

МИКРОКАПСУЛЫ ИЗ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) ДЛЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ БЕЛКА

УДК 547.962:573.6

Поступила 12.10.2015 г.



А.Л. Зернов, аспирант лаборатории азотфиксации микроорганизмов¹; научный сотрудник²;
Е.А. Иванов, младший научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов¹;
Т.К. Махина, научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов¹;
В.Л. Мышкина, к.б.н., научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов¹;
О.В. Самсонова, к.б.н., младший научный сотрудник кафедры биоинженерии³;
А.В. Феофанов, д.б.н., профессор кафедры биоинженерии³;
А.В. Волков, старший научный сотрудник отдела общей патологии⁴;
Ю.В. Гажва, к.м.н., ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ²;
А.А. Мураев, к.м.н., доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ²;
доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии⁵;
В.М. Рябова, к.м.н., ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ²;
К.В. Шайтан, д.ф.-м.н., профессор, зам. зав. кафедры биоинженерии³;
С.Ю. Иванов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ²;
зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии⁵;
Г.А. Бонарцева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов¹;
А.П. Бонарцев, к.б.н., ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии³; научный сотрудник^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071, Ленинский пр., 33, стр. 2;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1;

⁴Центральный НИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Министерства здравоохранения РФ, Москва, 119991, ул. Тимура Фрунзе, 16;

⁵Российский университет дружбы народов, Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, 6

Цель исследования — разработка новой системы пролонгированного высвобождения белков, в основе которой лежит использование микрокапсул поли(3-гидроксибутирата) (ПГБ), загружаемых бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Материалы и методы. Для разработки микрокапсул применяли ПГБ, полученный микробиологическим путем с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б. Микрокапсулы, загруженные модельным белком — БСА, были получены с помощью метода двухэтапного эмульгирования «водная фаза/масляная фаза/водная фаза». Для исследования морфологии микрокапсул, процессов загрузки и высвобождения из них БСА были использованы методы спектрофотометрии, конфокальной и сканирующей электронной микроскопии. Исследование биосовместимости микрокапсул *in vivo* проведено по результатам внутримышечной имплантации и по данным гистологии.

Результаты. Исследование процессов включения и пролонгированного высвобождения БСА из полученных микрокапсул в течение более чем 190 ч показало эффективность представленной системы. Установлено, что высвобождение белка из микрокапсул происходит в результате разрыва их полимерных стенок. Выявлена умеренная тканевая реакция на имплантацию полученных микрокапсул.

Заключение. Разработанные микрокапсулы из ПГБ, загруженные БСА, представляют собой удачный пример создания пролонгированной формы препарата белковой природы.

Ключевые слова: биоразлагаемые полимеры; полигидроксикарбоксилаты; поли(3-гидроксибутират); пролонгированное высвобождение; микрокапсулирование; биосовместимость.

English

Microcapsules of Poly(3-Hydroxybutyrate) for Sustained Protein Release

A.L. Zernov, PhD Student, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation¹; Researcher²;

E.A. Ivanov, Junior Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation¹;

T.K. Makhina, Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation¹;

Для контактов: Бонарцев Антон Павлович, e-mail: ant_bonar@mail.ru

V.L. Myshkina, PhD, Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation¹;
O.V. Samsonova, PhD, Junior Researcher, Department of Bioengineering³;
A.V. Feofanov, DSc, Professor, Department of Bioengineering³;
A.V. Volkov, Senior Researcher, Department of General Pathology⁴;
J.V. Gazhva, MD, PhD, Tutor, Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Postgraduate Faculty²;
A.A. Muraev, MD, PhD, Associate Professor, Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Postgraduate Faculty²; Associate Professor, Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Dentistry⁵;
V.M. Ryabova, MD, PhD, Tutor, Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Postgraduate Faculty²;
K.V. Shaitan, DSc, Professor, Deputy Head of the Department of Bioengineering³;
S.Y. Ivanov, MD, DSc., Professor, Head of the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Postgraduate Faculty²; Head of the Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Dentistry⁵;
G.A. Bonartseva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation¹;
A.P. Bonartsev, PhD, Leading Researcher, Department of Bioengineering³; Researcher^{1,2}

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Sciences, 33, bld. 2 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

³Lomonosov Moscow State University, GSP-1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁴Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, 16 Timura Frunze St., Moscow, 119991, Russian Federation;

⁵Peoples Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russian Federation

The aim of investigation was to develop a system for protein sustained release based on the use of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) microcapsules loaded with bovine serum albumin (BSA).

