

ІІТМО

Е.В. Федотова
РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.
УРОВЕНЬ ПЕРВЫЙ



Санкт-Петербург
2026

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Е.В. Федотова
РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.
УРОВЕНЬ ПЕРВЫЙ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
студентам бакалавриата, обучающимся по направлению подготовки 12.03.04
«Биотехнические системы и технологии»; студентам магистратуры,
обучающимся по направлению подготовки 12.04.04 «Биотехнические системы
и технологии»; а также преподавателям, ведущим теоретические и
лабораторные занятия по курсам «Полимеры в регенеративной медицине»,
«Фармацевтическая химия», «Smart-материалы в биоинженерии»,
«Биоактивность материалов»

ИТМО

Санкт-Петербург
2026

Разработка систем доставки лекарственных средств. Уровень первый / Федотова Е.В. – СПб: Университет ИТМО, 2026. – 47 с.

Рецензент: Криворотов Денис Викторович, кандидат химических наук, заведующий лабораторией химического моделирования Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства» (ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России).

Учебно-методическое пособие адресовано студентам бакалавриата, обучающимся по направлению подготовки 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»; студентам магистратуры, обучающимся по направлению подготовки 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии»; а также преподавателям, ведущим теоретические и лабораторные занятия по курсам «Полимеры в регенеративной медицине», «Фармацевтическая химия», «Smart-материалы в биоинженерии», «Биоактивность материалов».



ИТМО (Санкт-Петербург) — национальный исследовательский университет, научно-образовательная корпорация. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию. Приоритетные направления: ИТ и искусственный интеллект, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication.

Лидер федеральной программы «Приоритет-2030», в рамках которой реализуется программа «Университет открытого кода». С 2022 ИТМО работает в рамках новой модели развития — научно-образовательной корпорации. В ее основе академическая свобода, поддержка начинаний студентов и сотрудников, распределенная система управления, приверженность открытому коду, бизнес-подходы к организации работы. Образование в университете основано на выборе индивидуальной траектории для каждого студента.

ИТМО пять лет подряд — в сотне лучших в области Automation & Control (кибернетика) Шанхайского рейтинга. По версии SuperJob занимает первое место в Петербурге и второе в России по уровню зарплат выпускников в сфере ИТ. Университет в топе международных рейтингов среди российских вузов. Входит в топ-5 российских университетов по качеству приема на бюджетные места. Рекордсмен по поступлению олимпиадников в Петербурге. С 2019 года ИТМО самостоятельно присуждает ученые степени кандидата и доктора наук.

© Университет ИТМО, 2026

© Федотова Е.В., 2026

Содержание

Тема 1. Обзор известных систем доставки на основе полимеров	7
Тема 2. Разработка микрокапсул методом полиэлектролитной сборки (Layer-by-layer)	10
Тема 3. Получение микрочастиц на основе PLGA	13
Тема 4. Получение разветвленных полимерных носителей	18
Тема 5. Получение липосомальных препаратов	23
Тема 6. Исследование высвобождения из носителей в имитаторы сред организма	29
Тема 7. Эритроциты – носители лекарственных веществ	34
Тема 8. Исследование токсичности разработанных систем доставки в экспериментах <i>in-vivo</i>	37
Список литературы	44

Предисловие

Учебно-методическое пособие адресовано студентам бакалавриата, обучающимся по направлению подготовки 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»; студентам магистратуры, обучающимся по направлению подготовки 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии»; а также преподавателям, ведущим теоретические и лабораторные занятия по курсам «Полимеры в регенеративной медицине», «Фармацевтическая химия», «Smart-материалы в биоинженерии», «Биоактивность материалов». Данная дисциплина опирается на элементы компетенций, сформированные при изучении дисциплин «Основы токсикологии материалов», «Общая и неорганическая химия», «Органическая химия», «Физика полимеров», «Фармацевтическая химия», «Химия полимеров».

Учебно-методическое пособие состоит из 8 основных разделов. Каждый раздел включает в себя практическое задание или лабораторную работу и сопровождается кратким лекционным предисловием по теме предмета.

Учебный план дисциплин, для которых рекомендовано пособие, предусматривает чтение лекций и проведение практических занятий, а также самостоятельную работу студентов. Лекционный курс рекомендуемых дисциплин включает в себя изучение теоретических основ конструирования полимерных носителей микронного размера для доставки лекарственных веществ и исследованию их физико-химических свойств. Практические и лабораторные работы нацелены на приобретение практических навыков.

По окончании изучения практического курса студенты смогут получать из полимеров медицинские субстанции различных морфологических форм, оценивать биодеструкцию полимеров в разных условиях сред, оценивать включение и высвобождение вещества из полученных систем, снимать спектры физиологически активных высокомолекулярных веществ и определять их концентрацию в растворе, оценивать растворимость, биodeградацию и другие свойства медицинских полимерных материалов, работать на современной учебно-научной аппаратуре при проведении химических экспериментов. Компетенции, освоенные при изучении данной дисциплины, позволят самостоятельно получать носители для различных биологически активных веществ.

Термины и определения

Биодоступность – доля (в процентном выражении) вводимой дозы медицинского препарата, которая попадает в кровоток (систему кровообращения) в неизмененном виде.

Вспомогательные вещества – вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Микрокапсулы – дозированная лекарственная форма размера от 1 мкм до 1000 мкм, содержащая одно или несколько действующих веществ различной консистенции, с добавлением или без вспомогательных веществ, заключенных в оболочку.

Лекарственная форма – состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта.

Лекарственные препараты – лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности.

Лекарственные средства, лекарственные вещества (ЛВ) – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Полимеры — вещества, состоящие из «мономерных звеньев», соединённых в длинные макромолекулы химическими связями.

Путь введения – способ доставки лекарственного средства в организм человека или животного.

Системы терапевтические – лекарственная форма, представляющая собой систему доставки и специфического высвобождения действующего вещества (веществ) в течение определённого, как правило, продолжительного периода времени. Высвобождение действующего вещества (веществ) из системы терапевтической осуществляется запрограммированным образом.

Тема 1. Обзор известных систем доставки на основе полимеров

Фармацевтическую технологию по праву можно назвать одной из древних наук, появившихся в нашем обществе. С древних времен люди использовали лекарственные растения и яды животных для лечения различных заболеваний. Эти вещества со временем старались адаптировать в формы, более удобные и эффективные, для применения. Так стали появляться первые системы доставки – пилюли. А уже в X веке Авиценна первым начал покрывать пилюли золотом и серебром. Впоследствии Ар-Рази (Разес) использовал для покрытия пилюль уже более биосовместимые оболочки из семян подорожника и айвы. Покрытия работали как барьер, не давая лекарству раствориться сразу во время приема. Затем ученые отметили, что нанесение оболочек позволяет замедлять скорость высвобождения активного вещества. Так мир узнал первую систему доставки с контролируемым высвобождением.

Развитие науки привело к тому, что в настоящее время фармтехнологам доступно большое разнообразие систем доставки для биологически активных веществ.

Системы доставки – носители для биологически активных веществ (формы), используемые для их введения в организм с целью обеспечения терапевтической дозы вещества, а также повышающие их эффективность. Наиболее распространенные традиционные для современной фармакологии системы доставки представлены на рисунке 1.



Рисунок 1 – Традиционные системы доставки для лекарственных веществ и их ограничения

Системы доставки нового поколения (drug delivery systems, DDS) появились в 1952 году. Именно тогда миру была представлена первая капсула с технологией замедленного действия под коммерческим названием Spansule®. Она позволила доставлять лекарственное вещество в течение 12 часов после приема внутрь. Часть дозы высвобождалась сразу, затем оставшаяся доза

высвобождалась постепенно. После этого фармацевтическая технология (вплоть до 1980-х годов) активно разрабатывала пероральные и трансдермальные препараты, обеспечивающие терапевтическое действие до 24 часов.

Следующей вехой стало появление Lupron Depot®. Именно тогда в 1989 году стала возможной разработка имплантируемых препаратов длительного действия. Это был прорыв, который расширил представление фармтехнологов о «пролонгах». С этого момента продолжительность доставки лекарств уже могла составлять не нескольких дней, а несколько месяцев и в теории даже нескольких лет.

Следующей вехой в фармацевтической технологии стало пегилирование. Первый пегилированный белок Adagen® в 1990 году произвел настоящую революцию, поскольку доказал возможность разработки систем доставки для белков и пептидов. Результатами данного направления стали доксорубицин в пегилированной липосоме (известен как Doxil®), пегилированный налоксон - налоксегол (Мовантик®) и миРНК в пегилированных липидных наночастицах (Onpattro®).

На сегодняшний день разработка систем доставки для различных биологически активных веществ подарила нам огромное разнообразие носителей практически под любые задачи, стоящие перед разработчиками (Рис. 2). Современные системы доставки имеют размеры «от нано до макро» и позволяют:

1. Повысить биодоступность биологически активных веществ;
2. Усовершенствовать фармакокинетику и фармакодинамику лекарственного вещества;
3. Повысить терапевтическую эффективность действующего вещества;
4. Защитить действующее вещество от воздействия разрушительных факторов организма (среды ЖКТ, а также действие ферментов);
5. Снизить токсичность препарата и обеспечить его биосовместимость;
6. Минимизировать побочные действия продуктов метаболизма действующего вещества;
7. Преодолеть биологические барьеры (например, ГЭБ);
8. Обеспечить стабильную концентрацию препарата в организме;
9. Контролировать высвобождение действующего вещества, а также возможность тераностики;
10. Получать удобные формы введения под необходимую задачу и персонализированно под пациента.

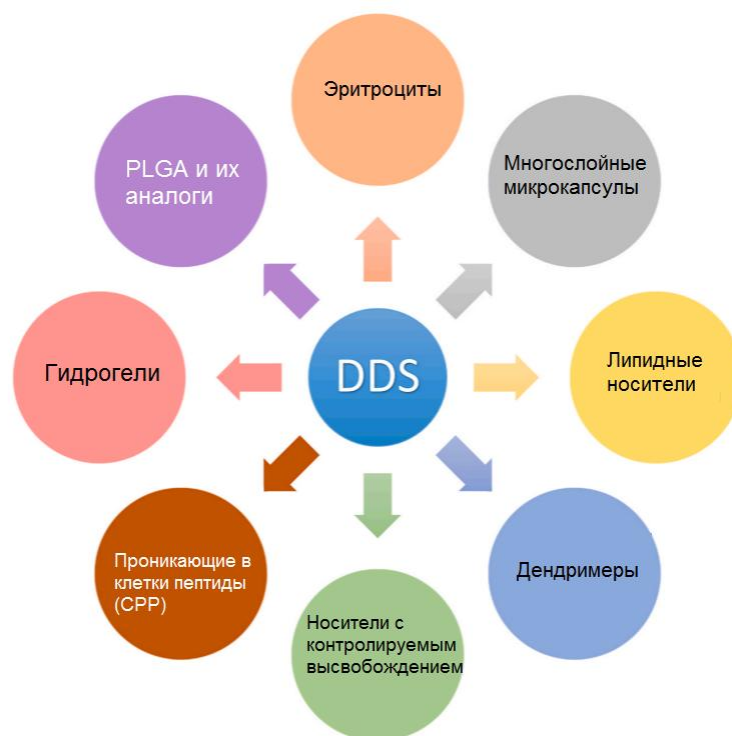


Рисунок 2 – Системы доставки лекарственных веществ нового поколения

В состав большинства современных систем доставки входят полимеры. Изначально полимеры, выбранные для применения в фармацевтической технологии, можно разделить по химическому строению и источнику получения на природные и синтетические. К применению допускаются полимеры независимо от их источника получения. Наиболее важен отбор по их воздействию на организм. В фармацевтической технологии возможно применение как биологически инертных, так и биологически активных полимеров. Однако они обязательно должны быть биологически совместимыми (то есть не оказывать токсического, канцерогенного, мутагенного действий на организм).

Основные свойства полимеров, которые важно учитывать при создании систем доставки лекарственных препаратов, включают:

- молекулярную массу, поскольку она влияет на скорость деградации и высвобождения вещества из системы доставки;
- гидрофобность или гидрофильность полимеров, поскольку они определяют биодоступность и взаимодействие с тканями организма;
- поверхностный заряд, поскольку от него зависит захват частиц клетками, прохождение через мембраны и устойчивость в растворе;
- кристалличность, поскольку она влияет на проницаемость системы доставки и скорость ее деструкции;
- состав сополимеров, если такие присутствуют в системе;
- температура стеклования, которая обеспечивает стабильность и прочность полимера при физиологических условиях;

- а также свойства сопутствующих модифицирующих компонентов (векторы, флуоресцентные и радиоактивные метки и т.д.), которые помогают обеспечить таргетную доставку или обеспечить визуализацию системы в организме.

Лабораторная работа «Введение биологически активного вещества в состав двойной эмульсии вода/масло/вода»

Задача. Освоить методику формирования двойной эмульсии вода/масло/вода.

