

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

На правах рукописи

Бульгина Инна Николаевна

Кинетика высвобождения доксорубицина из гибридных материалов с гидрогелевым компонентом

1.3.8 – «Физика конденсированного состояния»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата *физико-математических* наук

Научный руководитель: к.ф.-м.н. Сенатов Фёдор Святославович

Москва – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| Введение..... | 5 |
| Глава 1. Литературный обзор | 10 |
| 1.1 Высвобождение лекарственных средств из биомедицинских изделий | 10 |
| 1.2 Ортопедические имплантаты – носители лекарственных средств..... | 12 |
| 1.3 Классификация носителей лекарственных средств | 13 |
| 1.4 Математическое моделирование кинетики высвобождения | 15 |
| 1.5 Носитель лекарственных средств на основе биокерамики..... | 21 |
| 1.6 Носитель лекарственных средств на основе пористых полимерных матриц | 22 |
| 1.7 Носитель лекарственных средств на основе гидрогелей..... | 23 |
| 1.8 Существующие гибридные конструкции | 27 |
| 1.9 Выводы по Главе 1 | 27 |
| Глава 2. Материалы и методы | 29 |
| 2.1 Исходные материалы..... | 29 |
| 2.2 Разработка гибридной конструкции для восстановления костных дефектов..... | 30 |
| 2.2.1 Концепция гибридной конструкции..... | 30 |
| 2.2.2 Моделирование пористой структуры полимерной основы | 31 |
| 2.3 Разработка компонентов гибридной конструкции | 35 |
| 2.3.1 Синтез частиц биоактивной керамики | 36 |
| 2.3.2 Разработка пористой основы гибридной конструкции..... | 39 |
| 2.3.3 Получение гидрогеля | 40 |
| 2.4 Получение экспериментальных образцов гибридной конструкции | 42 |
| 2.5 Методики исследования структуры и состава разработанных биомедицинских материалов | 42 |
| 2.6 Методики оценки объемной пористости пористых полимерных матриц | 44 |
| 2.7 Методика исследования степени набухания высушенных гидрогелей | 44 |
| 2.8 Сорбция доксорубина разработанными носителями..... | 45 |
| 2.9 Методика исследования кинетики высвобождения доксорубина..... | 46 |
| 2.10 Формирование тканевых сфероидов | 46 |
| 2.11 Изучение кинетики роста сфероидов..... | 47 |
| 2.12 Изучение жизнеспособности сфероидов при воздействии доксорубина | 47 |
| 2.13 Изучение жизнеспособности сфероидов в присутствии диоксида, нагруженного доксорубином..... | 47 |
| 2.14 Исследование распластывания тканевых сфероидов | 48 |
| 2.15 Численное моделирование | 48 |
| 2.16 Статистический анализ..... | 48 |
| Глава 3. Исследование микроструктуры и свойств разработанных биомедицинских материалов.. | 49 |