Materials and Methods. To develop microcapsule we used PHB obtained microbiologically by a strain-producer *Azotobacter chroococcum* 7B. Microcapsules loaded with model protein BSA were produced by double emulsion technique "water/oil/water". Morphology of microcapsules was investigated by methods of confocal and scanning electron microscopy, when the loading and release of BSA was examined spectrophotometrically. *In vivo* biocompatibility of microcapsules was studied in accordance with intramuscular implantation and histology findings.

Results. The study of BSA incorporation and its sustained release from microcapsules for more than 190 h demonstrated the efficacy of proposed system. The mechanism of protein release was found to occur due to the rupture of polymer walls. Moderate tissue response to the implantation of obtained microcapsules was demonstrated.

Conclusion. Developed PHB microcapsules loaded with BSA are good model of long acting protein drugs.

Key words: biodegradable polymers; polyhydroxyalkanoates; poly(3-hydroxybutyrate); prolonged release; microencapsulation; biocompatibility.

В настоящее время поли(3-гидроксибутират) (ПГБ), а также его сополимеры, получаемые биотехнологическим путем, привлекают большое внимание в качестве биосовместимых и биодegradуемых материалов. ПГБ применяется для разработки широкого спектра полимерных изделий биомедицинского назначения, таких как сосудистые стенты, хирургические нити, пародонтологические мембраны [1–3]. Помимо медицинских изделий ПГБ может быть использован для разработки лекарственных препаратов с возможностью пролонгированного высвобождения посредством включения в полимерные микрочастицы различных лекарственных веществ: низкомолекулярных соединений [4–6], высокомолекулярных белков [7] и неорганических наночастиц [8].

Наиболее перспективным направлением в современной биофармакологии является создание белковых систем пролонгированного высвобождения. Применение таких систем, основанных на использовании биополимерных микрочастиц, может устранить большинство недостатков традиционных лекарственных средств: высокую токсичность, неэффективность

действующего начала, нестабильность вещества, неудобство введения и т.д. Однако для инкапсуляции белков в полимерные микрочастицы необходимо использовать относительно сложные методы, причем одним из наиболее эффективных является метод двухэтапного эмульгирования. Он применяется для получения микрокапсул и микрочастиц, загруженных белком, так как в данном случае белок не растворяется в том же растворителе, что и биополимер. Существует несколько модификаций этого метода, различающихся по последовательности эмульгирования в различных фазах и по составу этих фаз [9].

Важным свойством для полимерных систем пролонгированного высвобождения является их биосовместимость. Для ее оценки существует ряд методов, как *in vitro*, так и *in vivo*. Первые представляют собой ряд моделей, основанных на культурах клеток [10], в то время как вторые подразумевают подкожную [11] или внутримышечную [12] имплантацию полимерного изделия лабораторным животным с последующим исследованием гистологическими методами.

Цель исследования — разработка новой системы

продолжительного высвобождения белков, в основе которой лежит использование микрокапсул поли(3-гидроксипропиридата), загружаемых бычьим сывороточным альбумином.

Материалы и методы. Для создания системы применяли ПГБ с молекулярной массой 826 кДа, полученный в лаборатории азотфиксации микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха микробиологическим путем при помощи культивирования штамма *Azotobacter chroococcum* 7Б [13]; хлористый метилен (дихлорметан CH_2Cl_2 , «Экос-1», Россия); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Aldrich, Германия); бычий сывороточный альбумин, меченный флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (Sigma Aldrich, Германия); поливиниловый спирт (МЕРК, 72 000 Да); калий-фосфатный буфер однозамещенный («Химмед», Россия); азид натрия (NaN_3) (Sigma Aldrich, Германия); краситель Кумасси бриллиантовый синий G-250 («Астра», Россия); фосфорная кислота (H_3PO_4 , «Химмед», Россия); этиловый спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, «Химмед», Россия); диэтиловый эфир ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, «Химмед», Россия).

Получение микрокапсул. Микрокапсулы получали при помощи метода двухэтапного эмульгирования «водная фаза/масляная фаза/водная фаза» (В/М/В) [14]. Метод заключается 1) в эмульгировании водного раствора лекарственного вещества в растворе полимера в органическом растворителе; 2) в эмульгировании полученной эмульсии в водной фазе. Конечный эмульгатор удаляют с помощью дистиллированной воды и выделяют микросферы [9].

Эмульсию водного раствора белка в количестве 10 мг в растворе полимера с концентрацией в органическом растворителе 10 мг/мл и молекулярной массой 826 кДа в общем объеме 4 мл постепенно добавляли к 50 мл раствора поливинилового спирта с концентрацией 1,5%. Перемешивали с помощью верхнеприводной мешалки R2R 2021 (Heidolph, Германия) при 2000 об./мин. После полного испарения органического растворителя микрокапсулы отделяли центрифугированием (10 мин при 4400 об./мин) с использованием центрифуги 5707R (Eppendorf, Германия), а затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора. Потом микрокапсулы лиофилизировали, используя лиофильную сушку (New brinswick scientific, США), предварительно заморозив их в жидком азоте. Процент включения белка определяли путем подсчета массы белка в процессе исследования динамики его высвобождения из полимера.