Реактивы и оборудование: гомогенизатор, лабораторные весы, стакан химический на 25 мл, стакан химический на 15 мл – 3 шт, вода, автоматическая пипетка на 10 мл, твин 80, span 80, жидкий парафин, гидроксипроилметилцеллюлоза (ГПМЦ), родамин Б (или любое другое модельное красящее вещество).

Ход работы:

Формирование двойной эмульсии вода/масло/вода происходит в два этапа: сперва формируется первичная эмульсия вода/масло, а затем первичная эмульсия добавляется во внешнюю среду (водная среда).

Для приготовления первичной эмульсии В/М (вода в масле) воспользуйтесь таблицей.

Компонент	Количество
Жидкий парафин	10 мл
Span 80	1-2 г (10-20% от парафина)
Вода дистиллированная	2-4 мл

Смешать на магнитной мешалке Span 80 и жидкий парафин. Медленно добавить водную фазу (вода с растворенным в ней бычьим сывороточным альбумином в выбранной концентрации) к масляной фазе при гомогенизации со скоростью 5000-10000 об/мин. Оставить перемешиваться в течение 15 минут до получения однородной вязкой эмульсии.

Растворить Твин 80 в дистиллированной воде в количестве 2 г на 20 мл воды. Медленно добавить первичную эмульсию в полученную внешнюю водную фазу с Твин 80 при мягком перемешивании на 300-500 об/мин. Оставить мешаться на 15 минут.

Оценить визуально полученный результат и написать отчет о проделанной работе.

Тема 2. Разработка микрокапсул методом полиэлектролитной сборки (Layer-by-layer)

Разработка микрокапсул, состоящих одновременно из нескольких оболочек, – интересный подход, позволяющий модифицировать кинетику высвобождения в зависимости от среды организма. Для этого часто используют

методику полиэлектролитной сборки, известную также как Layer-by-layer (то есть слой за слоем).

Изначально данный метод применялся для формирования полимерных пленок, состоящих из двух и более различных полимеров. На заряженную подложку наносили полимер противоположного заряда. Для этого обычно подложка опускалась в раствор полимера на определенное время (как правило, на 15 минут), затем подложку промывали водой от не присоединенного к ней полимера. Полимер электростатически взаимодействовал с противоположно заряженной подложкой, образуя первый слой уже с другим поверхностным зарядом. Затем подложка опускалась в другой полимер с зарядом, противоположным заряду первого слоя. Средняя толщина слоя может составлять до нескольких нанометров. Так, последовательно нанося слой за слоем, можно сформировать пленку, состоящую из различных полимеров, обладающую разнообразным набором физико-химических свойств.

Данная концепция послужила идеей для разработки многоуровневых многокомпонентных микро- и нанокапсул. Однако методика претерпела ряд изменений, и вместо заряженной подложки стали использовать пористое сферическое ядро (например, из карбоната кальция). Изначально возможны три варианта микрочастиц CaCO_3 : ватерит (сферическая форма, пористая структура), кальцит (кубическая форма, непористая структура) и арагонит (иглообразная форма, непористая структура). В качестве ядра используются только ватериты (Рис.3). Для получения ватеритов к 0.33М раствору хлорида кальция приливали при постоянном перемешивании (600 об/мин) 0.33М раствор карбоната натрия. Осадок собирали, промывали и на него последовательно наносили слои полимеров. Биологически активное вещество может быть введено в само ядро на этапе его формирования. Для этого его нужно растворить в одном из растворов (Na_2CO_3 или CaCl_2). Другой вариант – включение в полимерную оболочку в процессе ее формирования. В этом случае вещество либо растворяется в полимере и наносится вместе с ним на ядро, либо ковалентно пришивается к слою через специальные линкеры.

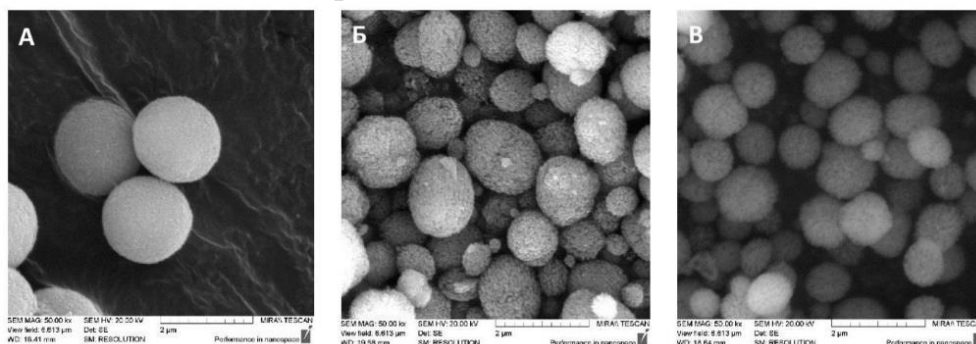


Рисунок 3 - СЭМ-фотографии ядер из CaCO_3 субмикронного размера: а – формирование ядер в ЭГ в течение 30 мин, б – формирование ядер в ЭГ в течение 2 часов, в – формирование ядер в ЭГ в течение 4 часов

Для получения наноядра используют ультразвуковое воздействие (например, ультразвуковую гомогенизацию), либо в растворы хлорида кальция и карбоната натрия вводится этиленгликоль.

Дальнейшие свойства микрокапсулы зависят от физико-химических свойств полимеров, которые их образуют. В формировании оболочек могут участвовать как природные, так и синтетические полимеры. Главные два критерия – это их биосовместимость и биodeградируемость. Для формирования оболочки за счет электростатического взаимодействия используют полимеры-поликатионы, полимеры-полианионы и полиамфолиты (т.е. полимеры, которые могут иметь два разных заряда). Одной из наиболее распространенной парой разноименно заряженных полимеров, широко применяемых в данном методе, являются полистирол сульфонат и поли(аллил)амин гидрохлорид (Рис. 4). Однако встречается и вариация из декстран сульфата и поли(аллил)амин гидрохлорида. Среди природных полимеров наиболее часто используют пару альгинат натрия и хитозан, а также альгинат натрия и желатин.

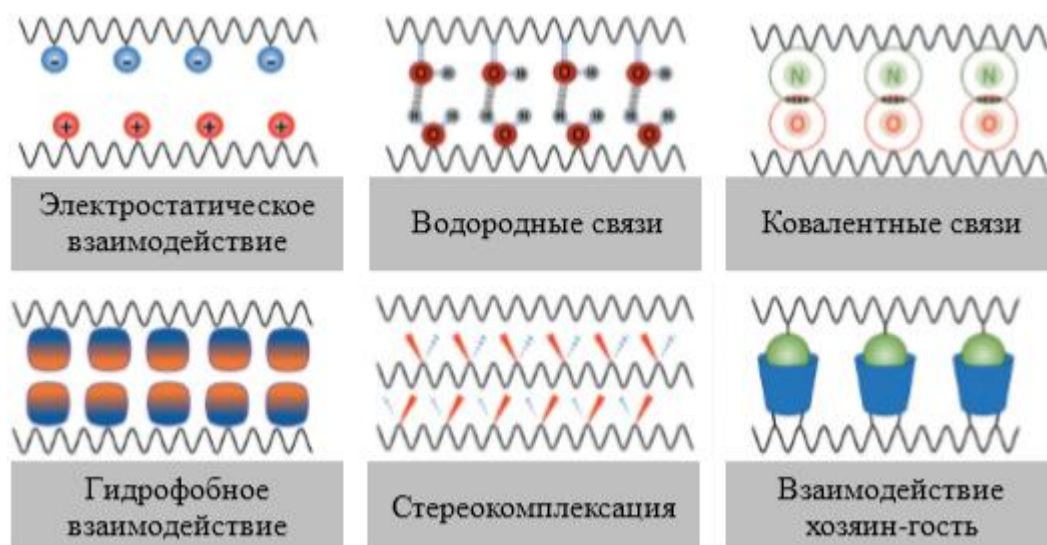


Рисунок 4 - Макромолекулярные взаимодействия между полимерами в ходе формирования оболочки капсулы

Формирование оболочки может происходить и за счет водородного взаимодействия пар полимеров. Наиболее известные полимеры, образующие оболочки по такому принципу - полиметакриловая кислота (ПМАК) и поли(N-винилпирролидон) (ПВП), а также дубильная кислота и поли-2-п-пропил-2-оксазолин (PnProrOx). Поли(ε-капролактон) формирует оболочки за счет гидрофобных взаимодействий с некоторыми пептидами. В некоторых случаях можно сшить оболочки ковалентно при помощи линкера.

Лабораторная работа «Получение полимерных микрокапсул из разноименно заряженных биополимеров методом полиэлектролитной сборки»

Задача. Получить микрокапсулы из предложенных полимеров, используя метод полиэлектролитной сборки.

Реактивы и оборудование: хлорид кальция, карбонат натрия, альгинат натрия, хитозан, уксусная кислота, ЭДТА, магнитная мешалка, лабораторный шейкер, лабораторные весы, рН-метр, бюкс на 10 мл, вода, центрифуга, фильтр Шотта (S3, размер пор 16 – 40 мкм), автоматическая пипетка на 10 мл.

Ход работы:

Раствор хитозана в концентрациях 0,5% приготовить путем растворения сухой навески в 1%-ном растворе уксусной кислоты. При помощи рН-метра измерить рН полученного раствора.

Приготовить основу для нанесения полимерных слоев – кальций-карбонатное ядро.

Для получения ватеритов карбоната кальция микронного размера необходимо приготовить по 10 мл 0,33М водных растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 . При постоянном перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 400 об/мин к раствору Na_2CO_3 прикапывать раствор CaCl_2 . Раствор оставить перемешиваться в течение 15 минут. Затем отфильтровать полученную смесь через фильтр Шотта, а затем промыть троекратно водой. Ядра, оставшиеся на фильтре, высушить в сушильном шкафу при температуре 40°C. При помощи микроскопа оценить полученный результат.

Навеску ядер залить 10 мл водного раствора альгината натрия (концентрация 0,5%) и оставить на 15 минут на лабораторном шейкере. Затем их центрифугировать 3 минуты при 4000 об/мин, супернатант удалить, ядра промыть 10 мл воды и снова центрифугировать. После удаления супернатанта ядра залить 10 мл водного раствора хитозана (концентрация 0,5%). Затем их центрифугировать 3 минуты при 4000 об/мин, супернатант удалить, ядра промыть 10 мл воды и снова центрифугировать. После удаления супернатанта повторить нанесение слоя альгината натрия. Для образования капсулы количество нанесенных слоев должно быть не менее 5 пар.

После нанесения необходимого числа слоев ядро растворить. Для этого ядра залить 0,2 М раствором ЭДТА и оставить при постоянном перемешивании на 300 об/мин на 2 часа. После этого раствор центрифугировать в течение 10 минут при 4000 об/мин, а супернатант удалить пипеткой. При помощи микроскопа оценить полученный результат.

Тема 3. Получение микрочастиц на основе PLGA

Поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) — биоразлагаемый и биосовместимый синтетический полимер, активно применяющийся в биомедицинских целях: разработка носителей для доставки лекарственных веществ, производство

имплантатов, а также в тканевой инженерии. PLGA одобрен FDA и EMA для парентерального введения. Полимерные имплантаты представляют собой один из перспективных методов контролируемой доставки лекарственных препаратов, обеспечивая пролонгированное и целенаправленное высвобождение активных веществ в организме. Использование биodeградируемых материалов, таких как PLGA, позволяет не извлекать имплантат после завершения терапии, поскольку со временем он полностью разлагается в организме. В таблице 1 представлен список некоторых коммерческих лекарственных препаратов на основе микрочастиц PLGA.

Таблица 1 - Список коммерчески доступных лекарственных препаратов PLGA микрочастиц

Торговое название	Активный компонент	Путь введения
Trelstar®	Трипторелин памоат	Подкожный
Arestin®	Миноциклин	Пародонтальный
Lupron Depot®	Лейпролид ацетат	Подкожный
Vivitrol®	Налтрексон	Подкожный
Risperdal®	Рisperидон	Подкожный

Время циркуляции микросфер из PLGA в кровотоке *in vivo* определяется их физико-химическими свойствами: размером, поверхностным зарядом и сродством к тем или иным тканям. Такие физические свойства как молекулярная масса и индекс полидисперсности, оказывают влияние на механическую прочность полимера и полученной из него системы доставки. Структура и физико-химические свойства PLGA зависят от молярного соотношения мономеров (лактид:гликолид), молекулярной массы и типа концевых групп (кислотных или эфирных). Наибольшая скорость деструкции в организме за счет гидролитического распада эфирных связей достигается у систем доставки, полученных из PLGA с соотношением мономеров 50:50. Сперва происходит разрыв полимерной цепи, который приводит к снижению значения молекулярной массы полимера. Затем образуются растворимые олигомеры и мономеры, которые могут образовывать растворимые олигомерные фрагменты. Впоследствии эти растворимые фрагменты подвергаются метаболизму с образованием воды и углекислого газа.

Известно несколько методик получения микрочастиц из PLGA: метод одиночной и двойной эмульсии, метод коацервации, а также распылительная сушка.