| | | |
|--|---|-----|
| 3.1 | Изучение микроструктуры, фазового состава и свойств частиц биокерамики | 49 |
| 3.2 | Изучение микроструктуры и свойств материалов на основе СВМПЭ | 52 |
| 3.3 | Изучение микроструктуры и свойств гидрогелей | 56 |
| 3.3.1 | Набухание гидрогелевых материалов | 57 |
| 3.4 | Выводы по Главе 3 | 58 |
| Глава 4. Изучение сорбции и кинетики высвобождения лекарственных средств из компонентов гибридной конструкции..... | | 60 |
| 4.1 | Изучение частиц биокерамики как потенциального носителя лекарств | 60 |
| 4.1.1 | Выбор модельного лекарственного препарата..... | 61 |
| 4.1.2 | Оценка содержания и эффективности инкапсуляции доксорубина диоксидом | 62 |
| 4.1.3 | <i>In vitro</i> исследования на сфероиде из клеток HF и MG-63 | 63 |
| 4.2 | Исследование влияния условий адсорбции доксорубина на адсорбционную ёмкость пористых полимерных матриц | 68 |
| 4.3 | Исследование адсорбции и кинетики высвобождения доксорубина из пористых полимерных матриц | 69 |
| 4.4 | Адсорбция доксорубина гидрогелем | 71 |
| 4.5 | Исследование кинетики высвобождения доксорубина из гидрогеля | 73 |
| 4.6 | Диоксид и диоксид-содержащие материалы как носители лекарственных препаратов ... | 74 |
| 4.7 | Выводы по Главе 4 | 75 |
| Глава 5. Анализ кинетики высвобождения доксорубина из компонентов гибридной конструкции | | 76 |
| 5.1 | Кинетика высвобождения доксорубина из диоксида | 76 |
| 5.2 | Кинетика высвобождения доксорубина из пористых полимерных матриц | 80 |
| 5.3 | Кинетика высвобождения доксорубина из гидрогеля | 82 |
| 5.4 | Выводы по Главе 5 | 87 |
| Глава 6. Моделирование кинетики высвобождения доксорубина из гидрогеля сферической геометрии | | 88 |
| 6.1 | Модель гидрогеля сферической геометрии | 88 |
| 6.2 | Численное моделирование методом Ньютона | 89 |
| 6.3 | Численное моделирование методом конечных элементов | 94 |
| 6.4 | Модель ограничения адсорбционной ёмкости гидрогелевых систем..... | 99 |
| 6.5 | Постоянство начальной концентрации в гидрогелевых системах | 101 |
| 6.6 | Модель диффузии из слоя | 105 |
| 6.7 | Концентрационная зависимость кумулятивного высвобождения из гидрогелевых систем: модель ограниченного источника и модель эволюции системы | 107 |
| 6.8 | Влияние распределения доксорубина на его высвобождение из гидрогелевых материалов сферической геометрии..... | 110 |
| 6.9 | Оценка эффективного коэффициента диффузии..... | 117 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| 6.10 | Обобщенная модель высвобождения низкомолекулярных веществ из гидрогелей сферической геометрии | 119 |
| 6.11 | Методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии в гидрогелях сферической геометрии | 121 |
| 6.12 | Выводы по Главе 6 | 127 |
| Глава 7. | Изучение кинетики высвобождения доксорубицина из гибридной конструкции | 128 |
| 7.1 | Исследование сорбции доксорубицина гибридной конструкцией | 128 |
| 7.2 | Экспериментальное изучение кинетики высвобождения доксорубицина из гибридной конструкции | 130 |
| 7.3 | Модель высвобождения доксорубицина из гибридной конструкции | 131 |
| 7.4 | Преимущества гибридной конструкции перед индивидуальными компонентами | 133 |
| Выводы | | 134 |
| Список литературы | | 135 |
| Приложение 1 | | 147 |
| Приложение 2 | | 148 |
| Приложение 3 | | 149 |
| Приложение 4 | | 150 |

Введение

Создание носителей лекарственных средств является одним из наиболее развивающихся в настоящее время направлений. И хотя кинетика высвобождения лекарств зачастую должна удовлетворять классическим уравнениям химической кинетики, могут быть различные рекомендации к носителю, в частности, отложенное высвобождение или, например достижение какого-либо дополнительного эффекта. Наиболее интересны материалы платформ для локальной доставки, выступающие не только в качестве депо для лекарства, но и после высвобождения препарата, способствующие регенерации окружающих тканей.

Для регенерации костной ткани широко применяется биоактивная керамика и содержащие ее композиционные материалы. Неким керамическим стандартом является гидроксиапатит – минеральная составляющая костей, при этом биоактивные материалы как раз таки и отличает способность к осаждению апатита как в *in vitro*, так и *in vivo* условиях. Сами по себе керамические частицы активно исследуются в качестве платформ локальной доставки лекарств и в качестве альтернатив гидроксиапатиту предлагаются многие виды биоактивной керамики, которые могут, как обладать лучшими сорбционными характеристиками, так и в связи с химическим составом индуцировать процессы, способствующие регенерации костной ткани.

Поэтому важно исследовать новые материалы на предмет сорбции и высвобождения лекарственных средств, а также их поведение после имплантации. Это позволит подобрать необходимое количество носителя и обеспечить эффективную концентрацию препарата для снижения системной токсичности высвобождаемого вещества на организм. Для этого проводят моделирование кинетики высвобождения препарата, это позволяет минимизировать количество экспериментов и оптимизировать дизайн имплантируемого изделия. Еще в середине прошлого века были разработаны модели, которыми может быть описано высвобождение лекарственных средств, однако с совершенствованием технологий и появлением новых материалов, по-прежнему требуется теоретическое и экспериментальное изучение кинетики высвобождения лекарств. В частности, использование современного оборудования и программного обеспечения позволяет усовершенствовать методики моделирования таких параметров как высвобождение препарата или коэффициент диффузии.

Целью диссертационной работы является

Разработка моделей диффузионных процессов высвобождения доксорубицина из материалов для костных имплантатов.

В соответствии с обозначенной целью поставлены следующие задачи:

- Разработка диффузионной модели, описывающей процесс высвобождения доксорубицина из гидрогеля;
- Разработка методики экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии низкомолекулярного лекарственного средства в гидрогеле на основе экспериментальных данных с использованием аналитических решений и численного моделирования методом конечных элементов;
- Применение разработанных моделей к задачам со сложной геометрией;
- Разработка материалов костных имплантатов, исследование структурных и сорбционных характеристик разработанных компонентов;
- Исследование сорбции и кинетики высвобождения доксорубицина разработанными компонентами и гибридной конструкцией, оценка констант кинетики высвобождения в соответствии с основными математическими моделями высвобождения лекарственных средств.