Морфология микрокапсул. Исследование морфологии микрокапсул проводили с помощью сканирующей электронно-ионной микроскопии без напыления на приборе Quanta 200 3D (FEI Company, США). Для получения нормального распределения микрочастиц по размерам изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ. Изображения, показывающие характер включений белка в структуры, были исследованы с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 META (Германия), объектив С-Apochromat 63x/1.2 W corr. Возбуждение флюоресценции проводили лазером с длиной волны 488 нм, радиус конфо-

кальной диафрагмы был равен 1 диску Эри (112 мкм). Использовали фильтр LP 505 нм. Аналогичным способом были исследованы микрочастицы после окончания эксперимента продолжительного высвобождения [14].

Исследование продолжительного высвобождения БСА из полимерных микроструктур *in vitro*. Продолжительное высвобождение белка из микроструктур проводили при 37°C в термостате ТС 1/20 (Россия) в 25 mM калий-фосфатном буфере (pH=7,4) с добавлением антибактериального агента азид натрия с концентрацией 0,004%: по 10 мг микрокапсул в 1 мл буфера перемешивали при 350 об./мин на шейкере OS-10 (BIOSAN, Латвия). При исследовании кинетики выделения БСА через заданные интервалы времени микрокапсулы отделяли от буфера центрифугированием при 10 000 об./мин на центрифуге 5702 R (Eppendorf, Германия), отбирали супернатант и добавляли 1 мл свежего буфера. В отобранных пробах определяли количество содержащегося белка.

Спектрофотометрическое определение содержания БСА в полученных образцах. Содержание БСА в полученных образцах выявляли спектрофотометрически с окрашиванием по Бредфорду, а также методом определения концентрации белка в растворе при длине волны 280 нм. Измерения проводились на спектрофотометре UV-1601PC (Shimadzu, Япония) при $\lambda=595$ нм и $\lambda=280$ нм [14].

Исследование биосовместимости полученных микрочастиц *in vivo*. Исследование биосовместимости микрокапсул *in vivo* выполняли на 18 крысах-самцах линии Wistar массой 500±50 г. Животные содержались в виварии ЦНИИЛ НижГМА при 15-часовом световом дне при температуре +22°C, все манипуляции проводились в соответствии с приказом Минздравсоцразвития №708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Под наркозом (золетил 5 мг/кг) внутримышечно были введены микрочастицы в виде суспензии в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСР) (50 мг/мл) в количестве 1 мл в заднюю лапу лабораторного животного. На 7, 20 и 60-й дни после инъекции животных вывели из эксперимента (по 6 животных), после чего были отобраны образцы мышечной ткани, содержащие микрокапсулы. Далее исследуемые материалы фиксировали в 4% растворе формальдегида в ФСР в течение 24 ч. Затем полученные образцы биопсии промывали водой, обезживали в серии градуированных растворов этанола (50, 60, 70, 80, 96% и абсолютный этанол в течение 1,5 ч в каждой концентрации), промывали хлороформом в течение 40 мин, погружали в 45% раствор парафина в хлороформе (37°C, 12 ч) и заливали в форму. Срезы толщиной 6 мкм вырезали из парафиновых блоков с помощью микротомы МС 2 («Точмедприбор», Украина), депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином с последующим исследованием с помощью световой микроскопии.

Анализ изображений проводили на микроскопе «Биомед 1» («Биомед», Россия) и открытого програм-

много обеспечения Zeiss LSM Image Browser 4.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия).

Результаты и обсуждение

Морфология микрокапсул. С использованием методики В/М/В были получены микрокапсулы из ПГБ 826 кДа, загруженные модельным белком БСА. На микрофотографии полученных полимерных микрокапсул (рис. 1) хорошо заметна их шероховатая поверхность с множеством тяжей, обусловленная, по-видимому, конденсацией полимерных цепей друг на друга при испарении растворителя, как это описано в ряде работ по установлению морфологии полимерной укладки полигидроксиалканоатов и других частично кристаллических полимеров [15]. Следует обратить внимание, что микрокапсулы представляют собой полые частицы, внутрь которых помещен белок. Это хорошо видно при рассмотрении частицы, рассеченной пучком ионов, на микроскопе Quanta 200 3D (рис. 2): полость внутри час-

тицы ограничена монолитной стенкой, в которой и находится белок. Распределение по размерам (рис. 3) показывает характерный размер частиц — от 5 до 30 мкм со средним диаметром 17 мкм.