Метод выпаривания основан на формировании эмульсии масло/вода. Для этого полимер растворяют в летучем органическом растворителе (например, дихлорметан). Затем в раствор полимера вводится гидрофобное лекарственное средство. Затем полученный раствор эмульгируется в водном растворе поливинилового спирта. Таким образом формируется водная эмульсия,

содержащая лекарственное вещество. Одним из недостатков этого метода является низкая эффективность инкапсулирования умеренно растворимых и водорастворимых лекарственных средств. Поэтому наиболее часто, чтобы увеличить включение водорастворимых лекарственных средств, используют метод эмульгирования «масло в масле». Для этого используется смешивающийся с водой органический растворитель, например, ацетонитрил. Растворенные в ацетонитриле PLGA и лекарственное вещество затем диспергируют в масле в присутствии маслорастворимого поверхностно-активного вещества (например, Span) и получают эмульсию.

Метод двойной эмульсии "вода в масле в воде" более подходит для инкапсулированных гидрофильных пептидов, белков и вакцин. Для этого водный раствор лекарственного средства добавляют к органической фазе. Органическая фаза включает в себя PLGA, растворенный в дихлорметане. Затем при интенсивном перемешивании в полученную эмульсию добавляют водный раствор ПВА. В ряде случаев для инкапсулирования белковых/пептидных препаратов рекомендуется вводить такие гидрофильные стабилизаторы, как Pluronic F68, PEG 4600, бычий сывороточный альбумин или глутамат натрия.

Метод коацервации считается наиболее распространенным методов получения частиц PLGA (Рис. 5).

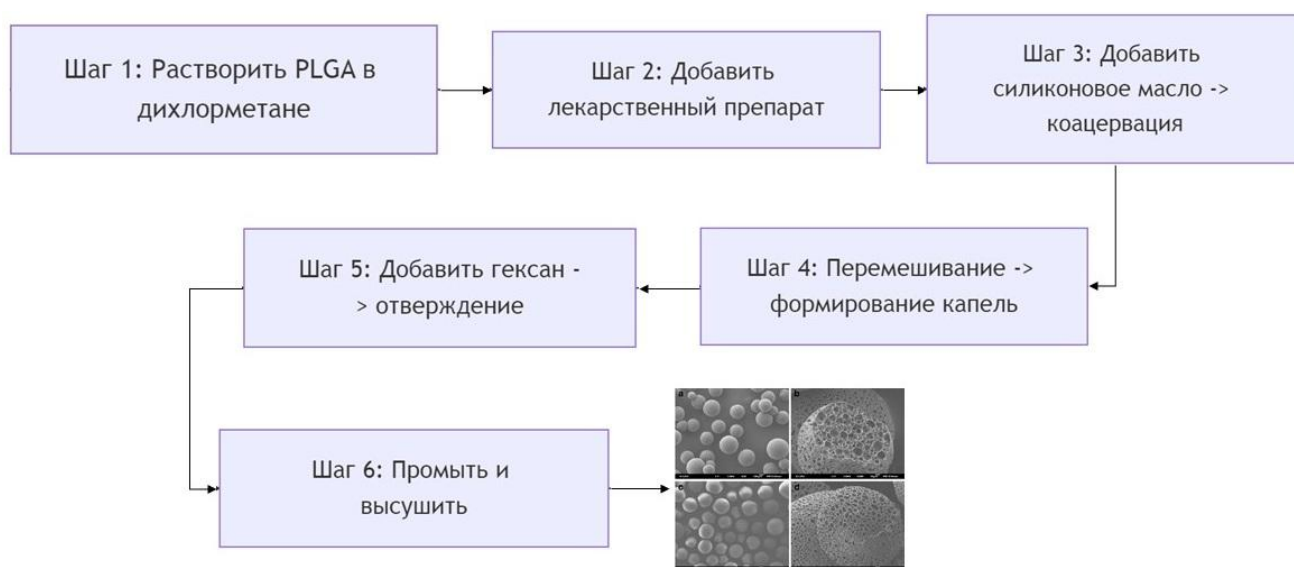


Рисунок 5 – Схема получения PLGA частиц методом коацервации

Метод коацервации основан на фазовом разделении раствора PLGA за счет введения органического осадителя. В качестве осадителя могут выступать силиконовое масло или жидкий парафин. Включаемый препарат растворяют в растворе полимера, затем добавляют осадитель. Осадитель удаляется гептаном или петролейным эфиром. Полученные микрочастицы собирают на фильтре Шотта (или центрифугированием) и сушат.

Для получения микрочастиц методом распылительной сушки биополимер PLGA растворяют в органических растворителях — дихлорметане, хлороформе или этилацетате. Предпочтение отдаётся дихлорметану, поскольку у него высокая растворяющая способность, низкая температура кипения (40 °С) и наименьшая токсичность среди галогенированных растворителей.

В настоящее время рынок распылительных сушилок весьма разнообразен. Одной из наиболее известных является Nano Spray Dryer B-90 — нано-распылительная сушилка от компании Buchi, используемая для исследований с малыми количествами образцов и предназначенная для работы с органическими растворителями (Рис. 6). Размер частиц продукта варьируется от 300 нм до 5 мкм, с выходом до 90%. Скорость испарения по воде — 0,2 л/час. Объем распыляемого образца от 1 мл до 200 мл.

Метод распылительной сушки включает в себя 5 этапов: приготовление распыляемого образца, его последующее распыление через форсунку, образование капель и их взаимодействие с горячим воздухом, последующее высушивание распыляемых капель и дальнейший сбор высушенных частиц.

Осушающий газ поступает ламинарным потоком сверху в сушильную камеру и нагревается до заданной температуры. Распыление раствора происходит через распылительную форсунку. Ультразвуковое распыление происходит на частоте 60 кГц для гомогенного каплеобразования. Для распыления коммерчески доступны три различных распылительных форсунки (Таблица 2).

Таблица 2 - Характеристика распылительных форсунок

Форсунка, мкм	Размер капли, мкм	Скорость подачи растворителя, мл/час
4	8	20
5.5	15	60
7	21	150

Контакт капли с воздухом происходит в сушильной камере сразу после распыления сырья в три основных этапа:

1. Поток горячего воздуха передает тепловую энергию каплям и испаряет из них влагу;
2. За счет испарения температура мгновенно падает;
3. Охлажденный воздух переносит частицы вдоль системы.



Рисунок 6 – Схема распылительной суши Buchi Nano Spray Dryer B-90

Высохшие твердые частицы заряжаются, попадая в электростатическое поле коллектора частиц, и осаждаются на нем. Осушающий газ покидает сушильную камеру, проходя через фильтр, на выходе измеряется его температура. Затем частицы собираются специальным шпателем.

Лабораторная работа «Получение микрочастиц на основе PLGA (50:50) и поливинилового спирта»

Задача. Получить микрокапсулы из PLGA (50:50) и поливинилового спирта.

Реактивы и оборудование: магнитная мешалка, деионизованная вода, сушильный шкаф, круглодонная колба, роторный испаритель, два бюкса на 50 мл, хлороформ, лабораторные весы, микроскоп, PLGA (50:50), поливиниловый спирт, автоматическая пипетка на 10 мл.

Ход работы:

Навеску 100 мг PLGA растворить в 4 мл хлороформа. Затем в полученный раствор добавить навеску предложенного вам капсулируемого вещества. Органическую фазу эмульгировать в 40 мл 1% (по массе) водного раствора ПВС. Полученную смесь перемешивать при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Полученную эмульсию выпаривать при помощи роторного испарителя. После выпаривания хлороформа и образования осадка, полученный осадок (микросферы) трижды промыть деионизированной водой, отфильтровать и высушить в сушильном шкафу.

Оценить визуально на микроскопе полученный результат и написать отчет о проделанной работе.

Тема 4. Получение разветвленных полимерных наноносителей

Разветвленные полимеры – особый класс полимеров, активно используемый сегодня при создании систем доставки. К таким полимерам относятся в первую очередь дендримеры и дендриграфты. Дендримеры – трехмерные разветвленные древоподобные монодисперстные полимеры, имеющие уникальную и стабильную структуру, а также постоянные заряд и размер. Уникальность свойств дендримеров обусловлена радиальной симметрией их молекул и высокоупорядоченной структурой. Носитель способен образовывать хорошо охарактеризованные комплексы с различными гидрофильными и гидрофобными препаратами. Дендример состоит из ядра, ветвей и функциональных групп (Рис. 7). Ядро дендримера может состоять как из одного атома, так и группы атомов. По типу концевых групп дендример может быть положительно заряженным (NH_2 группы на конце), отрицательно заряженным (COOH группы на конце) и нейтрально заряженным (OH группы на конце).

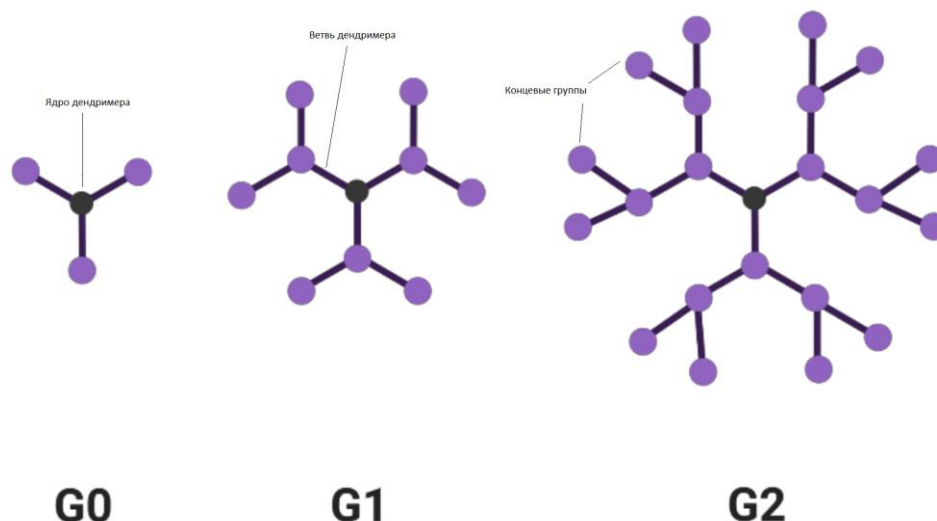


Рисунок 7 – Строение дендримера

В отличие от более известных синтетических полимеров, строение дендримера можно контролировать в ходе его синтеза. В ходе синтеза можно получать как симметричные, так и асимметричные носители. Как правило, они все имеют размеры от 1,1 нм и выше в зависимости от числа стадий синтеза (поколения) и строго фиксированную молекулярную массу. Известны два способа получения дендримерного носителя – дивергентный и конвергентный (Рис. 8, 9). Перед синтезом предельные размеры, конфигурацию и молекулярно-массовые характеристики будущего дендримера можно предсказать теоретически при помощи математического моделирования или специальных программ предикторов.

Дивергентный метод основан на взаимодействии точки ветвления только с функциональной группой мономера. Точки ветвления мономера неактивны, поэтому они не взаимодействуют друг с другом (Рис. 8). Далее концевые группы будущего дендримера активируются, и на них наращивают следующий мономер. В каждой точке ветвления происходит деление на две ветви, и соответственно на каждой стадии синтеза молекулярная масса увеличивается примерно в два раза. Известны два недостатка данного метода: ограничение максимального числа поколений вследствие постепенного заполнения поверхности концевыми группами и вероятность накопления дефектов по мере увеличения поколения.

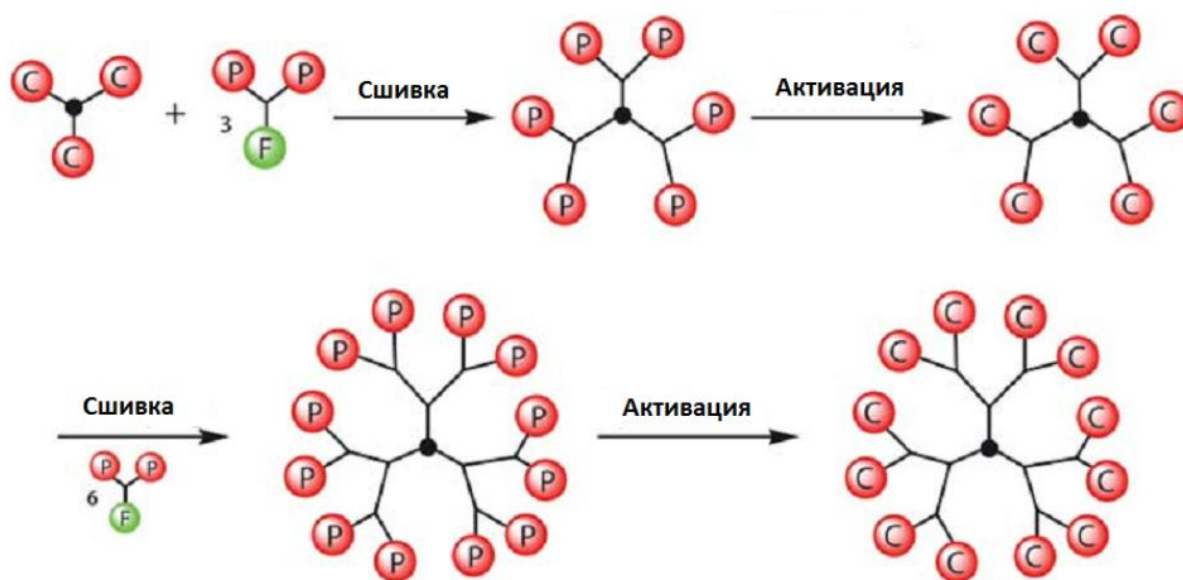


Рисунок 8 - Дивергентный метод синтеза дендримеров

Конвергентный метод синтеза представляет собой синтез сначала отдельных фрагментов дендримера (дендронов) на основе дивергентного метода. Затем они присоединяются к ядру (Рис. 9). Преимущества данного метода заключаются в том, он позволяет получить большее число поколений, чем при дивергентном синтезе. Готовый продукт существенно легче выделить из реакционной смеси. При этом его дефектность тоже существенно ниже. Единственный недостаток метода – это трудоемкость ввиду большого числа стадий.

