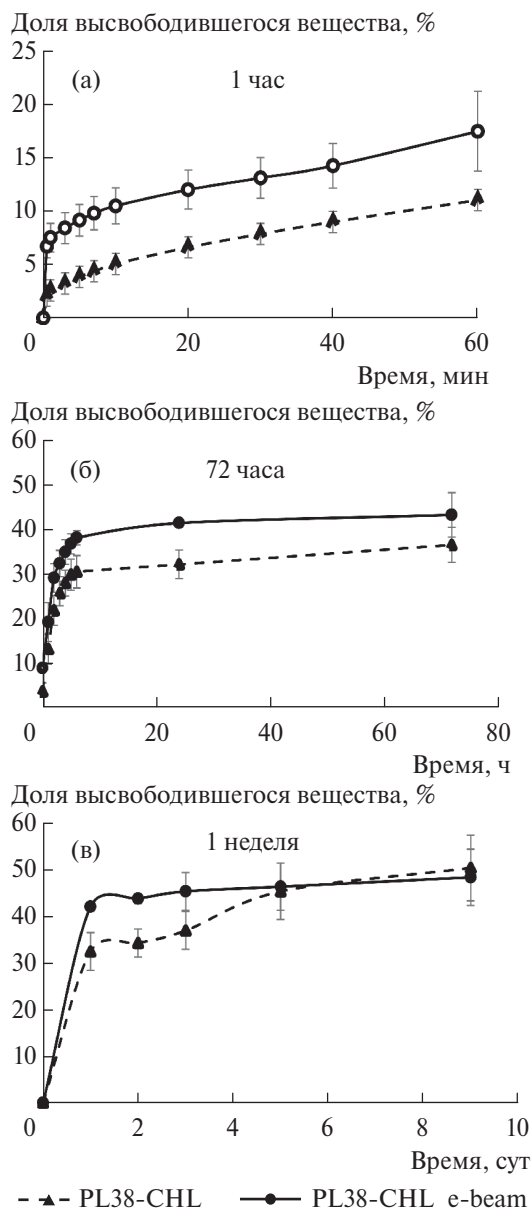


Рис. 2. Динамика высвобождения хлорамфеникола в течение: (а) одного часа, (б) трех суток, (в) одной недели. Образцы, не подвергнутые воздействию импульсным электронным пучком — пунктирная линия, подвергнутые воздействию — сплошная линия.

к массе загруженного хлорамфеникола, умноженное на 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом электроспиннинга были изготовлены скаффолды толщиной $\sim 100 \pm 20$ мкм. Несмотря на критически высокое содержание хлорамфеникола, были получены бездефектные волокна, причем введение хлорамфеникола не повлияло

на значение среднего диаметра волокон и распределение волокон по диаметрам (рис. 1).

Результаты моделирования высвобождения хлорамфеникола в буферную среду представлены на рис. 2. Как видно из рис. 2в, в течение пяти дней эксперимента доля высвободившегося вещества была больше для образцов, подвергнутых воздействию импульсным электронным пучком. На рис. 2а и 2б представлена детализация процесса. Показано, что облучение электронным пучком влияет на скорость высвобождения, но не меняет тип кривой высвобождения.

Оба профиля характеризуются наличием эффекта резкого увеличения концентрации в начале процесса с последующим достижением плато. Вследствие обработки не меняется значение количества высвободившегося вещества на момент достижения плато (“quantity to plato” — QTP [5]), оно составляет $\sim 45 \pm 5\%$. Между тем, время наступления плато (“time to plato” — ТТР [5]) достоверно снижается: с 5 сут для необлученных образцов до 1 сут для образцов, подвергнутых воздействию импульсным электронным пучком. Полученный результат отличается от продемонстрированных нами ранее [5]: для образцов на основе поликапролактона с инкорпорированным парацетамолем наблюдалось увеличение значения QTP при том, что ТТР оставалось неизменным. Отличия могут быть связаны не только с природой лекарственного препарата, но и с отличиями в значениях молекулярной массы полимеров. Молекулярная масса скаффолдов, полученных на основе ПЛА торговой марки Corbion Puras (Нидерланды) составляет 650–670 кДа, а при облучении одним импульсом в идентичных с условиями в данной работе — это значение снижается на один порядок [3]. В то же время, молекулярная масса поликапролактона в работе [5] составляла ~ 270 кДа, и при облучении одним импульсом значение снижалось в пределах 100 кДа, что демонстрирует большую выраженность эффекта облучения импульсным электронным пучком на полимолочную кислоту (поли-(L-лактид)). В случае поликапролактона облучение способствовало псевдо-поверхностной эрозии, что облегчало высвобождения лекарства, заключенного в приповерхностных слоях волокон и, соответственно, увеличивало QTP. В данном исследовании, предположительно, наблюдается более выраженное влияние на объем волокон. По этой причине в первые 72 ч результаты наблюдений совпадают с таковыми для системы поликапролактон–парацетамол, однако между третьим и четвертым днем наблюдений для образцов, не подвергнутых облучению, наблюдается рост доли высвободившегося вещества. Подобный рост может быть объяснен высвобождением вещества, заключенного в более глубоких слоях волокон и чье высвобождение из облученных образцов было упрощено за счет снижения молекулярной массы полимера — основы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе описан эффект изменения профиля высвобождения хлорамфеникола из синтетических нетканых скаффолдов на основе полимолочной кислоты, полученных методом электроспиннинга, путем облучения импульсным электронным пучком в атмосфере воздуха. Для обеспечения максимального антибактериального эффекта локальная концентрация антибиотика должна быстро достичь значения минимальной подавляющей концентрации (МПК). Использование импульсного электронного пучка позволяет ускорить высвобождение хлорамфеникола из скаффолда на основе полимолочной кислоты на начальных этапах процесса, что должно положительно сказаться на антибактериальной активности материала. Полученные данные расширяют представление о возможностях использования высокоэнергетических воздействий для изменения свойств полимерных материалов медицинского назначения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Разработка технологии, получение образцов и исследование свойств материалов были выполнены в Томском политехническом университете в рамках программы развития ТПУ. Исследование выполнено при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singhvi M.S., Zinjarde S.S., Gokhale D.V.* // J. applied microbiology. 2019. № 127. V. 6. P. 1612.
2. *Silindir M., Özer A.Y.* // Fabad J. Pharmaceutical Sciences. 2009. V. 34. № 1. P. 43.
3. *Kudryavtseva V.L., Bolbasov E.N., Ponomarev D.V. et al.* // Bionanoscience. 2018. V. 8. № 1. P. 131.
4. *Rakina A.A., Spiridonova T.I., Kudryavtseva V.L. et al.* // J. Physics: Conference Series. 2018. V. 1115. № 3. P. 032051.
5. *Volokhova A.A., Kudryavtseva V.L., Spiridonova T.I. et al.* // Mater. Today Commun. 2021. V. 26. P. 102134.
6. *Shen A.Y., Haddad E.J., Hunter-Smith D.J. et al.* // ANZ J. surgery. 2018. V. 88. № 12. P. 1243.
7. *Volokhova A.A., Fedorishin D.A., Khvastunova A.O. et al.* // Polymers. 2022. V. 14. № 3. P. 373.