Включение белка в микрокапсулы. Для изучения характера включений белка в полимерную матрицу был выбран метод конфокальной микроскопии. Для этого были изготовлены частицы с ФИТЦ-меченым БСА. На изображениях (рис. 4 и 5) хорошо видно диффузное расположение белка внутри микрокапсул, в то время как на поверхности микрочастиц находятся скопления адсорбированного белка. Белок, адсорбированный на поверхности частиц, высвобождается в первую очередь, тогда как инкапсулированный БСА обеспечивает пролонгированное высвобождение. Данное явление будет подробно описано ниже при исследовании пролонгированного высвобождения белка из частиц в опыте *in vitro*.

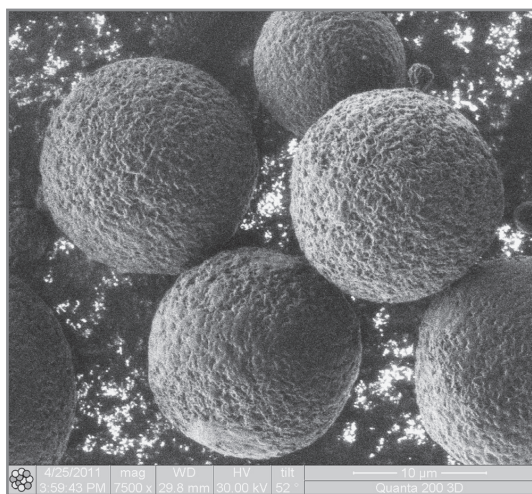


Рис. 1. Микрофотография микрокапсул из поли(3-гидроксибутирата) с инкапсулированным белком

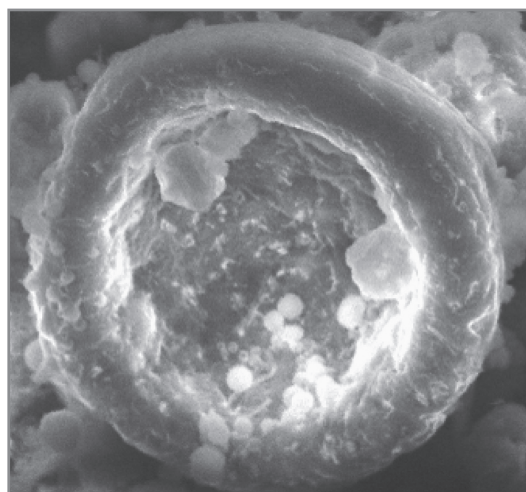


Рис. 2. Микрофотография сечения образца микрокапсул из поли(3-гидроксибутирата) с инкапсулированным белком

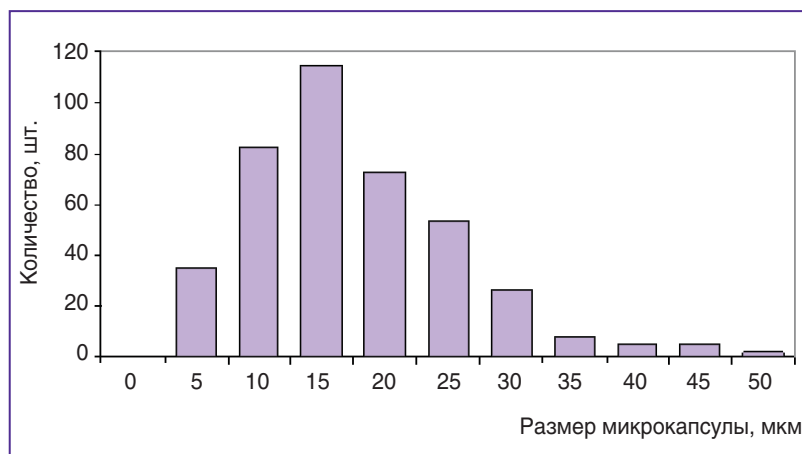


Рис. 3. Распределение микрокапсул из поли(3-гидроксибутирата) с инкапсулированным белком по размерам

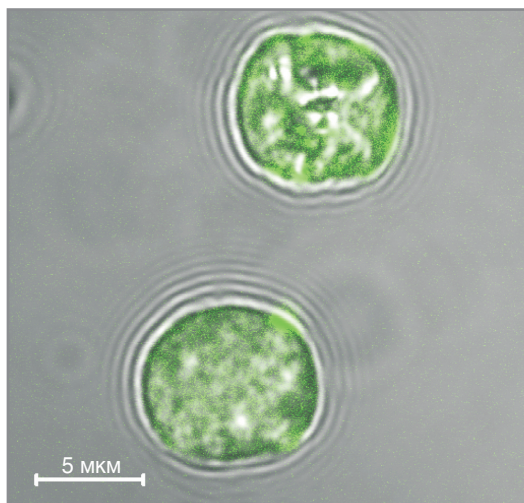


Рис. 4. Микрофотография отдельных микрокапсул, приготовленных из поли(3-гидроксibuтирата) с белком ФИТЦ, меченным бычьим сывороточным альбумином, по методике В/М/В, полученная на конфокальном микроскопе. Зеленым показано распределение белка в структурах