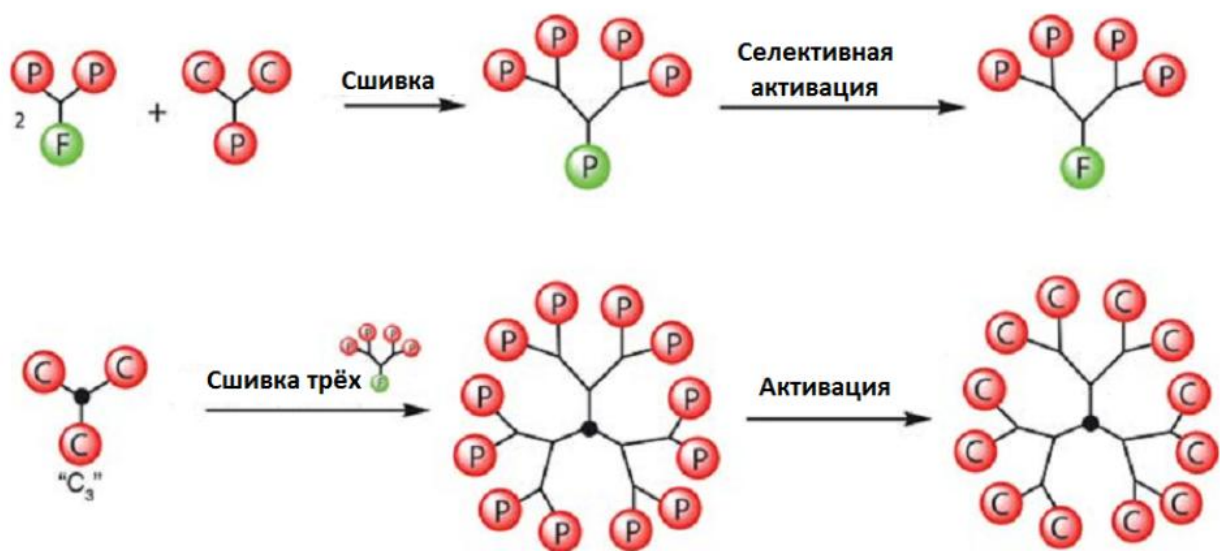


Рисунок 9 - Конвергентный метод синтеза дендримеров

Наиболее применяемыми дендримерами являются следующие:

1) Полипропилениминные (РРІ) дендримеры. Их получают путём последовательного присоединения акрилонитрила к аммиаку или диамину. Для РРІ дендримеров пятое поколение считается предельным. Дендримеры данного типа склонны к удлинению цепи в полярных растворителях из-за сильного взаимодействия между молекулами растворителя и носителя. В неполярных растворителях они сворачивают цепь в глобулу ввиду более слабого взаимодействия между молекулами растворителя и дендримера. РРІ демонстрируют антибактериальную активность против золотистого стафилококка, эпидермального стафилококка, а также против *Escherichia coli*, синегнойной палочки и дрожжей *Candida albicans*.

2) Карбоксилановые (CS) дендримеры получают путём последовательного присоединения реактива Гриньяра к хлорзамещённому силану. Карбоксилановые дендримеры обладают противовирусной активностью в отношении вируса гриппа. Данный дендример может образовывать комплексы с ДНК. Такие структуры называют дендриплексами (Рис. 10).

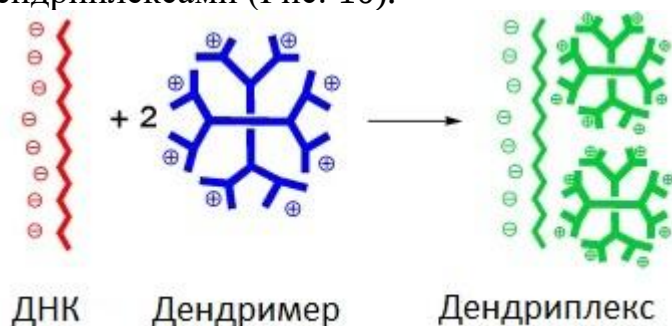


Рисунок 10 – Схема синтеза дендриплекса

3) Полиамидаминные дендримеры (РАМАМ) получают путём присоединения метилакрилата к аммиаку. Впервые они были описаны в 1985 году Дональдом А. Томалией как новый класс полимеров, получивший название "звездообразный полимер». Данный носитель стал первым коммерчески доступным дендримером. РАМАМ применяют, как правило, до 11-го поколения (с увеличением поколения растет его токсичность). Однако известно, что размеры дендримеров РАМАМ малых поколений (размер 1-200 нм) плохо захватываются и разрушаются элементами ретикуло-эндотелиальной системы. Известно, что анионный дендример РАМАМ обладает противовирусной активностью против ВИЧ. РАМАМ являются перспективными для пероральной доставки лекарственных средств, поскольку они способны проникать через эпителиальный барьер кишечника. Если данный носитель покрыть рекомбинантным бакуловирусом для стимуляции сверхэкспрессии VEGF (фактора роста эндотелия сосудов — белка, который отвечает за стимуляцию образования кровеносных сосудов), то такая система может быть интересна для устранения повреждений в сердечной ткани.

4) Текто-дендримеры – новое слово в данном направлении (Рис. 11). Такие носители состоят из основного дендримера, окруженного дендримерами меньшего размера, каждый из которых необходим для выполнения определённой смарт-терапевтической функции. Различные соединения, встроенные в структуру дендридных молекул, могут применяться при нацеливании на больные клетки, в ходе визуализации при постановке диагноза болезни, а также в доставке лекарственных средств. Текто-дендримеры можно характеризовать не только их общей массой, но также (как и их дендримеры, из которых они состоят) генерацией и количеством концевых дендримеров. Более того, концевые (периферийные) “текто-элементы” могут быть абсолютно любого состава и поколения. В зависимости от количества и размера периферических дендримеров, текто-дендример может образовывать в пространстве самые разнообразные структуры.

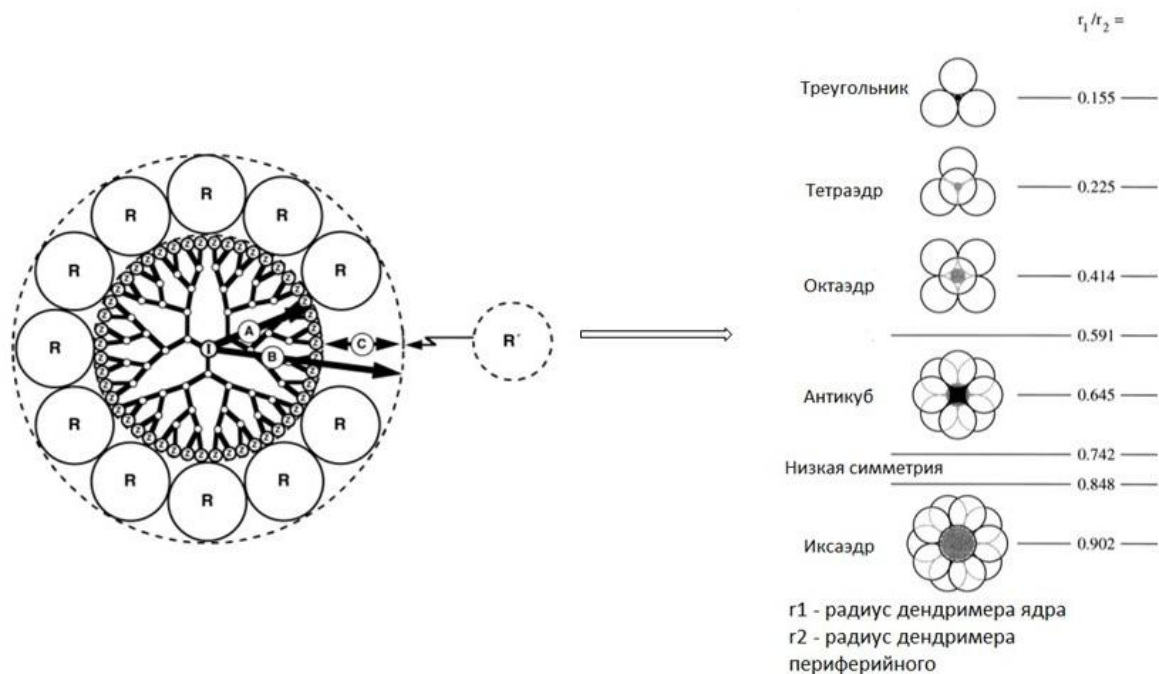


Рисунок 11 – Структура текто-дендримера, где R – периферийные дендримеры

Для включения лекарственного вещества в дендример используются различные методики. У данного носителя есть концевые заряженные группы. Они могут быть интересны для ковалентной сшивки препарата и носителя. Для этого, как правило, используют специальные линкеры. Однако стоит помнить, что ковалентная связь – одна из самых прочных химических связей. Это значит, что при включении вещества данным методом стоит подумать, сможет ли потом носитель высвободить вещество в организм, или нет. Кроме того, система доставки не должна менять терапевтические свойства доставляемого препарата, что при ковалентной сшивке не всегда возможно.

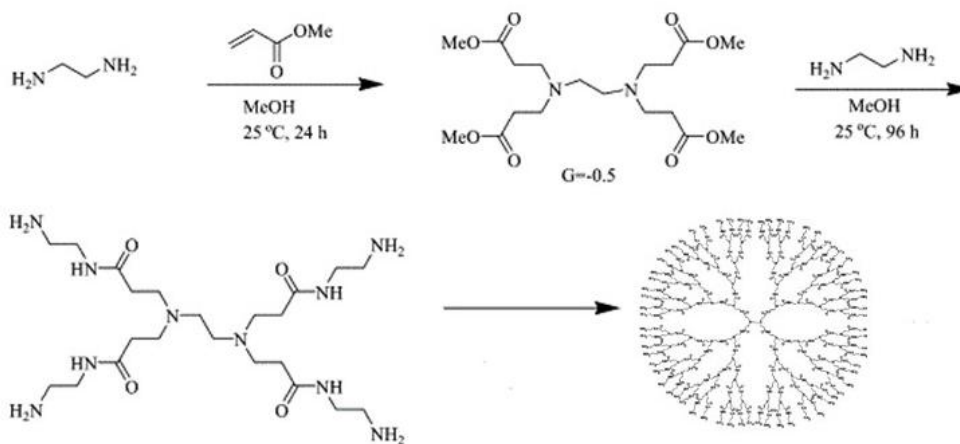
В том случае, когда необходимо «поменять» заряд концевых групп с положительного на отрицательный, можно прибегнуть к ацетилированию дендримера. Для этого уксусный ангидрид прикапывают к раствору дендримера в присутствии триэтиламина, учитывая количество исходных концевых групп. Для РАМАМ соотношение уксусного ангидрида обычно берут 70% от числа первичных аминогрупп.

Если лекарственное вещество имеет заряд, противоположный заряду дендримера, то целесообразнее связать их за счет электростатического взаимодействия. Данная связь, однако, довольно лабильна. А это, в свою очередь, может сказаться на прочности образованного комплекса.

Лекарственное средство может быть включено внутрь дендримера в полости, образованными его ветвями. Такой метод включения может повысить стабильность лекарственного средства в физиологических условиях.

Задача

Представьте, что вы синтезируете дендример РАМАН 4-го поколения (G_4) на основе этилендиаминового ядра. В ходе синтеза вы используете классический двухстадийный цикл:



Известно, что:

Молярная масса ядра (этилендиамин) = 60 г/моль.

Количество активных аминогрупп (NH_2 -группы) на поверхности после полной сборки нулевого поколения G_0 - 4.

Выход на каждой отдельной стадии (присоединение + амидирование) составляет 90% от теоретического для данной генерации. Дефектные ветви, полученные в ходе синтеза дендримера, не восстанавливаются.

1. Рассчитайте теоретическое количество аминогрупп на поверхности дендримера для поколений G_1 , G_2 , G_3 , G_4 .
2. Определите реальное количество поверхностных аминогрупп для поколения G_4 с учетом потерь выхода на всех предшествующих стадиях.
3. Какой процент дефектных концевых групп вы можете получить в ходе синтеза?

