Способ изготовления лекарственной плёнки продолжительного действия, содержащей VEGF

Курганский И.С.

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Курганский Илья Сергеевич, e-mail: kurg.is@mail.ru

Резюме

Обоснование. Разработка новых способов доставки биологически активных веществ в зону оперативного вмешательства является перспективным направлением современной хирургии. Одним из биологически активных веществ, применяемых для стимуляции регенерации, является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Поиск способов, позволяющих постепенно и в течение длительного времени доставлять VEGF в зону оперативного вмешательства, является перспективным направлением исследований.

Цель исследования: разработать лекарственную плёнку продолжительного действия, содержащую VEGF.
Материалы и методы. В исследование было включено 78 крыс-самцов линии Wistar в возрасте 10 месяцев. Всем животным выполняли реконструктивную операцию на трахее, животные были разделены на три группы: группа 1 – без лекарственной плёнки, группа 2 – с лекарственной плёнкой продолжительного действия, группа 3 – с лекарственной плёнкой продолжительного действия, содержащей VEGF. Забор крови осуществляли на 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки исследования, с помощью метода иммуноферментного анализа определяли уровень VEGF плазмы крови, единица измерения – пг/мл.

Результаты. Разработана лекарственная плёнка продолжительного действия, содержащая VEGF. Выявлено, что использование лекарственной плёнки, содержащей VEGF, сопровождалось повышением показателя VEGF в плазме крови в 2 раза, начиная с первых суток исследования, показатель оставался высоким в течение всего исследования.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности разработанной лекарственной плёнки продолжительного действия. Высвобождение VEGF начиналось с первых суток исследования и продолжалось до 21-х суток. Высокие показатели VEGF, по мнению авторов, были связаны с экзогенным внесением VEGF в организм животных в виде плёнки продолжительного действия и индукцией эндогенного VEGF крыс.

Ключевые слова: трахея, лекарственная плёнка, VEGF, эксперимент, крыса

Для цитирования: Курганский И.С. Способ изготовления лекарственной плёнки продолжительного действия, содержащей VEGF. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 282-285. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.38.

A Method of Manufacturing a Long-Acting Medicinal Film Containing VEGF

Kurganskiy I.S.

Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (Bortsov Revolyutsii str. 1, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Corresponding author: Ilya S. Kurganskiy, e-mail: kurg.is@mail.ru

Abstract

Background. The development of new methods for delivering biologically active substances to the surgical site is a promising area of modern surgery. One of the biologically active substances used to stimulate regeneration is the vascular endothelial growth factor (VEGF). The search for ways to gradually and over a long period of time deliver VEGF to the surgical site is a promising area of research.

Aim. To develop a method for delivering VEGF to the surgical site and to assess its elimination in the early postoperative period.

Materials and methods. The study included 78 male Wistar rats at the age of 10 months. All animals underwent reconstructive surgery on the trachea, the animals were divided into 3 groups: group 1 – without a medicinal film, group 2 – with a medicinal film of prolonged action, group 3 – with a medicinal film of prolonged action containing VEGF. Blood sampling was carried out on days 1, 3, and 21 of the study, using the method of enzyme-linked immunosorbent assay to determine the level of VEGF in blood plasma, the unit of measurement was pg/ml.

Results. A long-acting medicinal film containing VEGF has been developed. It was revealed that the use of a medicinal film containing VEGF significantly increases the VEGF index in blood plasma by 26 times starting from the first day of the study and remained high throughout the study.

Conclusion. The results obtained indicate the effectiveness of the developed medicinal film of prolonged action. Elimination of VEGF starts from the first day of the study and lasts up to 21 days. High VEGF indices, according to the authors, are associated with the exogenous introduction of VEGF into the animal organism in the form of a prolonged-action film and the induction of endogenous VEGF in rats.

Key words: trachea, medicinal film, VEGF, experiment, rat

For citation: Kurganskiy I.S. A Method of Manufacturing a Long-Acting Medicinal Film Containing VEGF. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 282-285. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.38.

ОБОСНОВАНИЕ

Нарушение регенерации передней поверхности трахеи после перенесённых реконструктивных операций является актуальной проблемой современной хирургии. Одним из способов стимуляции регенерации является улучшение кровоснабжения трахеи. В литературе предложено большое количество способов: озонотерапия, клеточная терапия, гипербарическая оксигенация, использование лоскута тимуса или большого сальника [1–3]. Одним из факторов в организме, отвечающим за кровоснабжение тканей, является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Разработка лекарственной плёнки пролонгированного действия, содержащей VEGF, позволила бы изучить его воздействие на регенерацию передней поверхности трахеи в раннем послеоперационном периоде.