Научная новизна

1. Предложена диффузионная модель высвобождения доксорубицина из гидрогеля сферической геометрии – носителя лекарств монолитного типа, на которой основана методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии и моделирования кумулятивного высвобождения из гидрогелевых конструкций сложной геометрии;

2. Установлено влияние состава и микроструктуры биомедицинских материалов (диопсид, пористые матрицы на основе СВМПЭ и СВМПЭ/Диопсид, гидрогель состава Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂) на высвобождение доксорубицина. Получены результаты по сорбции и высвобождению доксорубицина из этих материалов, результаты проанализированы с целью оценки констант и развития модельных представлений этих процессов;

3. Выявлена закономерность влияния состава гибридной конструкции на параметры сорбции и высвобождения доксорубицина;

4. Показана возможность применения диопсида и пористого композиционного материала СВМПЭ/Диопсид в качестве материалов костных имплантатов с возможностью функционализации противоопухолевыми препаратами.

Теоретическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в разработке диффузионной модели высвобождения доксорубина из гидрогеля сферической геометрии, описывающей процессы массопереноса при абсорбции и высвобождении доксорубина. Модель предложена для использования в разработанной методике экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии препарата в гидрогеле сферической геометрии и моделирования высвобождения лекарственных средств из гидрогелевых систем сложной геометрии.

Практическая значимость

Разработан комплекс биомедицинских материалов, включающий в себя как индивидуальные материалы, так и композиционные материалы, и гибридные конструкции для восстановления костей. Разработана гибридная конструкция для восстановления костных дефектов, по сравнению с компонентами имеющая улучшенную сорбцию и профиль кумулятивного высвобождения доксорубина.

Предложена методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии низкомолекулярных лекарственных средств в гидрогелях сферической геометрии и высвобождения лекарственных средств из гидрогелей сложной геометрии. Продемонстрирован способ использования предложенной методики в моделировании кумулятивного высвобождения на примере *in situ* заполнения дефектов коллагеном.

В совокупности полученные результаты могут быть использованы как основа дальнейших исследований материалов и конструкций *in vivo*, а также для подтверждения моделей на других системах.

Положения, выносимые на защиту

1. Зависимости между структурой, составом материалов и свойствами с точки зрения изучения сорбции и высвобождения доксорубина;
2. Зависимость кинетики выхода доксорубина от состава носителя и соответствующие константы кинетики высвобождения доксорубина из носителей трех видов, оцененные в соответствии с основными математическими моделями, описывающими высвобождение лекарств;

3. Модельные представления об абсорбции и высвобождении лекарств из гидрогелей сферической геометрии как носителей монолитного типа. Возможность использования решения уравнения диффузии для экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии лекарственного средства в гидрогелях сферической геометрии, описанных обобщенной диффузионной моделью абсорбции и высвобождения доксорубина системой Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂.

Достоверность полученных результатов

Достоверность экспериментальных результатов обеспечивается использованием современного оборудования, валидированных протоколов и необходимого количества повторов для применения методов статистического анализа. Достоверность теоретических моделей подтверждается экспериментальными результатами и численным моделированием.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертации отражены в 8 публикациях в журналах, индексируемых в Scopus. Предлагаемая концепция биомедицинского изделия и результаты испытаний *in vitro* и *in vivo* были опубликованы научной группой, выполнявшей проект РНФ №22-15-00216, в которую входит автор данной работы. Результаты работы были представлены на отечественных и международных семинарах и конференциях: Шестой междисциплинарный научный форум с международным участием Новые материалы и перспективные технологии, 23–27 ноября 2020 г., Москва, Россия; Smart Composites International School 2022, 14–20 августа 2022 г., Калининград, Россия; V Национальный конгресс по регенеративной медицине, 23–25 ноября 2022 г., Москва, Россия. Помимо этого, основные результаты были представлены на Российских и международных конференциях руководителем проекта.

Личный вклад

Личный вклад автора состоит в анализе литературных данных, синтезе биоактивной керамики, получении пористых полимерных материалов, получении гидрогелей, разработке и получении экспериментальных образцов гибридной конструкции, обработке результатов исследований, разработке методики исследования набухания гидрогелей, получении сфероидов и проведении исследований *in vitro*, проведении экспериментов по изучению сорбции и кинетики высвобождения доксорубина из разработанных компонентов и гибридной конструкции, обработке результатов и численном моделировании кинетики высвобождения, а также разработке

модельных представлений об абсорбции и кинетике высвобождения доксорубина гидрогелями сферической геометрии и методики оценки коэффициента диффузии в этой системе. Постановка задач, обсуждение научных результатов, выводов и положений, изложенных в работе, проводились совместно с научным руководителем Сенатовым Ф.С.