Высвобождение белка *in vitro*. Полученные частицы ПГБ с загруженным белком были использованы в опыте по высвобождению БСА *in vitro* (рис. 6). Он проводился в течение более чем 190 ч (8 сут) в условно-физиологических условиях до того момента, когда выходящий белок перестал фиксироваться. При этом из-за невозможности расчета всего инкапсулированного белка (по причине того, что при необратимой адсорбции белка ПГБ и БСА образуют конгломерат, не растворимый ни в воде, ни в хлороформе) за 100% был принят весь высвободившийся белок. Иными словами, нас интересовал только так называемый полезный белок, обратимо адсорбированный на полимер, а затем высвободившийся из полимерных структур. Денатурированным, необратимо адсорбированным БСА мы пренебрегали.

По данным опыта были рассчитаны параметры инкапсулирования БСА:

- эффективность инкапсулирования — $1,92 \pm 0,51\%$;
- выход (продукция) микрокапсул — $46,62 \pm 5,9\%$;
- величина первичного «взрывного» эффекта — $49,94 \pm 3,50\%$.

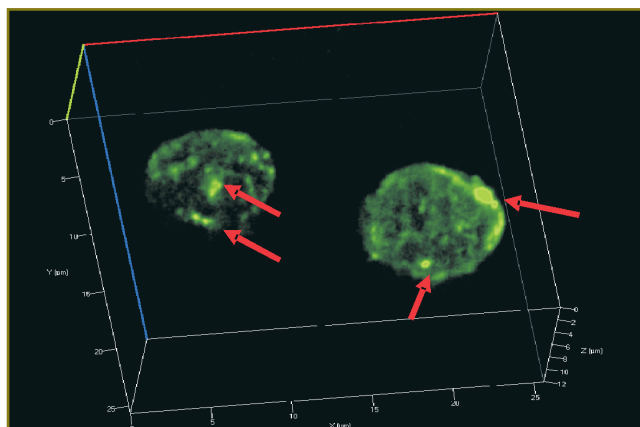


Рис. 5. Реконструкция 3D-модели отдельных микрокапсул, приготовленных из поли(3-гидроксibuтирата) с белком ФИТЦ, меченным бычьим сывороточным альбумином, по методике В/М/В, полученная с помощью конфокального микроскопа. Стрелками показаны участки скопления белка

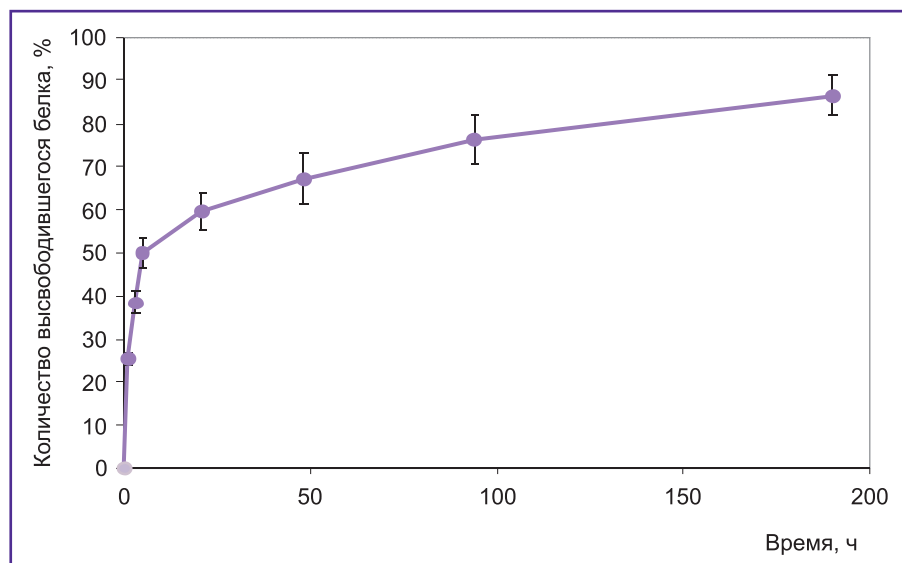


Рис. 6. Кинетический профиль высвобождения белка из микрокапсул поли(3-гидроксibuтирата)