Одним из способов доставки биологически активных веществ является лекарственная плёнка пролонгированного действия. Лекарственные плёнки пролонгированного действия применяются для доставки лекарственных веществ в ткани организма в течение длительного времени после нанесения плёнки, с одномоментным высвобождением дозы вещества и высвобождением поддерживающей дозы с постоянной скоростью, соответствующей скорости элиминации и обеспечивающей постоянство желаемой терапевтической концентрации [4]. Разработка лекарственной плёнки пролонгированного действия, содержащей VEGF, поддерживающей длительную и постоянную концентрацию лекарственного вещества в тканях организма, является актуальной проблемой современной фармакологии и биотехнологий.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать лекарственную плёнку пролонгированного действия, содержащую VEGF.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на базе научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ ИНЦХТ, с использованием 78 белых крыс-самцов линии Wistar 10-месячного возраста с массой тела 300–350 г. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, что соответствует нормативам ГОСТ «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ» (виварий I категории, вет. удостоверение 238 № 000360 от 30 апреля 2015 г., служба ветеринарии Иркутской области) по утверждённому СОП [5]. Опыты на животных проводили в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утверждёнными Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных». Все оперативные вмешательства проводили в стерильных условиях под общим обезболиванием. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «ИНЦХТ» (протокол заседания № 8 от 26.06.2017 г.).

Разработку лекарственной плёнки пролонгированного действия проводили в группе фармацевтической разработки ФГБНУ «Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского» СО РАН совместно с к.м.н. Я.А. Костыро.

Апробацию лекарственной плёнки пролонгированного действия осуществляли путём интраоперационного размещения плёнки на передней поверхности трахеи после перенесённой реконструктивной операции. Моделирование реконструктивной операции на трахее производили путём выполнения линейного разреза трахеи на 1 хрящевое кольцо ниже перешейка щитовидной железы протяжённостью 2 хрящевых кольца по передней поверхности трахеи, с последующим ушиванием раны нитью пролен 7-0 одним Z-образным швом через хрящевое кольцо [6]. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки. Всем животным выполняли реконструктивную операцию на трахее. Животные были разделены на три группы: группа 1 – без лекарственной плёнки, группа 2 – с лекарственной плёнкой пролонгированного действия, группа 3 – с лекарственной плёнкой пролонгированного действия, содержащей VEGF. Забор крови для лабораторных исследований проводили у всех крыс в утренние часы на голодный желудок. Определение уровня VEGF плазмы проводили в лабораторном отделе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России совместно с к.м.н. Л.В. Зарецкой. Исследование выполняли с использованием метода иммуноферментного анализа, единица измерения – пг/мл (тест система eBioscience Rat VEGF-C Platinum ELISA BMS626/2 BMS626/2TEN, Австрия). За норму принимали показатели, полученные у шести здоровых животных, содержащихся в одинаковых условиях с экспериментальными крысами.

Все экспериментальные данные исследований были статистически обработаны с использованием программы Statistica 10.0 (лицензия № AXAR402G263414FA-V) и представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилями. Определение статистической значимости различий полученных данных (p) в сравниваемых выборках проведено с использованием непараметрических методов (U-критерий Манна – Уитни, W-критерий Вилкоксона) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изготовление лекарственной плёнки пролонгированного действия выполняли следующим способом: 1,5 части 30% водного раствора желатина с 10 частями физиологического раствора нагревали до температуры 70 °C, постоянно перемешивая до образования гомогенной жидкой субстанции. Далее прекращали процесс нагревания, не переставая перемешивать субстанцию. При остывании до температуры в 50 °C добавляли 1/10 часть поливинилпирролидона, при достижении 37 °C добавляли 1 часть альбумина, биологически активное вещество (VEGF). Полученную субстанцию разливали в полистироловые формы, предварительно обезжиренные спиртом. В форме равномерно раскладывали волокна лиофилизированного коллагена. Форму помещали в холодильник при температуре +4–6 °C. Через 48 часов плёнки отделяли от основы и затем металлическими лезвиями рассекали на полоски 5×5 мм. Готовые лекарственные плёнки подвергали низкотемпературной стерилизации этиленоксидом в течение 5 часов. Готовая лекарственная плёнка имеет шероховатую поверхность, эластичная, бледно-жёлтого цвета, прилипает к влажной поверхности. Каждую плёнку упаковывали в полиэтиленовую оболочку и герметично закрывали. Упакованные плёнки

до использования хранили в холодильнике при температуре +4–6 °С до 14 суток.