Благодарности

Автор выражает благодарность следующим людям за существенный вклад в работу:

- Коллективу лаборатории биологически активных наноструктур НИЦЭМ Гамалеи за изучение адсорбции и высвобождения белков разработанными материалами, проведение испытаний *in vivo*;
- Коллективам НИЦ композиционных материалов и НОЛ тканевой инженерии и регенеративной медицины Университета МИСИС за консультации и помощь на протяжении всего времени работы;
- Чоудхари Раджану, PhD, соавтору публикаций за обучение синтезу частиц биоактивной керамики;
- Кудан Елизавете Валерьевне, к.х.н., д.б.н., заведующий НОЛ тканевой инженерии и регенеративной медицины, за помощь в планировании и реализации экспериментов по изучению сорбции и высвобождения доксорубина и *in vitro* исследований на 3Д клеточной модели;
- Камшукову Ивану Дмитриевичу, старший специалист машинного обучения, ML Station, за вклад в разработку алгоритма для оценки коэффициента диффузии.

Объем и структура диссертации

Объем диссертации 150 страниц. Работа состоит из введения, 7 глав, выводов и списка использованных источников, состоящего из 154 наименований. В работе содержатся 19 формул, 21 таблица и 78 рисунков.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Высвобождение лекарственных средств из биомедицинских изделий

Биомедицинская инженерия – это мультидисциплинарная область, основной целью которой является разработка новых технологий и материалов для поддержки, восстановления или замены поврежденных клеток, тканей и органов [1]. Из разработанных материалов создают клеточно-инженерные конструкции, а также используют в качестве носителей (DC, drug carrier) фармацевтических агентов и биомолекул. Высвобождение лекарств из носителей представляет собой процесс выхода, то есть миграции, молекул лекарственного средства из исходного местоположения в пределах носителя на внешнюю поверхность, а затем и в окружающую среду [2]. Этот процесс является необходимым условием абсорбции лекарственного средства, поскольку лекарственный препарат должен быть в растворенном состоянии для обеспечения всасывания. Последнее не является обязательным условием в случае использования в качестве носителя наноразмерных систем [3]. Абсорбция или же всасывание лекарственного препарата – это процесс, посредством которого молекулы препарата переносятся в кровеносную систему, в значительной степени зависящий от физико-химических и биохимических свойств лекарственного средства, а также от ряда фармацевтических и анатомофизиологических факторов [4]. В качестве DC [5] могут использоваться, в частности для противоопухолевой терапии, неметаллические наночастицы, использование наночастиц позволяет преодолеть недостатки химиотерапевтического лечения за счет модификации биораспределения вещества после его введения в организм, а также фармакокинетики препарата [6-8]; металлические наночастицы такие как золото, серебро, титан, цинк или мель широко применяются в качестве носителей не только химиотерапевтических препаратов, но и антител и нуклеиновых кислот, преимуществом металлических наночастиц являются способность увеличивать растворимость гидрофобных веществ, а также же простота модификации поверхности, которая конъюгирует препараты чрез водородные связи, ковалентные и электростатические взаимодействия [9-11]; наночастицы из природных полимеров, например хитозан [12]; липосомы, которые могут нести как гидрофобные так и гидрофильные препараты, а включение противоопухолевых препаратов в липосомы позволяет увеличить их специфичность и биодоступность [13, 14]; дендримеры отличаются трехмерной сферической структурой, которая обладает монодисперсностью и высокой степенью симметричности, что достигается повторяющимися реакция роста в

процессе синтеза и высокой степени ветвления [15-17]; экзосомы – природные системы доставки лекарств, которые секретируются почти всеми видами клеток и обладают меньшей токсичностью по сравнению с синтетическими липосомами и дендримерами [18-20]. Следовательно, имплантироваться могут многие виды материалов, нагруженных препаратами. Выбор носителя лекарственного средства влияет на его высвобождение, что в свою очередь влияет как на кинетические, так и на количественные аспекты биодоступности препарата [21]. Биодоступность в свою очередь важнейшим аспектом фармакологии, влияющим на эффективность терапии. Это понятие определяет уровень всасывания активного вещества и скорость его всасывания при нахождении в целевой области. Контролируемое высвобождение лекарственного средства важно не только для достижения наиболее эффективного применения препарата, но и для предотвращения возникновения побочных эффектов [22]. Основной задачей систем доставки с контролируемым высвобождением является поддержание концентрации препарата в крови или в целевой области на эффективном уровне в течение продолжительного времени, потенциально предотвращая колебания концентрации, которые являются характеристикой мгновенного высвобождения. В результате достигается снижение системной токсичной на организм [23].