Как видно, эффективность инкапсулирования является довольно низкой — около 1,9%. Это обусловлено особенностями методики, в которой белок, изначально находящийся в виде раствора, подвергается сильным воздействиям. Именно поэтому данная методика может быть в дальнейшем применена лишь для белковых препаратов, получение которых относительно дешево и просто, таких как лизоцим, инсулин и другие. Остальные параметры частиц являются довольно приемлемыми. Значение первичного «взрывного» эффекта, характеризующего начальное взрывное высвобождение белка из полученных частиц, находящееся в районе 50%, означает, что частицы смогут обеспечить как целевую первичную доставку препарата в требуемой дозе, так и последующее длительное поддержание постоянной терапевтической концентрации в окружающей среде [16]. Значение выхода полимерных микроструктур также является приемлемым.

На рис. 6 отчетливо видно, что кинетический профиль высвобождения можно разделить на два этапа. На первом этапе высвобождения (от 0 до 5 ч) определяется «взрывной» эффект, характеризующийся сильным начальным выбросом белка. Предположительно в это время происходит десорбция вещества с поверхности частиц, охарактеризованная ранее. Затем (5–190 ч) наблюдается продолжительное высвобождение белка. Этот временной промежуток представляет собой наибольший интерес, так как процессы, происходящие в нем, и обеспечивают пролонгированное высвобождение БСА из полимерных микрокапсул. Для понимания механизма высвобождения были проведены различные морфологические исследования инкубированных частиц.

Определение механизма длительного высвобождения белка. Итак, как установлено с помощью конфокальной микроскопии, на этапе начального «взрывного» высвобождения белка происходит десорбция несвязанного белка с поверхности капсул. Следующим шагом нашего исследования стало изучение морфологии инкубированных частиц методами сканирующей электронной (рис. 7) и конфокальной (рис. 8) микроскопии. Для этого после завершения опыта по высвобождению

белка *in vitro* образцы частиц были заморожены, а затем лиофилизированы.

Как показано на изображениях, механизм высвобождения белка из микроструктур, полученных с помощью предлагаемой методики, представляет собой разрыв полимерных стенок с дальнейшим выходом белка из него. При этом белок легко выходит в окружающую среду. Более интересны данные, полученные с помощью конфокального микроскопа. На рис. 8 видно отверстие, через которое начал высвобождаться ФИТЦ, меченный БСА. Однако флуоресценция в месте разрыва полимерной оболочки гораздо выше, чем внутри частицы. Это связано, по-видимому, с возникновением дефектов материала, имеющего, как известно, полукристаллическую структуру. В связи с изменением укладки цепей ПГБ адсорбция выходящего белка на материал локально повышается и возникает картина, представленная на микрофотографии, а также на ортогональных проекциях данной микрочастицы. Подобный процесс пока подробно не описан и требует дополнительного изучения.

Определение биосовместимости полученных микрочастиц *in vivo*. Имплантация микрокапсул крысам не вызвала развития у них значительного воспаления или септических очагов. На 7-й день наблюдали увеличение кровоснабжения в месте имплантации и образование соединительнотканной капсулы вокруг микрочастиц.

На гистологических срезах (рис. 9) хорошо заметно формирование капсулы, имеющей толщину 100–150 мкм, которая достигает окончательного размера через 60 дней имплантации. Отмечено также прорастание окружающей ткани между микрочастицами. Присутствие лейкоцитов и фибробластов вокруг микрочастиц говорит об умеренном воспалении и является нормальной реакцией на имплантат, замещающий тканью организма, а также обусловлено процессом деградации полимера [12]. Также к 60-му дню становится хорошо заметно сглаживание поверхности микрокапсул, что говорит о значительной биорезорбции ПГБ. Это хорошо согласуется с результатами, полученными ранее в нашей лаборатории [11].



Рис. 7. Образцы микрокапсул из поли(3-гидроксибутирата) с инкапсулированным белком после проведения опыта *in vitro* в течение 200 ч по данным сканирующей электронной микроскопии