Концентрация VEGF в одной лекарственной плёнке 5×5 мм определялась в количестве 148,00 пг.

Рис. 1. Лекарственная плёнка в полистироловой форме
Fig. 1. Medicinal film in polystyrene form

Лекарственную плёнку перед применением извлекали из оболочки и размещали поверх линейной раны, высокая адгезия плёнки к тканям не требовала дополнительной фиксации к ране.

Основными заложенными характеристиками плёнки являлись высвобождение VEGF в течение 7 суток, создание аэро- и гемостаза в зоне реконструктивной операции, адгезия плёнки к стенке трахеи. Заявленные характеристики были достигнуты в лекарственной плёнке вышеуказанного состава и способа изготовления.

Оценка высвобождения VEGF плазмы крови проводилась на 1-е, 3-и, 7-е и 21-е сутки исследования (табл. 1).

При оценке количества VEGF на 1-е сутки исследования отмечается увеличение показателя в группе 3 ($p_U = 0,0050$) по сравнению с нормой. При сравнении между группами выявлены статистически значимые различия между группами 3 и 1 ($p_U = 0,0050$) и 3 и 2 ($p_U = 0,0050$).

На 3-и сутки исследования выявлено, что показатель VEGF в группе 3 был статистически значимо выше нормы ($p_U = 0,0050$). Между группами 1 и 3, 2 и 3 выявлены статистически значимые различия ($p_U = 0,0050$; $p_U = 0,0050$).

При анализе количества VEGF на 7-е сутки исследования показатель в группе 3 оставался выше нормы ($p_U = 0,0050$). При сравнении между группами 1 и 3, 2 и 3 выявлены аналогичные различия с предыдущими сроками исследования ($p_U = 0,0050$; $p_U = 0,0050$).

К 21-м суткам исследования показатель VEGF в группе 3 оставался повышен относительно нормы ($p_U = 0,0050$) и группы 1 ($p_U = 0,0050$).

При анализе показателя VEGF внутри группы 3 выявлено снижение показателя на 7-е сутки исследования ($p_W = 0,0277$), с дальнейшим снижением на 21-е сутки исследования ($p_W = 0,0277$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработана лекарственная плёнка пролонгированного действия с высвобождением VEGF в течение 21 суток, обеспечивающая аэро- и гемостаз в зоне реконструктивной операции и обладающая адгезией к стенке трахеи. При оценке высвобождения VEGF показатель в группе 3 был выше нормы в 26 раз на 1-е сутки исследования и выше, чем в группах 1 и 2 в течение всего исследования. Высокие показатели в группе 3, по мнению авторов, связаны с экзогенным внесением VEGF в организм животных в виде плёнки пролонгированного действия и индукцией выработки эндогенного VEGF крыс. Эффективность применения лекарственной плёнки пролонгированного действия, содержащей VEGF, и механизмы воздействия VEGF на регенерацию стенки трахеи являются перспективным направлением исследований и требуют дальнейшего изучения.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Решетов И.В., Шехтер А.Б., Кабисов Р.К. Применение воздушно-плазменного аппарата Плазон в режимах коагуляции и NO-терапии при реконструктивно-пластических операциях у онкологических больных. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2000; 4: 24–39.
2. Чернеховская Н.Е., Андреев В.Г., Поваляев А.В. *Лечебная бронхоскопия в комплексной терапии заболеваний органов дыхания: учебное пособие*. М.: МЕДпресс-информ; 2011.
3. Celik B, Meydan AD, Kefeli M, Gülen EK, Okumus NO. The effects of hyperbaric oxygen treatment on the healing of tracheal anastomosis following irradiation in rats. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 58(8): 481–485. doi: 10.1055/s-0030-1250273

Таблица 1
Результаты оценки количества VEGF в плазме крови (пг/мл) после реконструктивной операции на трахее (медиана, квартили)
Table 1
Results of assessing the amount of VEGF in blood plasma (pg/ml) after reconstructive surgery on the trachea (median, quartiles)