Тема 5. Получение липосомальных препаратов

Липосомы – микро/наноскопические везикулы, оболочка которых (мембрана) состоит из слоев фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилсерин), разделенных водной фазой (Рис. 12).

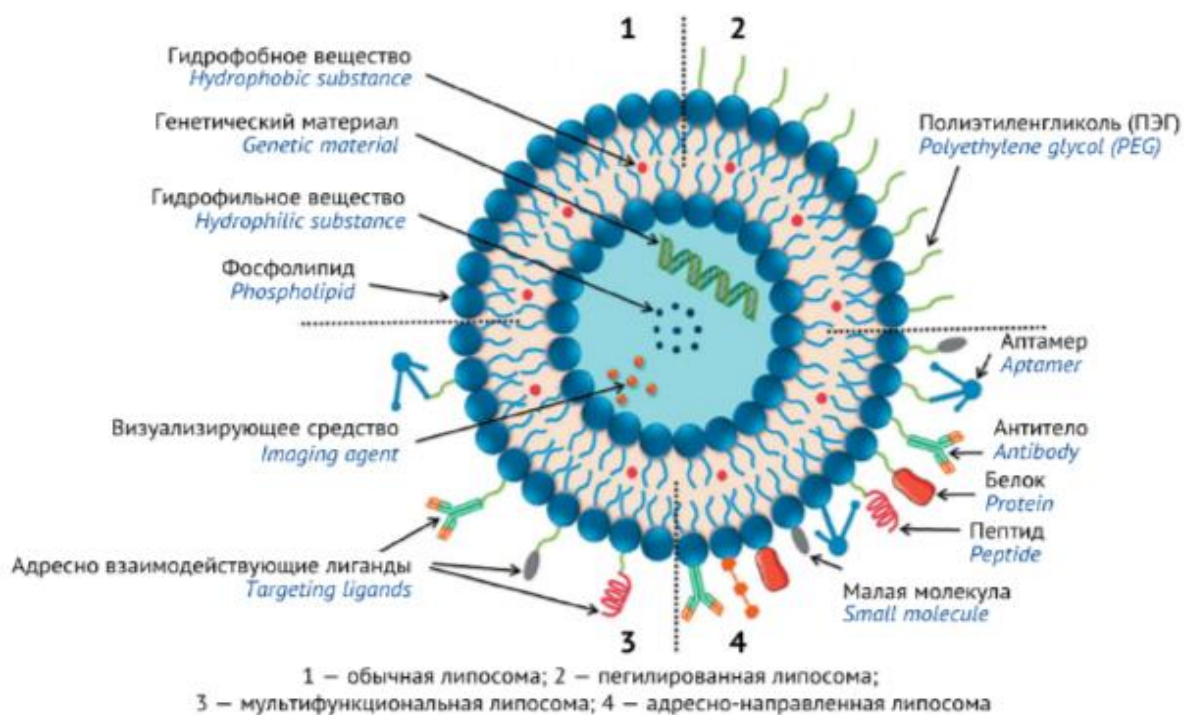


Рисунок 12 – Схематическое строение липосомы

Поскольку оболочка липосомы состоит из гидрофобных соединений, она позволяет включать в свой состав гидрофобные лекарственные препараты. Поскольку, однако, данный носитель является дифильной системой, он позволяет включать в себя (можно отдельно или одновременно) как гидрофильные, так и гидрофобные соединения: противоопухолевые и противомикробные препараты, гормоны, ферменты, вакцины, а также дополнительные источники энергии для клетки, генетический материал. Например, лимфатический путь интересен для доставки многих липофильных химиотерапевтических и иммуномодулирующих средств, которые незаменимы при лечении онкологических и аутоиммунных заболеваний. Носители на основе липидов могут повысить растворимость и стабильность данных лекарственных средств, а также защитить их при прохождении желудочно-кишечного тракта.

Данный носитель известен еще с конца 19 века, благодаря немецкому бактериологу П. Эрлиху, прозвавшему носитель «волшебной пулей». Широкую известность он получил благодаря некоторым своим свойствам. Липосомы являются биосовместимыми нетоксичными системами доставки при всех способах введения: интраназальный, пероральный, инъекционный, трансдермальный и т.д. При грамотном подборе концентрации липидов можно добиться поглощения липосом клетками путем их сливания с клеточной мембраной, за счет адсорбции на поверхности либо путем эндоцитоза. Липосома может слиться с мембраной клетки, изменяя при этом ее проницаемость и заряд.

В отличие от многих известных синтетических носителей, липосомы сравнительно легко разрушаются в организме. В настоящее время открытым остается вопрос сохранения стабильности липосомальной системы доставки.

Данный носитель не всегда устойчив в сыворотке крови. В крови есть липопротеины, с которыми липосома может обмениваться липидами, разрушая этим свой липидный бислой и высвобождая включенный объект раньше времени.

Липосомы формируются смешиванием липидов с водой, что наделяет их двойственной природой и приводит к образованию замкнутых бислойных структур. Размер таких структур можно получать от 50 нм до 10 мкм в зависимости от технологических параметров и выбранных методов получения. Например, для повышения устойчивости к воздействию липопротеинов в состав оболочки рекомендуется вводить холестерин либо модифицировать их поверхность полиэтиленгликолем (ПЭГ). Увеличение концентрации холестерина в оболочке позволяет снизить текучесть бислоя, тем самым сделав его более прочным. Однако введение большого количества холестерина ведет к увеличению среднего размера носителя. Многие поверхностно-активные вещества (ПАВ), входящие в состав оболочки, позволяют менять свойства системы доставки, влиять на эффективность инкапсулирования и высвобождения за счет снижения поверхностного натяжения между гидрофильной и гидрофобной фазами. Наиболее известными ПАВ, включаемыми в липосомы, являются: холат натрия, Span 60, Span 80, Pluronic 127, Tween 60 и Tween 80. Особым интересом в настоящее время пользуются липосомы, состоящие из pH чувствительных компонентов. Разрушение липосом, вызванное низким значением pH, после их эндоцитоза ведет к высвобождению вещества в цитоплазму.

Методик получения липосомальных систем доставки очень много. Все этапы получения носителя включают в себя стадию подбора фосфолипидов и гидрофильных компонентов, выбор оптимального органического растворителя, выбор метода получения, оценка физико-химических свойств конечного продукта. Большинство из методов формирования липосом можно разделить на три большие группы:

1. Тонкопленочные методы;
2. Методы, основанные на применении растворителей;
3. Методы с применением высокого давления.

Тонкопленочный метод (он же метод гидратации/регидратации тонкой пленки) является одним из наиболее известных методов получения липосом. В данном методе фосфолипиды растворяют в органическом растворителе (хлороформ, гексан), а затем растворитель удаляется из пробы выпариванием на ротаторном испарителе. После полного удаления растворителя на дне колбы образуется тонкая липидная пленка. Затем в колбу с липидной пленкой добавляется водная фаза, содержащая водорастворимые ингредиенты (лекарственный препарат, гидрофильный полимер и т.д.). Полученная смесь перемешивается и затем очищается от непрореагировавших компонентов (Рис. 13).

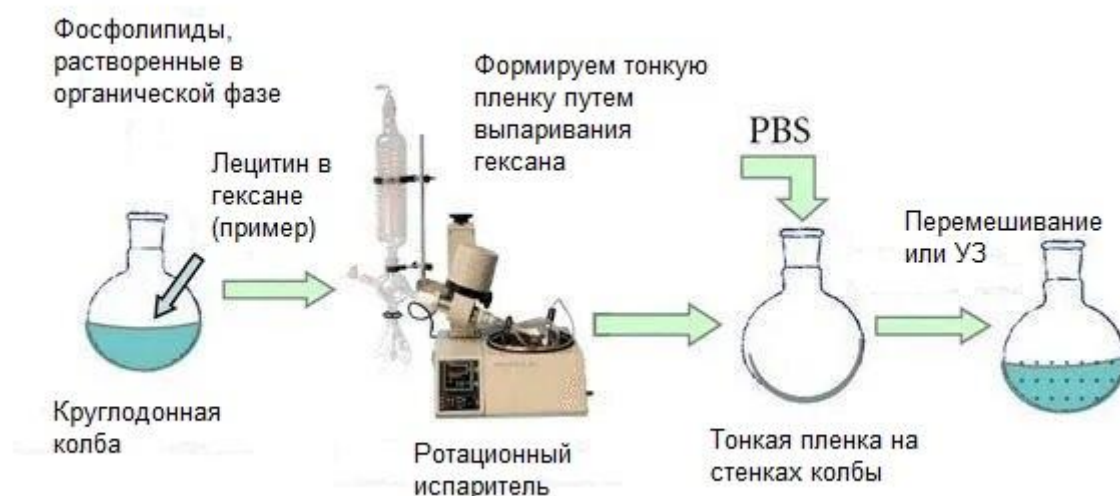


Рисунок 13 - Получение липосом методом гидратации/регидратации тонкой пленки

В методе, основанном на применении растворителя (этанол-инжекторный, эфир-инжекторный), смесь фосфолипидов и органического растворителя впрыскивается через специальную иглу в водную фазу, содержащую растворенный лекарственный препарат.

Применение лабораторных липосоматоров стало новой вехой в разработке данного носителя. В настоящее время рынок может предложить разные варианты под разные задачи и финансовые возможности. Самый простой вариант – экструдер липосом шприцевой (Рис. 14). Это откалиброванное ручное устройство, позволяющее получать носители разного размера с наименьшим разбросом. Состоит экструдер из поликарбонатной мембраны с определенным размером пор (определяет размер получаемых липосом) и двух шприцов объемом от 0,2 до 1,0 мл.



Рисунок 14 - Макет экструдера липосом, взятый из каталога производителя (компания Genizer)

Более продвинутым вариантом лабораторной системы синтеза липосом можно считать липосоматор, предлагаемый компанией Dolomite Microfluidics (Рис. 15). Это полностью автоматическая система синтеза нанолипосом. Технология получения основана на применении микрофлюидных специальных чипов и позволяет получать носители различного размера (50-500 нм). Данный прибор включает в себя два шприцевых насоса PW Quad с объёмом 2,5 и 50 мл. а также стойку для реагентов, предназначенную для подачи растворов (липидная фаза, водная фаза, стабилизатор) в насосы. Автоматический коллектор образцов позволяет собирать каждый образец в индивидуальные пробирки (Рис. 16).



Рисунок 15 - Макет автоматического липосоматора, взятый из каталога производителя (компания Dolomite Microfluidics)

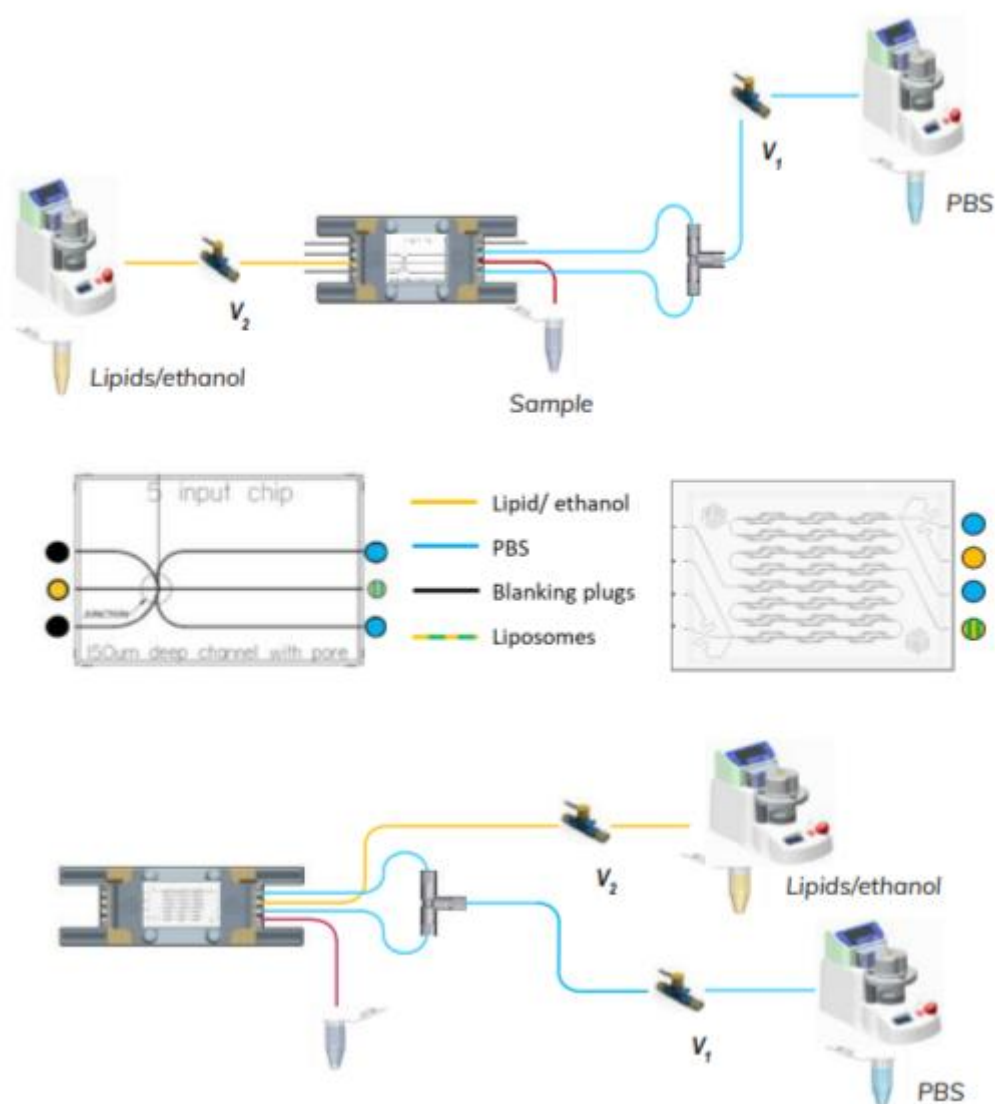


Рисунок 16 – Схематическое изображение процесса получения липосом при помощи системы Dolomite Microfluidics