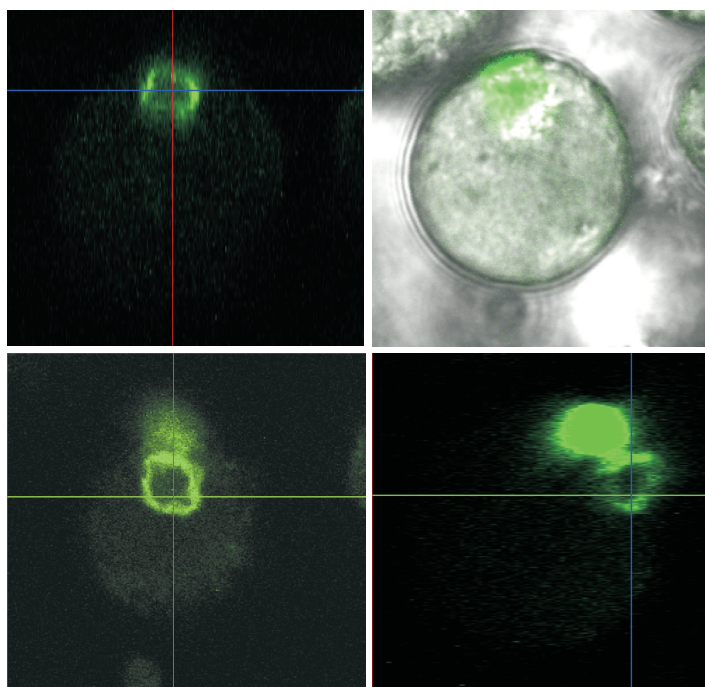


Рис. 8. Микрофотография и ортогональные проекции отдельной микрокапсулы по данным конфокальной микроскопии

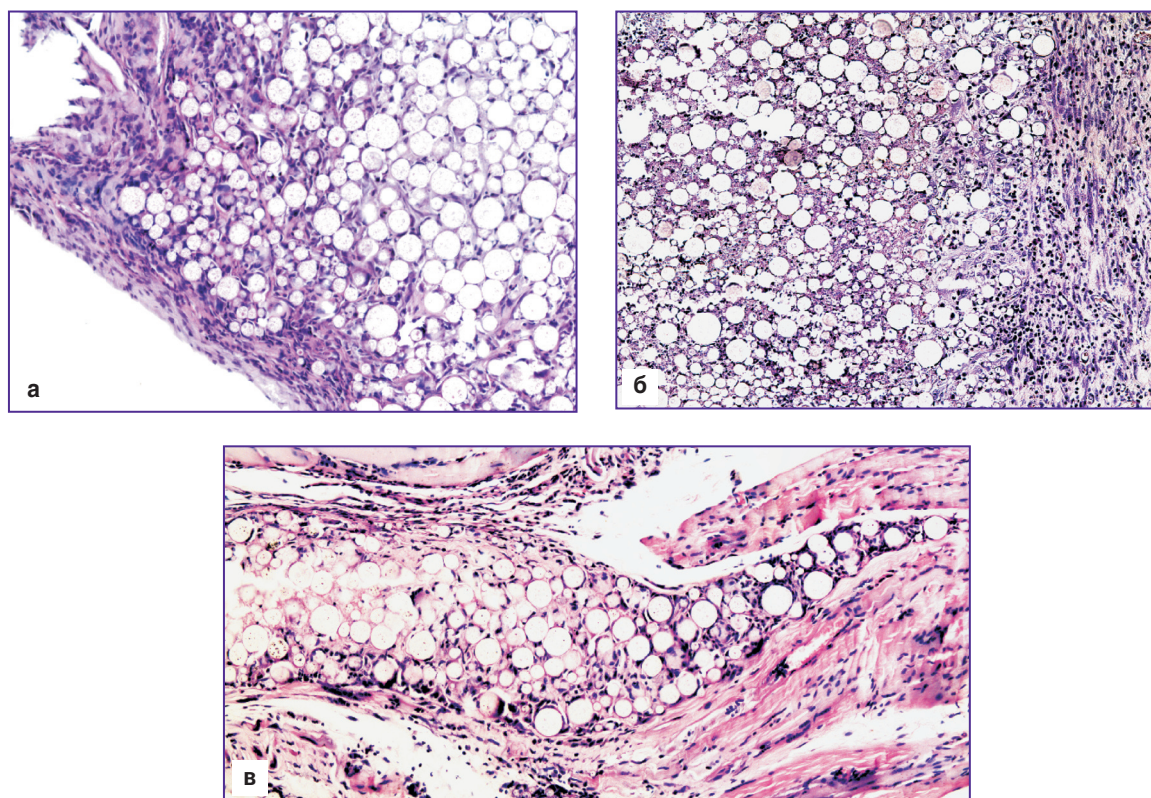


Рис. 9. Микрофотографии участков мышечной ткани непосредственно в месте имплантации микрокапсул спустя 7 дней (а), 21 день (б), 60 дней (в)

Таким образом, микрокапсулы из поли(3-гидроксибутирата), в которые инкапсулирован модельный белок, представляют собой удачный пример создания пролонгированной формы препарата белковой природой.