Разрабатываемый носитель предлагается к использованию в качестве конструкции, имплантируемой в область дефекта кости. Имплантируемые носители лекарств разделяют на два вида [24]:

- пассивные – системы, в которых высвобождение лекарственного средства предопределяется материалами, методами изготовления, составом лекарственного средства и не поддается контролю после имплантации;
- активные – системы, в которых высвобождение лекарственного средства контролируется после имплантации, используя механические, электрические, магнитные, лазерные или другие способы.

Таким образом, можно сделать вывод, что разрабатываемая система является пассивной. Пассивные системы в качестве движущей силы используют диффузию, осмотический потенциал или градиент концентрации, тогда как активные основаны на механической перекачке, электролизе и других способах приведения системы в действие [25, 26].

1.2 Ортопедические имплантаты – носители лекарственных средств

Ортопедические имплантаты используются для восстановления разрушенной кости различного происхождения: травмы, переломы, аутоиммунные и возрастные заболевания, резекция опухоли и хирургические осложнения [27]. Для этого используются материалы, структурные характеристики и механические свойства которых соответствуют свойствам кости, обеспечивая условия для первоначального роста и развития тканей. Уже традиционно в качестве материала восстановления костей используется гидроксиапатит (ГАП) – минеральная составляющая костей. Опробовано его использование как индивидуального материала, например при создании краниальных пластин [28], так и наполнителя композиционных материалов [29-32] и покрытия на титановых имплантатах [33, 34]. Одним из интересных способов использования фосфатов кальция является создание инъектируемых костных цементов [35]. Такие цементы состоят из порошковой части цемента и жидкой части на водной основе, которые смешиваются непосредственно перед применением и образуют пасту.

Одним из осложнений при имплантации является бактериальная инфекция [36, 37], поэтому функционализация имплантируемых изделий лекарственными препаратами позволяет материалу не только выполнять структурную поддержку, но и подавлять инфекцию и способствовать остеоинтеграции. Изучается высвобождение лекарственных средств [38] из полостей [39], покрытий [40-42] или модифицированной поверхности/структуры [43]. Высвобождаемый препарат может быть противовоспалительным [44]; антибактериальным [45], а также ортопедические имплантаты могут быть носителями противоопухолевых препаратов, например доксорубицин-содержащее покрытие на основе ГАП на титановой подложке [46], и даже факторов роста для стимулирования роста и дифференцировки клеток [47]. Рассмотренные ранее цементы используют при лечении костных инфекций, таких как остеомиелит, вызванных прежде всего стафилококками *S. aureus* и *S. epidermidis* [48]. Для этого используют полиметилметакрилат, нагруженный антибиотиком [49, 50], например при содержании клиндамицина 10 % масс. в цементе на основе полиметилметакрилата по прошествии 12 часов наблюдается 100% подавление бактериальной инфекции, вызванной *S. aureus* и *E. coli* [51].

1.3 Классификация носителей лекарственных средств

Носители лекарственных средств классифицируют по строению системы и состоянию препарата. На Рисунке 1 представлена схема, иллюстрирующая различные виды систем, нагруженных лекарством. В основном системы разделяют на резервуарные и монолитные [52].

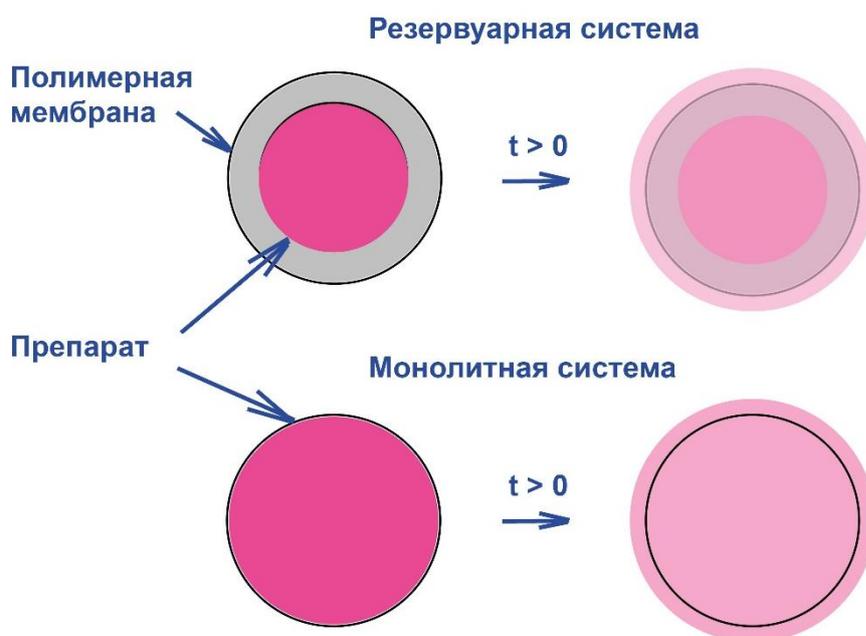


Рисунок 1 – Классификация систем, нагруженных лекарством

Резервуарные системы это один из самых распространенных типов систем с контролируемым высвобождением лекарства. В таких системах ядро из лекарства окружено полимерной оболочкой, при этом скорость высвобождения контролируется свойствами полимера, толщиной оболочки и физико-химическими свойствами препарата такими как растворимость, размер молекул и молекулярная масса [53]. Такие системы наиболее полезны для следующих применений:

- средне/долгосрочное введение препарата, целевое назначение которого находится в определенной обычно труднодоступной области, которую трудно достичь при системном введении, например орган или полость такой как глаз, также их используют для доставки токсичных препаратов, которые могут требовать длительных курсов введения;
- долгосрочное системное введение препарата, которое можно имплантировать внутримышечно или подкожно.

Примером носителя резервуарного типа являются имплантируемые изделия, полученные методом 3Д печати из полилактида, это цилиндрические системы, с одной стороны, закрытые мембраной, контролирующей скоростью высвобождения [39]. В данной работе показано, что изменение состава мембраны, полученной методом литья из раствора, путем увеличения доли поликапролактона приводит к увеличению размера пор и как следствие кумулятивного высвобождения. Другим примером является пластырь, изготовленный из депо, к которому присоединен массив микроиглолок, которые могут нарушить целостность кожного покрова, чтобы вещество проникало под кожу [54].

Монолитные системы представляют собой системы, например полимерные матрицы, в которых лекарственное вещество диспергировано или растворено [55]. Если препарат находится в растворенном состоянии это может привести к начальному взрывному высвобождению с поверхности [56]. Важную роль в высвобождении вещества из монолитных систем играет геометрия системы, все из-за увеличения среднего расстояния диффузии до выхода из системы. Ранее система микроиглолок была рассмотрена как система резервуарного типа, однако существуют схожие системы монолитного типа, на такой системе было продемонстрировано увеличение коэффициента диффузии при увеличении нагрузки и молекулярной массы вещества [57]. В качестве еще одного примера монолитной системы рассмотрим систему с иерархической структурой на основе диоксида кремния (Рисунок 2), которая представляет собой двойную мезо-макропористую структуру [58].

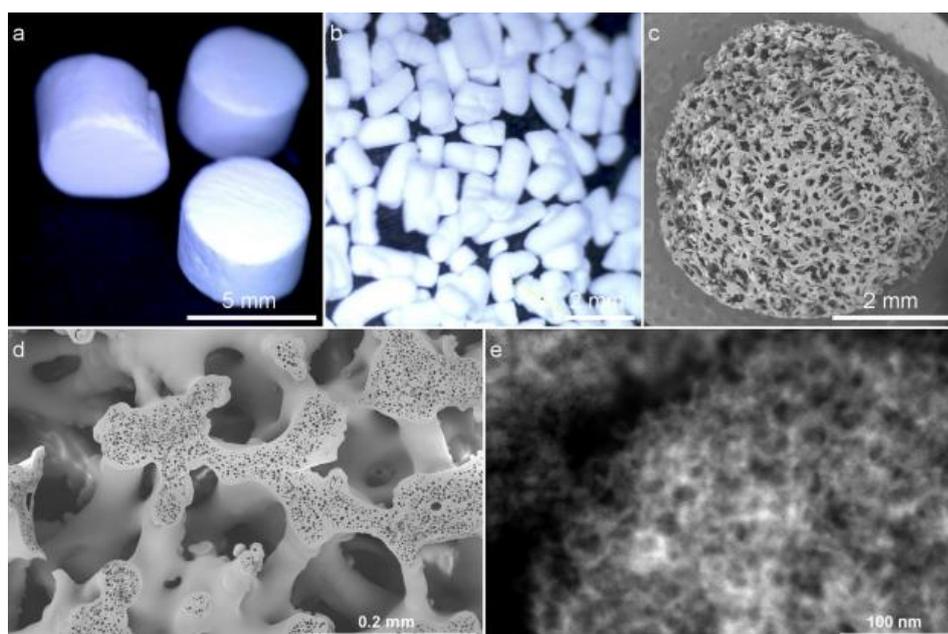


Рисунок 2 – Монолитные таблетки (а) и гранулы (b) из диоксида кремния с иерархической структурой [58]

В резервуарной системе же скорость высвобождения определяется диффузией через полимерную мембрану. В таких системах лекарство также может присутствовать как в растворенном, так и диспергированном состоянии. Мембрана способна поддерживать постоянство градиента концентрации до истощения источника [59]. Для обоих типов систем важна проницаемость полимера для лекарственных средств. Помимо этого, на диффузию влияют такие факторы как температура, размер молекул лекарственного вещества, состав матрицы (может влиять наличие добавок) и даже наличие молекул воды [60-61].