После того, как липосомы получены, они в обязательном порядке должны быть охарактеризованы. Базовый набор изучаемых параметров, а также основные методы, которыми эти параметры можно оценить представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Методы, используемые для оценки параметров липосом

Параметр	Метод
Размер	Динамическое светорассеяние (DLS), Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия (SEM/TEM), Криогенная-ТЕМ (Cryo-ТЕМ), Атомно-силовая микроскопия (AFM)
Заряд поверхности	Электрофоретическая подвижность,

	Динамическое светорассеяние (DLS)
Морфология	Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия (SEM/TEM), Криогенная-ТЕМ (Cryo-TEM), Атомно-силовая микроскопия (AFM)
Фазовое поведение	Рентгеновская дифракция (XRD), Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) Термогравиметрический анализ (TGA)
Эффективность включения	Центрифугирование, диализ с последующим определением содержания включенного объекта хроматографическими или спектрофотометрическими методами

Лабораторная работа «Получение липосом из фосфолипидов методом гидратации/регидратации тонкой пленки»

Задача. Получить липосомы из предложенных фосфолипидов используя, метод гидратации/регидратации тонкой пленки.

Реактивы и оборудование: фосфолипиды, хлороформ, роторный испаритель, круглодонная колба на 50 мл для роторного испарителя, пробковая подставка для круглодонной колбы, микроскоп, магнитная мешалка, бюкс на 10 мл, вода, красящее вещество (для включения в липосомы)

Ход работы:

В круглодонной колбе растворить 10 мг фосфатидилхолина в 10 мл хлороформа. После полного растворения фосфатидилхолина в хлороформе полученную смесь выпаривать на роторном испарителе до образования тонкой пленки при следующих показателях: температура водяной бани 40°C, давление 60 мБар. Красящее вещество произвольной концентрации растворить в 25 мл воды. Полученный раствор залить в круглодонную колбу и оставить перемешиваться на пробковой подставке на магнитной мешалке при 400 об/мин на 2 часа при комнатной температуре до полной регидратации пленки со стенок. Полученные липосомы оценить визуально при помощи микроскопа и сделать вывод.

Внимание! Все работы с органическими растворителями ведутся строго в исправном включенном вытяжном шкафу.

Тема 6. Исследование высвобождения из носителей в имитаторы сред организма

Основная цель получения систем доставки для биологически активных веществ – обеспечения постепенного и контролируемого высвобождения в течение определенного временного промежутка. Большинство из описанных в данном пособии носителей широко применяются при создании терапевтических

систем как с нормальным, так и с модифицированным высвобождением биологически активного вещества.

Высвобождение целевого объекта из систем доставки может происходить путем матричной диффузии. Наиболее популярными системами доставки с контролируемой матричной диффузией являются таблетки и гранулы. В таких системах целевое вещество равномерно распределено по всей матрице. Существенным недостатком таких систем доставки является способность к высвобождению первого порядка с постоянно снижающейся скоростью. Причиной этого снижения является увеличение сопротивления диффузии и уменьшение площади. Кинетика высвобождения из систем, содержащих растворенное лекарственное средство, может быть выражена уравнением:

$$M_t = M_\infty \sqrt{\frac{4Dt}{\pi l^2}},$$

где M_t — масса вещества, высвободившаяся к моменту времени t ; M_∞ — общая масса вещества в матрице; D — коэффициент диффузии; l — толщина матричного слоя.

В случае модифицированных систем доставки можно выделить следующие механизмы высвобождения: пролонгированное, отсроченное, пульсирующее, двухфазное.

В случае с пролонгированным высвобождением системы доставки демонстрируют замедленную кинетику высвобождения препарата по сравнению с матричными формами, вводимыми тем же путем. Ввиду большой вариации подобных форм единого уравнения, описывающего данный процесс, нет. Например, если пролонгация осуществляется за счет эрозии системы доставки, то такой процесс высвобождения можно описать моделью Хопфенберга. Модель Хопфенберга — это математическая модель, которая используется для описания кинетики высвобождения лекарственных веществ из полимерных материалов, учитывая геометрию молекулы и процесс эрозии:

$$M_t = M_\infty (1 - (1 - k_0 t)^n),$$

где M_t — количество лекарства, высвободившееся к моменту времени t ; M_∞ — полное количество лекарства, изначально загруженное в матрицу; t — время от начала высвобождения; k_0 — скорость, с которой уменьшается характерный размер матрицы (толщина, радиус) за счёт эрозии; $n=3$ для сферических систем доставки.

В микрочастицах и микрокапсулах довольно часто можно наблюдать данный вид высвобождения. Продолжительность действия системы доставки с пролонгированным действием может быть эквивалентна нескольким инъекциям, вводимым несколько раз в сутки.

Выход вещества из систем доставки отсроченного высвобождения задерживается на определенный период после введения дозы. Такие системы

характеризуются наличием периода «задержки». Описать математически такое высвобождение стандартными кинетическими уравнениями нулевого или первого порядка невозможно, поскольку они не учитывают временную задержку. В этом случае можно использовать математическую модель Вейбулла, учитывающую необходимый временной сдвиг.

Двухфазное высвобождение характеризуется двумя различными физическими этапами: быстрой начальной фазой, где высвобождение идет за счет диффузии, и медленной вторичной фазой с контролируемой диффузией, эрозией полимера или набуханием. Для математического описания профилей такой системы доставки используются двухкомпонентные модели, в которых общее высвобождение является суммой двух фаз.

Системы доставки с пульсирующим высвобождением обеспечивают поступление в организм заданных доз вещества в определенные промежутки времени. Такие системы наиболее часто используются при хронозависимой терапии. Для описания высвобождения препарата из таких систем наиболее часто используют модель Вейбулла и модель Корсмайера-Пеппаса.

Известны лекарственные формы, в которых препарат высвобождается непрерывно в течение определенного периода времени (например, препараты из PLGA). Среди таких систем доставки на основе PLGA известными являются депо-системы для доставки трипторелина и налтрексона. Как правило, такие депо-системы вводятся подкожно в виде имплантата. Но в отличие от простых матричных систем (например, таблеток), депо-системы, особенно биоразлагаемые, проходят несколько физических стадий: набухание, диффузию растворенного вещества и эрозию полимера. Поэтому для их описания используются, как правило, различные комбинированные модели.

Для исследования динамики высвобождения используется тест на растворение для твердых дозированных лекарственных форм (ОФС.1.4.2.0014.15).

Данный тест является обязательной частью эксперимента и проводится при контроле качества любой лекарственной формы (как старой, так и новой) для подтверждения постоянства ее свойств. Для многокомпонентных дозированных лекарственных форм тест, как правило, проводят по наименее растворимому действующему веществу.

В зависимости от скорости высвобождения действующих веществ в соответствие с ОФС.1.4.2.0014.15 все твердые дозированные лекарственные формы подразделяются на группы:

- 1 группа: таблетки; таблетки, покрытые оболочкой; гранулы (время растворения которых превышает 5 мин); гранулы, покрытые оболочкой; капсулы;

- 2 группа; таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой; кишечнорастворимые капсулы, гранулы и другие кишечнорастворимые твердые дозированные лекарственные формы;
- 3 группа: таблетки, капсулы и гранулы с пролонгированным высвобождением.

Полимерные микрокапсулы и прочие носители можно отнести к любой из данных групп в зависимости от кинетики высвобождения из них действующего вещества. Как правило, наиболее распространенным прибором для проведения теста «Высвобождения» является аппарат «Корзинка» (Рис. 17).

Испытание на высвобождение предназначено для определения количества биологически активного вещества в носителе. Вещество высвобождается в среду, имитирующую среду организма из системы доставки за определенный промежуток времени в условиях, наиболее близко имитирующих организм.



Рисунок 17 – Тестер высвобождения типа аппарат «Корзинка» от компании Erweka

В сосуд для растворения, выполненный из химически инертного материала, помещается навеска системы доставки (Рис. 18). Корзинка оснащена держателем (экстракционной ячейкой) для испытания трансдермальных систем доставки и лопастью для перемешивания твердых форм. В качестве среды растворения применяется буферные растворы со значениями pH, имитирующие среду организма. Например, для испытания трансдермальных систем буферный раствор выбирается с pH в интервале 5,5 (допустимое отклонение $pH \pm 0,05$). При испытании пероральных систем доставки имитатором желудка принято считать

0.1 N HCl, а кишечника – фосфатный буфер с pH 7.4. Объем среды растворения составляет 500 мл, а температура среды растворения в сосуде составляет $(37,0 \pm 0,5)$ °C. Скорость вращения мешалки составляет 100 об/мин. Допустимое отклонение скорости вращения ± 4 %. Испытание проводится по 3 образца каждой системы доставки. Отбор проб осуществляют из средней по высоте части среды растворения на расстоянии не ближе 10 мм от внутренней стенки сосуда. Каждую пробу анализируют на количественное содержание действующего вещества аналитическими методами (например, УФ-спектрофотометрии). Уменьшение объема среды растворения компенсируют либо возвращением пробы раствора в сосуд, либо добавлением среды растворения или учитывают при расчетах.



Рисунок 18 – Схема корзинки для растворения системы доставки

Лабораторная работа «Исследование деградации микрокапсул в зависимости от условий среды»

Цель работы: Оценить деградацию предложенных полимерных носителей в имитаторах сред желудка и кишечника

Реактивы и оборудование:

Любые из полимерных носителей, предложенные преподавателем для изучения, содержащие известный целевой объект, натрия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат соляная кислота (конц.), вода, магнитная мешалка с подогревом, пробирки, пипетки автоматические на 5 мл, чашки Петри, микроскоп, спектрофотометр, pH метр.

Предподготовка:

Приготовление фосфатного буфера (pH 8): для фосфатного буфера приготовить 0,2 М растворы Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 , смешать их 1 к 1. Затем pH довести до нужного значения путем добавления одного из данных растворов.

Оборудование:

Ход работы.

Исследование спектра поглощения заключенного в объект исследования целевого препарата проводится по приведенной ниже схеме.

Исследование растворения микрокапсул в имитаторе среды желудка:

Навеску исследуемого объекта поместить в 20 мл имитатора среды желудка. Через определенные промежутки времени отбирать аликвоты суспензии 1 мл и оценить спектрофотометрически наличие пика на длине волны поглощения. В систему вернуть взятый объем 0.1 М HCl. Эффективность высвобождения включенного объекта оценивать по наличию пика на спектре. Спустя 1 час целостность исследуемого объекта оценить визуально.

Исследование растворения микрокапсул в имитаторе среды кишечника:

Навеску исследуемого объекта поместить в 20 мл имитатора среды кишечника. Через определенные промежутки времени отбирать аликвоты суспензии 1 мл и оценить спектрофотометрически наличие пика на длине волны поглощения. В систему вернуть взятый объем фосфатного буфера. Эффективность высвобождения включенного объекта оценивать по наличию пика на спектре. Спустя 2 часа целостность исследуемого объекта оценить визуально. Написать отчет о полученных результатах

Внимание! Все работы с кислотами и щелочами ведутся строго в исправном включенном вытяжном шкафу.

Тема 7. Эритроциты – носители лекарственных веществ

Использование форменных элементов крови в качестве системы для направленной доставки лекарственных веществ – один из перспективных подходов в современной медицине. В 1953 году впервые удалось поместить химические вещества (АТФ) внутрь эритроцитарных теней — пустых мембранных оболочек, получаемых после удаления гемоглобина из эритроцитов. С тех пор и по сей день данный носитель не теряет своей актуальности. Интерес к эритроцитам объясняется тем, что они удовлетворяют всем необходимым требованиям, которыми должна обладать идеальная система доставки.

В первую очередь эритроциты полностью биосовместимы. Для включения биологически активного вещества можно использовать как аутологичные (родные) клетки пациентов, так и донорские эритроциты. Старые и поврежденные эритроциты утилизируются естественным образом в селезенке, что позволяет говорить об их абсолютной биodeградируемости. Лекарственное вещество, инкапсулированное в эритроциты, не проявляет фармакологической и токсикологической активности до достижения ретикуло-эндотелиальной системы. Это особенно важно для высокотоксичных препаратов (противоопухолевые средства, аминогликозидные антибиотики и др.).