При этом микрокапсулы показали достаточно хорошие результаты в опытах по биосовместимости *in vivo*. Детальное изучение таких полимерных частиц будет способствовать глубокому осмыслению процесса вы-

свобождения белков из них, лучшему пониманию реакции организма на систему высвобождения модельного белка, а также позволит выбрать правильное направление дальнейшего развития исследований по данной тематике.

Заключение. Разработанная система пролонгированного высвобождения белков, основанная на использовании в качестве микрокапсул нового биоразлагаемого полимера — поли(3-гидроксибутирата), а в качестве модельного белка — бычьего сывороточного альбумина, может служить основой для создания новых лекарственных форм терапевтических белков.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда, соглашение №15-15-10014 от 01.06.2015 г.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate), polylactide and their derivatives: kinetics, crystallinity, and surface morphology. *Mol Cryst Liq Cryst* 2012; 556(1): 288–300, <http://dx.doi.org/10.1080/15421406.2012.635982>.
- Artsis M.I., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate). *Mol Cryst Liq Cryst* 2010; 523(1): 21/[593]–49/[621], <http://dx.doi.org/10.1080/15421401003726519>.
- Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2011; 5(1): 10–21, <http://dx.doi.org/10.1134/S1990750811010045>.
- Livshits V.A., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Ivanov E.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A. Microspheres based on poly(3-hydroxybutyrate) for prolonged drug release. *Polymer Science Series B* 2009; 51(7–8): 256–263, <http://dx.doi.org/10.1134/s1560090409070082>.
- Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Luchinina E.S., Livshits V.A., Boskhomdzhev A.P., Markin V.S., Iordanskii A.L. New poly(3-hydroxybutyrate)-based systems for controlled release of dipyrindamole and indomethacin. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2006; 42(6): 625–630, <http://dx.doi.org/10.1134/s0003683806060159>.
- Filatova E.V., Yakovlev S.G., Bonartsev A.P., Makhina T.K., Myshkina V.L., Bonartseva G.A. Prolonged release of chlorambucil and etoposide from poly-3-oxybutyrate-based microspheres. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2012; 48(6): 598–602, <http://dx.doi.org/10.1134/s000368381206004x>.
- Andreas K., Zehbe R., Kazubek M., Grzeschik K., Sternberg N., Bäuml H., Schubert H., Sittlinger M., Ringe J. Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2011; 7(4): 1485–1495, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.014>.
- Wang Y., Wang X., Wei K., Zhao N., Zhang S., Chen J. Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. *Materials Letters* 2007; 61(4–5): 1071–1076, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2006.06.062>.
- Maysinger D., Filipović-Grčić J., Alebić-Kolbah T. Preparation, characterization and release of microencapsulated bromodeoxyuridine. *Life Sciences* 1994; 54(1): 27–34, [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00574-5](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(94)00574-5).
- Zharkova I.I., Efremov Yu.M., Bagrov D.V., Zernov A.L., Andreeva N.V., Shaitan K.V., Bonartsev A.P., Boschomjiev A.P., Makhina T.K., Myshkina V.L., Voinova V.V., Yakovlev S.G., Filatova E.V., Ivanov E.A., Bonartseva G.A. The effect of poly(3-hydroxybutyrate) modification by poly (ethylene glycol) on the viability of cells grown on the polymer films. *Biomeditsinskaja khimiia* 2012; 58(5): 579–591, <http://dx.doi.org/10.18097/pbmcc20125805579>.
- Boskhomdzhev A.P., Bonartsev A.P., Makhina T.K., Myshkina V.L., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Filatova E.V., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A. Biodegradation kinetics of poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2010; 4(2): 177–183, <http://dx.doi.org/10.1134/s1990750810020083>.
- Sundback C., Shyu J., Wang Y., Faquin W., Langer R., Vacanti J., Hadlock T. Biocompatibility analysis of poly (glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5454–5464, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.004>.
- Bonartsev A., Yakovlev S., Boskhomdzhev A., Zharkova I., Bagrov D., Myshkina V., Mahina T., Kharitonova E., Samsonova O., Zernov A., Zhukov V., Efremov Y., Voinova V., Bonartseva G., Shaitan K. The terpolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B: effect of surface properties on cell attachment. *Plos One* 2013; 8(2): e57200, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057200>.
- Geng Y., Yuan W., Wu F., Chen J., He M., Jin T. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J Control Release* 2008; 130(3): 259–265, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.06.011>.
- Liu Y.-X., Chen E.-Q. Polymer crystallization of ultrathin films on solid substrates. *Coord Chem Rev* 2010; 254(9–10): 1011–1037, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.02.017>.
- Blanco-Prieto M.J., Campanero M.A., Besseghir K., Heimgatner F., Gander B. Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. *J Control Release* 2004; 96(3): 437–448, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.015>.