Группы	Сутки			
	1-е	3-и	7-е	21-е
Группа 1	4,1 (2,6–6,8)*	5,00 (4,5–7,0)*	8,9 (5,3–10,4)	12,4 (9,9–16,3)*, *
Группа 2	7,3 (5,6–15,6)	6,1 (3,1–10,2)	12,9 (7,4–14,7)	17,9 (11,9–26,4)*
Группа 3	232,2 (217,7–240,9)*, #, ^	246,3 (191,4–270,3)*, #, ^	187,3 (146,2–212,1)*, #, ^	42,1 (25,8–47,9)*, *
Норма	8,9 (8,2–10,0)			

Примечания. * – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с тем же показателем между группами 1 и 3 на один срок ($p_U \leq 0,05$); ^ – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с тем же показателем между группами 2 и 3 на один срок ($p_U \leq 0,05$); ° – статистически значимые различия по критерию Вилкоксона по сравнению с показателем в той же группе на 3–7-е сутки ($p_W \leq 0,05$); * – статистически значимые различия по критерию Вилкоксона по сравнению с показателем в той же группе на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$).

4. Коржавых Э.А., Румянцев А.С. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и действием. *Российские аптеки*. 2003; 4: 15-18.

5. Лепехова С.А. Программа стандартных операционных процедур: лабораторные животные (приём, содержание, уход и контроль здоровья животных в вивариях медицинского учреждения): учебное пособие. Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, ИГМУ; 2012.

6. Курганский И.С., Фаткулин Р.Р., Лепехова С.А., Махутов В.Н., Зарицкая Л.В., Костыро Я.А., и др. Лекарственная плёнка пролонгированного действия и способ её получения: Пат. № 2678200 Рос. Федерация. № 018127796; заявл. 27.07.2018; опубл. 24.01.2019; Бюл. № 3.

7. Спрейс И.Ф., Алферова М.А., Михалевич И.М., Рожкова Н.Ю. Основы прикладной статистики (использование Excel и Statistica в медицинских исследованиях): учебное пособие. Иркутск: РИО ГИУВа; 2006.

REFERENCES

1. Reshetov IV, Shehter AB, Kabisov RK. The use of the Plazon air-plasma apparatus in the modes of coagulation and NO-therapy in reconstructive plastic operations in cancer patients. *Annaly*

plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii. 2000; 4: 24-39. (In Russ.)

2. Chernehovskaja NE, Andreev VG, Povaljaev AV. *Therapeutic bronchoscopy in the complex therapy of respiratory diseases*: textbook. Moscow: MEDpress-inform; 2011.

3. Celik B, Meydan AD, Kefeli M, Gülen EK, Okumus NO. The effects of hyperbaric oxygen treatment on the healing of tracheal anastomosis following irradiation in rats. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 58(8): 481-485. doi: 10.1055/s-0030-1250273

4. Korzhavyyh EA, Rumjancev AS. Dosage forms with modified release and action. *Rossiyskie apteki*. 2003; 4: 15-18. (In Russ.)

5. Lepekhova SA. *The program of standard operating procedures: laboratory animals (reception, maintenance, care and monitoring of animal health in the vivariums of a medical institution)*: study guide. SCRRS, Irkutsk State Medical University; 2012. (In Russ.)

6. Kurganskiy IS, Fatkulin RR, Lepekhova SA, Makhutov VN, Zaritskaya LV, Kostyrov YaA, et al. Sustained-release medicinal film and method for its production: Patent N 2678200 of the Russian Federation. (In Russ.)

7. Spreis IF, Alferova MA, Mikhalevich IM, Rozhkova NYu. *Fundamentals of applied statistics (using Excel and Statistica in medical research)*: textbook. Irkutsk; 2006. (In Russ.)

Сведения об авторе

Курганский Илья Сергеевич – аспирант, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»; младший научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий, ФГБНУ Иркутский научный центр СО РАН, e-mail: kurg.is@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4386-5162>

Information about the author

Ilya S. Kurganskiy – Junior Research Officer at the Scientific Department of Experimental Surgery with Vivarium, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: kurg.is@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0146-3395>

Статья получена: 07.09.2020. Статья принята: 01.12.2020. Статья опубликована: 26.12.2020.
Received: 07.09.2020. Accepted: 01.12.2020. Published: 26.12.2020.