Эритроциты являются наиболее многочисленными из всех клеток крови, способными обеспечивать продолжительную циркуляцию в крови. Это свойство обеспечивает длительное действие переносимых ими лекарственных веществ, варьируя их фармакокинетику и фармакодинамику.

Эритроциты весьма технологичны в работе и позволяют модифицировать механизмы включения в них биологически активных веществ. Терапевтический препарат может быть включен как внутрь самого эритроцита, так и химически связан с его поверхностью. В зависимости от лекарственного вещества эритроцит может быть просто носителем, биореактором или носителем для направленной доставки (Рис. 19)

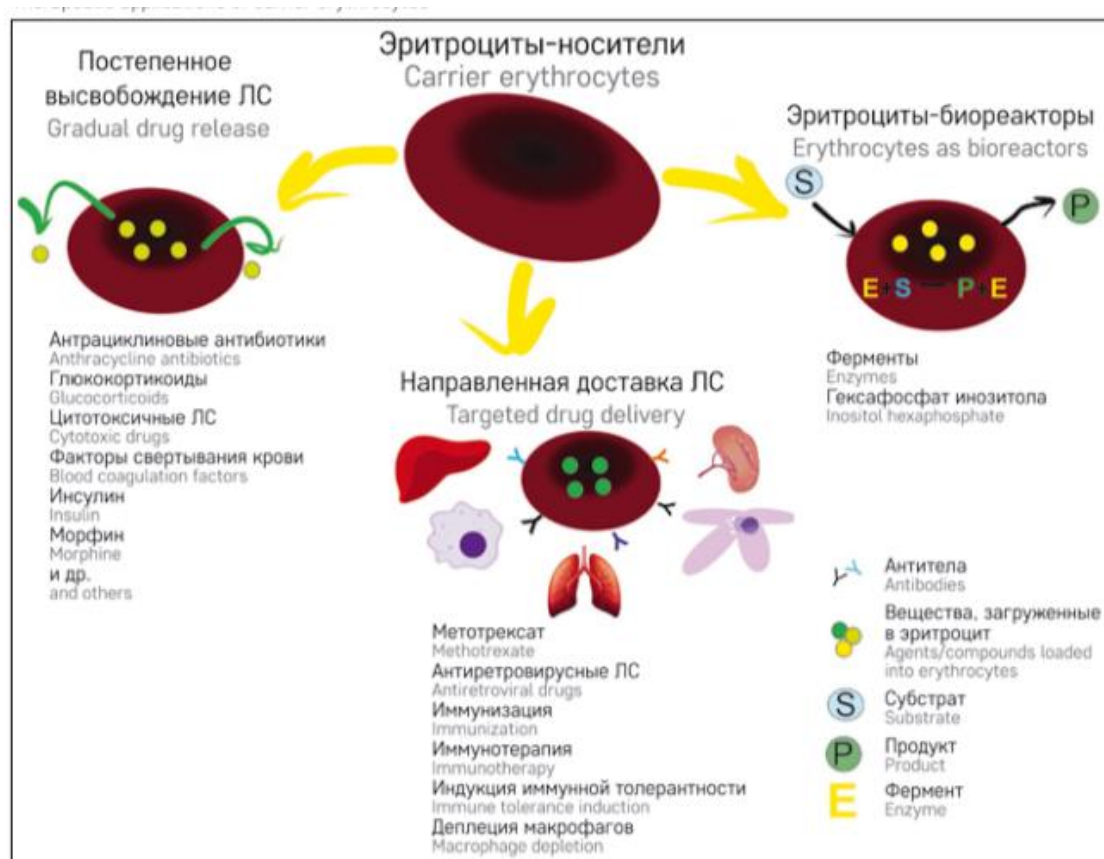


Рисунок 19 – Примеры применения эритроцита для доставки биологически активных веществ.

Многие используемые в настоящее время методы, позволяющие инкапсулировать препараты в эритроциты, основаны на процедуре диализа с высоким гематокритом. Краткая схема метода заключается в следующем. Промытые эритроциты помещают в диализные трубки вместе с веществом, подлежащим инкапсуляции. Полученную суспензию подвергают диализу против гипотонического раствора до достижения полного лизиса эритроцитов. После диализа клетки, достигшие равновесия с экзогенным веществом, подвергают повторному запечатыванию путём восстановления физиологической

изотоничности. Затем эритроциты промывают и ресуспендируют в плазме или физиологическом растворе.

Также широко используемыми методами включения биологически активных веществ в эритроциты являются электропорация, микроинъекция, фармакологически индуцированный эндозитоз, гипотонический и осмотический методы (Рис. 20).

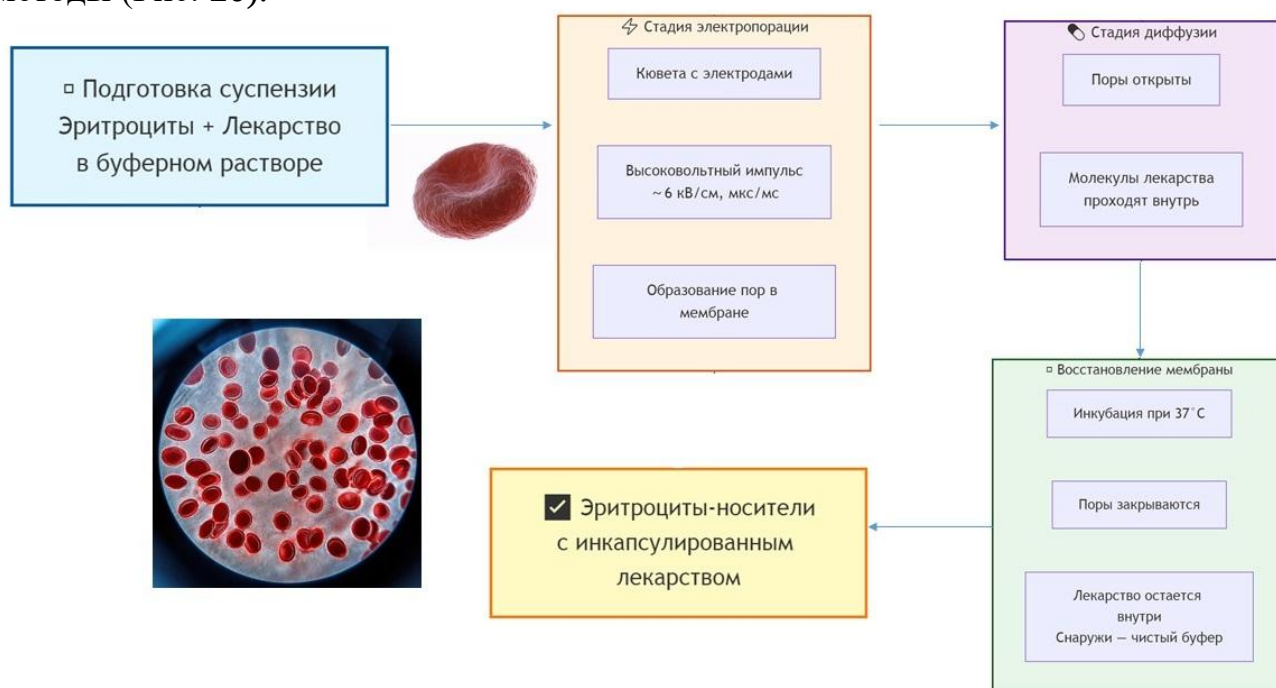


Рисунок 20– Схематическое изображение метода электропорации

Метод электропорации основан том, что клетки в изотоническом растворе подвергаются импульсному воздействию электрического поля. В мембране клетки вследствие этого возникают поры, что позволяет веществу проникать диффузией через них в эритроцит. После установления равновесия концентрации поры закрываются. Электропорация, микроинъекция и оптическая пинцетная манипуляция могут при неудачном течении эксперимента привести к повреждению клеточной мембраны и ухудшению качества эритроцитов.

Осмотический метод также эффективен для включения лекарственных веществ в эритроциты. Метод основан на изотоническом гемолизе, который индуцируется физическими или химическими факторами. При инкубации эритроцитов в растворах веществ, обладающих высокой мембранной проницаемостью, включаемое вещество проникает в клетки под действием градиента концентрации. Этот процесс сопровождается поступлением воды для поддержания осмотического равновесия. Для изотонического гемолиза применяются такие химические агенты, как раствор мочевины, полиэтиленгликоль и хлорид аммония.

Применение химических методов (например, пэгилирование или сшивание катионными лигандами) также возможно для интеграции лекарственных препаратов в мембрану эритроцитов.

Основное препятствие применения эритроцитов-носителей в клинической практике - проблема их хранения. Известно множество стратегий для сохранения их жизнеспособности: хранение в виде суспензии в изотонических буферах, обогащённых всеми необходимыми питательными веществами; низкотемпературная консервация с добавлением хелатирующих соединений; лиофилизация; замораживание в глицерине.

Задание

В инкапсулировании биологически активных веществ могут участвовать различные элементы крови (не только эритроциты). Опираясь на научные публикации:

1. Дайте описание основных методик включения веществ в тромбоциты, лимфоциты и лейкоциты.
2. Отрадите основные преимущества и недостатки тех или иных носителей на основе элементов крови.
3. Приведите примеры успешного применения таких систем доставки для конкретных лекарственных веществ.

Работу необходимо оформить в виде презентации PowerPoint и представить на практическом занятии с указанием использованных источников литературы.

Тема 8. Исследование токсичности разработанных систем доставки в экспериментах *in-vivo*

После того, как были получены новые системы доставки для биологически активных веществ, они обязательно должны пройти доклинические и токсикологические исследования. Данная процедура является обязательной, даже если включаемое в систему доставки биологически активное вещество является безопасным. Необходимо доказать, что система доставки не вызывает токсического воздействия на организм и не корректирует в худшую сторону действие включенного вещества на организм. Доклинические исследования — это не просто формальный этап эксперимента, а комплекс мероприятий, позволяющий отобрать наиболее эффективные и безопасные системы для дальнейшего их применения. Данные исследования необходимы для перехода к клиническим испытаниям на людях и дальнейшей государственной регистрации готового лекарственного препарата.

В ходе планирования доклинического эксперимента корректно выбрать подопытных животных. Выбор животных зависит от цели проведения исследования – оценка безопасности или исследование фармакокинетических параметров. Животные для эксперимента подбираются по размерам,

физиологическим особенностям, легкости выполнения тех или иных операций, простоты дальнейших наблюдений, содержания и ухода, а также скоростью размножения. Так, например, при исследовании токсичности химических веществ в экспериментальной токсикологии используются мыши (линейные и нелинейные) и крысы (Рис. 21). Кролики наиболее часто используются при изучении аллергических реакций.



Рисунок 21 – Животные, участвующие в доклинических исследованиях: а – крыса (линейная Wistar); б – мышь (линейная C57BL/6)

Основное различие между линейными и нелинейными лабораторными животными заключается в степени генетического контроля. Линейные (инбредные) животные получаются в результате близкородственного скрещивания на протяжении не менее 20 поколений. Это позволяет сформировать популяцию со сходными генетическими характеристиками, которые легко поддаются отслеживанию. Нелинейные (аутбредные) животные, напротив, генетически не контролируются и пригодны лишь для проведения простейших экспериментальных исследований. Линейные и нелинейные животные различаются между собой по ряду ключевых характеристик. Во-первых, они различаются по окрасу шерсти. Например, большинство линейных крыс являются альбиносами. Во-вторых, их устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Известно, что нелинейные крысы отличаются высокой выживаемостью в любых условиях. Линейные крысы, напротив, крайне чувствительны к изменению внешних условий — влажность, температура, освещённость, воздухообмен и качество корма. В-третьих, животные различаются по когнитивным способностям. Ученые заметили, что далеко не каждая линия инбредных крыс способна к познавательной деятельности и выработке условных рефлексов, в отличие от своих диких собратьев (сообразительных и хорошо обучаемых).

Для изучения новых фармацевтических субстанций «золотым стандартом» принято считать линейных мышей. Например, мыши линии C57BL/6 являются многоцелевой моделью. Они используются для исследований метаболизма, ожирения, диабета, иммунологии, поведения и онкологии, исследование

безопасности и эффективности. Однако результаты, полученные на одной линии, могут не воспроизводиться на других линиях. Поэтому в современных исследованиях часто проводят тестирование на нескольких линиях, переходя к генетически разнородным популяциям.

Для оценки безопасности полученных систем доставки используют специальную нормативную и правовую документацию, устанавливающую требования к проведению токсиколого-гигиенических исследований. Одним из таких документов являются Методические указания 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», разработанные для обеспечения единой системы исследования образцов. В данном документе отражены требования к исследуемым наноматериалам, требования к лабораторным животным, а также требования к планированию и проведению исследований (Табл. 4). Наиболее важными в данных методических указаниях являются подробные и понятные схемы проведения экспериментов по изучению общетоксического действия наноматериалов при различных способах введения (определение острой токсичности, отдаленных эффектов).