1.4 Математическое моделирование кинетики высвобождения

Моделирование высвобождения лекарства из ДС важно для понимания и механизма транспорта [62]. Математическое моделирование дает возможность уменьшить количество *in vitro* экспериментов, а также представление об элементарных физических и химических механизмах, регулирующих скорость и степень высвобождения препарата [63]. При этом часто принимается, что из набухшего матрикса вещество высвобождается под действием адвективного транспорта, молекулярной диффузии и гидродинамической дисперсии внутри системы. Математические модели высвобождения лекарственных средств описывают зависимость высвобождения от времени. С помощью математических моделей возможно моделирование носителей и их оптимизация, а с помощью экспериментальной верификации можно получить сведения о механизме высвобождения [64, 65].

Моделирование – это разработка математического представления для физической системы. А модель – описание системы, содержащее только основную о ней информацию. К математическим моделям относятся модели, в которых отношения между величинами, которые могут наблюдаться в системе, описываются как математические соотношения, хотя изначально проблема не формулируется в математической терминологии.

Достоинства в использовании математических моделей заключаются в отсутствии необходимости наличия физической системы, простоте работы и возможности проверить множество параметров, безопасности по сравнению с экспериментами в реальном мире.

Существует два основных подхода к построению математических моделей [66]:

- Физическое, или теоретическое, моделирование, использующее первичные принципы для моделирования компонентов, в основе которого лежит понимание системы;

- Экспериментальное моделирование, которое используя прототип или реальную систему, на основе экспериментов и наблюдений позволяет вывести модель.

Математическое моделирование высвобождения лекарственных средств из различных носителей служит для предсказания кинетики высвобождения лекарства и подбора оптимального носителя в зависимости от биомедицинского применения. В будущем математические модели, описывающие высвобождение лекарств, помогут в разработке носителей и понимании характера высвобождения сложных фармацевтических лекарственных форм. К системе доставки лекарств неприменима одна теория, поскольку системы могут включать комбинацию моделей. Поэтому перспективно создание спектра различных математических моделей, применимых к различным типам конструкций, различающихся геометрией, типом наполнителя и лекарственного средства. Чтобы выбрать модель, соответствующую системе доставки лекарств и типу задачи, возможно использование дерева решений [67]. При разработке модели необходимо принять во внимание следующие моменты:

- Для того чтобы уравнение не было слишком сложным в модель следует добавлять только доминирующие характеристики;
- Теория должна быть подтверждена экспериментами;
- Не существует математической теории, которая могла бы быть применена ко всем системам доставки лекарств;
- От теории следует отказаться, когда она терпит неудачу, даже если она согласуется с экспериментом [68].

Высвобождение лекарственного средства может контролироваться множеством механизмов и явлений [69, 70], таких как диффузия [71-73], эрозия или деградация [74, 75], набухание [76], растворение [77, 78], осмос [79]. Диффузия заключается в массопереносе молекул вследствие случайных колебаний молекул по градиенту концентрации, при этом разность концентраций уменьшается при постоянном движении вещества. Для оценки диффузионного массопереноса можно воспользоваться законами диффузии Фика.

Первый закон Фика:

$$F = -D \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (1.1)$$

где F – диффузионный поток;

c – концентрация диффундирующего вещества;

D – коэффициент диффузии.

Второй закон Фика:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right), \quad (1.2)$$

где c – концентрация диффундирующего вещества;

t – время;

D – коэффициент диффузии;

x, y, z – координаты.

В зависимости от типа и строения носителя, а также условий изучения высвобождения препарата для решения уравнения диффузии вводят в рассмотрение начальные и граничные условия. Начальные условия описывают начальное распределение вещества в системе, а граничные соответственно на границе изучаемой системы. Такие границы называют стационарными если размеры образцы постоянны с течением времени, то есть не происходит значительного набухания, растворения или эрозии системы. В противном случае граница будет движущейся, это означает, что в ходе эксперимента будет наблюдаться либо расширение границ если система набухает или сжатие вследствие ее разрушения. Одним из важнейших понятий в математическом моделировании кинетики высвобождения является «perfect sink conditions», оно означает, что концентрацию активного вещества в окружающей систему жидкости можно считать незначительной.