Таблица 4 – Требования к содержанию животных и образца, представляемого на исследования

Требования, накладываемые на систему доставки	Требования к животным
Исследуемый образец должен быть упакован для защиты от контаминации (загрязнения);	Все токсикологические исследования проводятся только на здоровых животных, прошедших карантин;
Должна быть предоставлена информация о методах обнаружения, идентификации и количественного определения объекта (позволяющая отличить его от аналогичных веществ в традиционной форме);	Для обеспечения индивидуального наблюдения в процессе выполнения исследования животные должны быть идентифицированы путем их маркировки;
Хранение исследуемых образцов осуществляется отдельно от способных вызвать его контаминацию (или любое изменение его физико-химических свойств) веществ, реактивов, препаратов;	Места содержания животных и производственные помещения подвергаются периодической санитарной обработке
Общая характеристика объекта включает информацию: область его применения и рекомендуемые дозы; торговое, химическое наименование; метод получения; состав	Корма и вода для животных должны обеспечивать пищевые потребности в соответствии с утвержденным протоколом исследования, быть свободными от патогенных

	микроорганизмов и вредных примесей и не должны влиять на результаты исследования.
--	---

Все токсикологические исследования систем доставки проводятся по утвержденному плану с ведением протокола и составлением отчета, в который заносятся все полученные результаты в ходе исследований. Протокол исследования утверждается руководителем организации, проводящей исследования. Отчет об исследовании включает в себя следующие разделы: цель и задачи исследования, имеющиеся сведения об исследуемом образце, условия хранения и использования образца, схему исследования и ее обоснование, методы исследования, пути введения исследуемого и контрольного образцов, критерии оценки безопасности исследуемого образца, результаты исследований, статистическую обработку результатов исследования, заключение, список используемой литературы. Эксперимент обязательно должен быть утвержден этической комиссией с присвоением ему номера и даты заседания.

Предварительно об образце необходимо собрать информацию о его химическом составе, размере, поверхностном заряде и т.д. Например, уменьшение размера носителя повышает вероятность неблагоприятных эффектов. Частицы размера от 20 до 100 нм обычно быстро выводятся из организма почками. Однако ввиду высокой удельной площади поверхности они обладают повышенной реакционной способностью, что может вызывать токсические и воспалительные процессы. Частицы крупнее 100 нм быстро поглощаются мононуклеарной фагоцитарной системой и способны вызывать эмболию сосудов легких и печени. При вдыхании частицы размером менее 100 нм способны проникать через респираторный эпителий, достигать легочных альвеол и прилегающих кровеносных сосудов, а затем распространяться по всему организму. Более того, такие наночастицы могут поглощаться обонятельным эпителием и транспортироваться через обонятельную луковицу, благодаря чему они достигают области головного мозга.

Геометрическая форма системы доставки влияет на транспорт и биораспределение в организме. Сферические частицы легко захватываются мононуклеарной фагоцитарной системой и реже взаимодействуют с эндотелием. Однако такие системы лучше усваиваются клетками.

Пути введения системы доставки в организм могут быть различными и во многом определяются ее физико-химическими особенностями (Рис. 22). В соответствии с предполагаемым путем введения испытуемого образца строится и токсикологическое исследование. Токсикологические исследования можно проводить как на линейных (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейных животных. В случае использования линейных животных необходимо указать линию животных.

Количество животных в группе зависит от целей исследования, но в идеале не должно быть менее 10 особей в группе для качественной статистики, и должно обеспечить возможность вычисления LD₅₀, CL₅₀ и оценку кожно-резорбтивного действия (если требуется). Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать $\pm 10\%$. Если объект находится в растворителе, то при необходимости проводятся исследования его острой токсичности. Для этого он вводится перорально, ингаляционно или наносится на кожу (в зависимости от предполагаемого пути поступления исследуемого образца) в той же дозировке.



Рисунок 22 – Пути поступления лекарственного средства в организм

Для интраназального введения могут использоваться как специальные устройства, так и обычная автоматическая пипетка (Рис. 23).

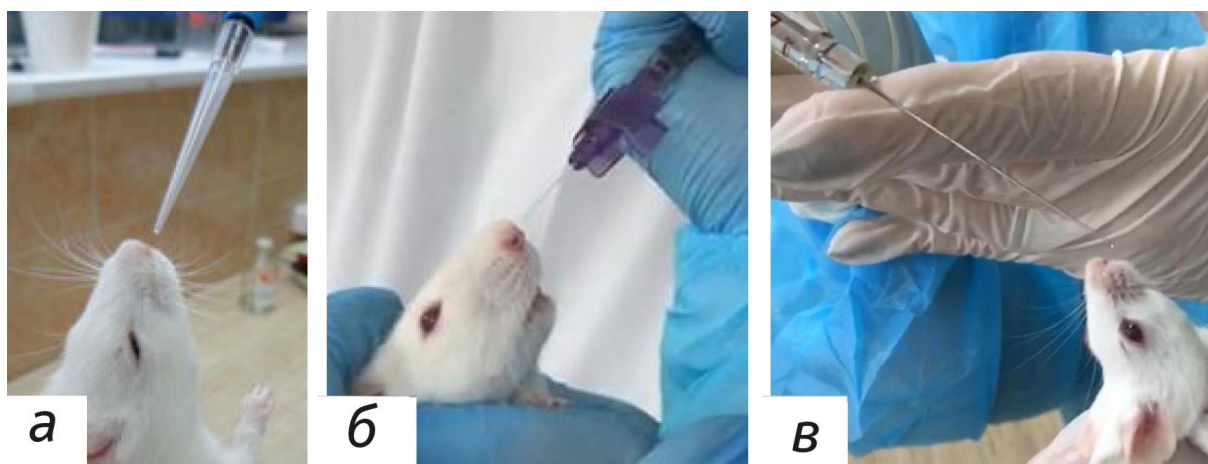


Рисунок 23 – Интраназальное введение при помощи: а – механического дозатора; б – внутривенного катетера; в – шприца Гамильтона

Для внутрижелудочного введения используются специальные внутрижелудочные зонды, либо образец вводится внутрибрюшинно (Рис. 24).



а



б

Рисунок 24 – Пероральное введение при помощи: а – специального зонда; б – внутривбрюшинно

Для изучения острой токсичности общая продолжительность наблюдения составляет 14 дней, при этом фиксируются общее состояние животных, клиническая картина интоксикации и гибели, характер двигательной активности и походки, наличие и характер судорог, тонус скелетных мышц, реакция на различные раздражители, частота и глубина дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, частота мочеиспускания и окраска мочи, потребление корма и воды, изменения массы тела. Регистрируется время гибели животных, при этом у всех погибших животных проводятся макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов. При определении острой токсичности вычисляются LD_{16} , LD_{50} и LD_{84} (при введении в желудок) или CL_{16} , CL_{50} и CL_{84} (при ингаляционном введении) отдельно для самцов и самок. Если токсичность слишком низкая и нельзя определить LD_{50} , то следует указать максимальную дозу, которая была введена животным.

Для изучения подострой токсичности общая продолжительность наблюдения составляет 90 дней, при этом также оцениваются общее состояние животных, характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покрова, потребление корма и воды, диурез, изменения массы тела. Изучаются 2-3 дозы исследуемого образца. Самая высокая доза должна 100% вызывать токсический эффект, а самая низкая – 100% не вызывать токсического эффекта.

Целью изучения хронической токсичности является изучение степени повреждающего действия объектов при их длительном поступлении в организм, выявление наиболее чувствительных к ним органов и систем организма, изучение степени обратимости вызываемых ими повреждений и построение зависимости «доза-эффект». Продолжительность эксперимента при этом зависит от того, как часто и как долго предполагается контакт системы доставки с организмом человека. Если исследованию подвергаются системы-депо, которые будут долгое

время контактировать с организмом человека, то длительность эксперимента должна быть не менее 6 месяцев.

Лабораторная работа «Влияние систем доставки на целостность клеточной мембраны и оценка выживаемости клеток»

Цель работы: оценить действие системы доставки (на выбор) на целостность клеточной мембраны.

Оборудование, реактивы и материалы: культура клеток в культуральном флаконе, пипетки на 10 и 200 мкл, 0.4% раствор трипанового синего в физрастворе, диссоциирующий раствор, мешалки Вортекс, камера Горяева, слайды для счетчика клеток, центрифуга, система доставки (любая из сделанных ранее систем)

Ход работы:

К клеткам в культуральном флаконе добавить по капле диспергированных в физрастворе систем доставки. Спустя 2 часа отобрать питательную среду, поместить ее в пробирку для центрифугирования и отцентрифугировать на 300-500 g.

Отобрать пипеткой питательную среду и промыть клетки 1 мл теплого физраствора. Затем добавить диссоциирующий раствор (50 мкл), дождаться открепления клеток от подложки и собрать их с помощью PBS (дважды по 1 мл) в ту же пробирку.

Затем тщательно ресуспендировать клетки и отобрать аликвоту клеточной суспензии (1000 мкл), добавить в нее раствор трипанового синего (100 мкл) и после этого инкубировать клетки с трипановым синим в течение 5 минут.

По окончании инкубации осторожно ресуспендировать клетки с помощью мешалки Вортекс и отобрать 30 мкл суспензии клеток в камеру Горяева. Посчитать количество неокрашенных и окрашенных клеток.

Написать отчет о проведенной работе.

Список литературы

1. Siepmann J. et al. Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. – New York : Springer, 2012. – Т. 3. – С. 33-34.
2. Lane M. E. Modified-release drug delivery technology. – New York : Marcel Dekker, 2003. – Т. 1.
3. Wilson C. G., Crowley P. J. (ed.). Controlled release in oral drug delivery. – Springer Science & Business Media, 2011.
4. Mitra A. K., Kwatra D., Vadlapudi A. D. Drug Delivery (book):. – Jones & Bartlett Publishers, 2014.
5. Holowka E. P., Bhatia S. K. Drug delivery. – New York, NY, USA: : Springer, 2014. – С. 7-62.
6. Opara E. (ed.). Controlled drug delivery systems. – CRC Press, 2020.
7. Jain K. K. et al. (ed.). Drug delivery systems. – Totowa, NJ, USA: : Humana press, 2008. – Т. 2.
8. Jain N. K. et al. (ed.). Controlled and novel drug delivery. – New Delhi : CBS publishers & distributors, 1997. – С. 100.
9. Misra A., Shahiwala A. Novel drug delivery technologies. – Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019.
10. Петрова Е. А. и др. Изучение параметров микроинкапсулирования при получении пролонгированной формы налтрексона // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48. – №. 1. – С. 50-53.
11. Anderson J. M., Shive M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres //Advanced drug delivery reviews. – 1997. – Т. 28. – №. 1. – С. 5-24.
12. Zolnik B. S., Burgess D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release //Journal of Controlled Release. – 2007. – Т. 122. – №. 3. – С. 338-344.
13. Попова Е. В. Разработка и физико-химические свойства полиэлектролитных систем доставки белков и пептидов: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук Попова Елена Викторовна; [Место защиты: С.-Петербург. гос. технол. ин-т]. — Санкт-Петербург, 2017. — 120 с.
14. Tomalia D. A., Christensen J. B., Boas U. Dendrimers, dendrons, and dendritic polymers: discovery, applications, and the future. – Cambridge University Press, 2012.
15. Gillies E. R., Frechet J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery // Drug discovery today. – 2005. – Т. 10. – №. 1. – С. 35-43.
16. Бурдаев Н. И. и др. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение //Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – Т. 13. – №. 2-1. – С. 316-332.

17. Горбик В. С. и др. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор) // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20. – №. 1. – С. 33-41.
18. Могилевич Е. И. и др. Липосомы // Образование и наука в современных реалиях. – 2022. – С. 9-12.
19. Jesorka A., Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications // Annu. Rev. Anal. Chem. – 2008. – Т. 1. – №. 1. – С. 801-832.
20. Ravilla S. et al. Erythrocytes as carrier for drugs, enzymes and peptides // Journal of applied pharmaceutical science. – 2012. – №. Issue. – С. 166-176.
21. Колева Л. Д., Атауллаханов Ф. И., Синауридзе Е. И. Эритроцит как идеальный носитель для внутрисосудистой доставки лекарств // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. – Т. 19. – №. 4. – С. 234-242
22. Magnani M. et al. Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting // Biotechnology and applied biochemistry. – 1998. – Т. 28. – №. 1. – С. 1-6.
23. Сарбаш В. И. и др. Эритроциты-носители лекарственных препаратов // Российский химический журнал. – 2007. – Т. 51. – №. 1. – С. 143-149
24. Eloy J. O., Abriata J. P., Marchetti J. M. Nanocarriers for Drug Delivery. – Springer Cham, 2021.
25. Кательникова А. Е. и др. Интраназальное введение лекарственных средств лабораторным животным // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – №. 2. – С. 9.

Федотова Елена Викторовна

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.
УРОВЕНЬ ПЕРВЫЙ**

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А