Для решения уравнения диффузии необходимо принять каким является значение коэффициента диффузии, в уравнении 1.2 коэффициент диффузии постоянен, однако он может зависеть от времени или координаты, что возникает при набухании, эрозии и деградации. В таком случае нет аналитического решения и используются численные решения. Если соблюдаются следующие положения для монолитных систем различной геометрии решение уравнения диффузии приведено на Рисунке 3: скорость высвобождения ограничивает диффузионный массоперенос; коэффициент диффузии постоянен; в течение всего времени исследования обеспечиваются «perfect sink conditions»; изучаемая система значительно не набухает или набухает очень быстро при контакте с жидкостью, а затем достигает состояния равновесия; за время исследования система значительно не разрушается; сопротивление массопереносу из-за наличия несмешивающихся граничных слоев на поверхности системы незначительно.

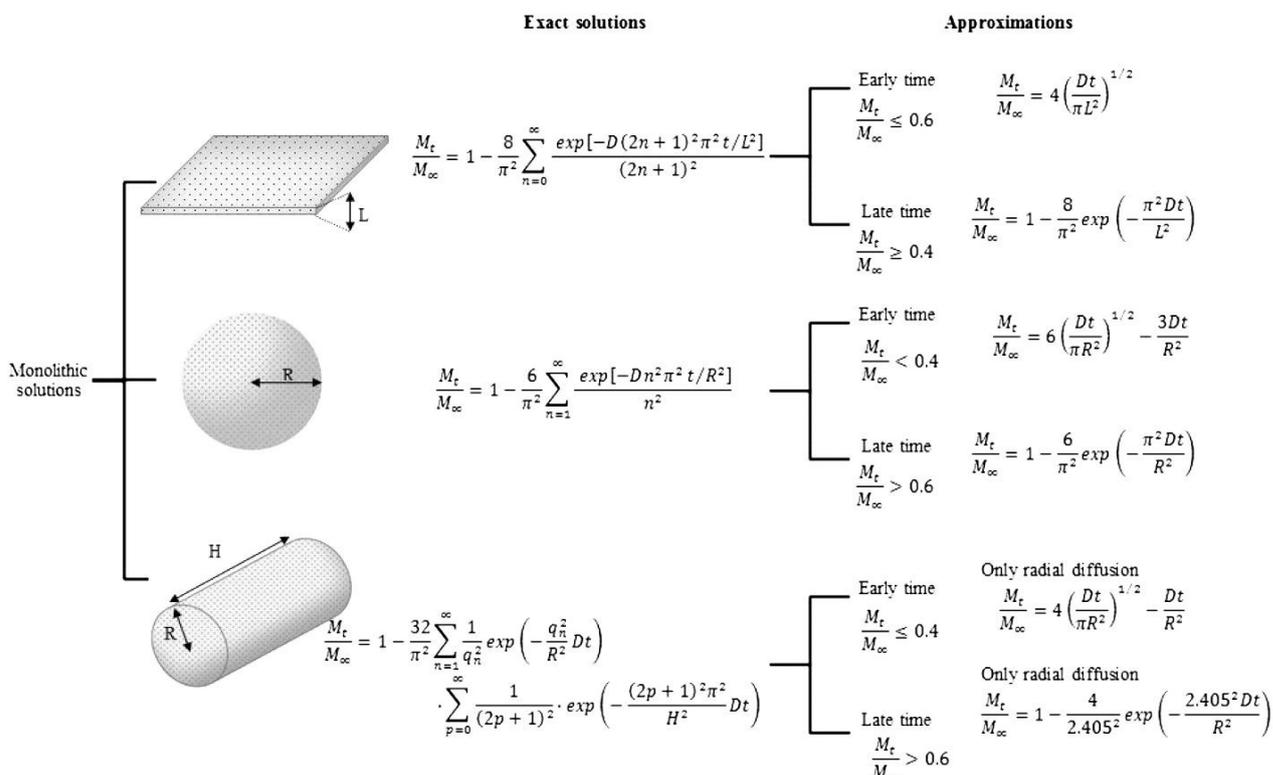


Рисунок 3 – Уравнения зависимости высвобождения препарата из монолитных систем различной геометрии с растворенным препаратом и постоянным коэффициентом диффузии [80]

Использование аналитических решений (exact solutions) возможно для всех временных точек вплоть до 100 % высвобождения, а приближенных решений (approximations) лишь в определенном диапазоне, однако стоит отметить, что точность таких численных решений будет по-прежнему очень высокой.

Когда высвобождение контролируется эрозией, выход лекарственного средства из системы управляется деградацией фармацевтической лекарственной формы в ходе химических или биохимических реакций. При набухании гидрофильные составляющие системы набухают при взаимодействии с водной средой, при проникновении среды в систему, она расширяется, что способствует растворению и перемещению вещества. Набухающие системы в какой-то степени ведут себя аналогично системам, контролируемым осмосом, где система окружена полупроницаемой мембраной. При проникновении жидкости через полупроницаемую мембрану возникающее осмотическое давление выталкивает препарат через отверстия. Растворение относится к смешиванию двух фаз с образованием раствора, что применительно к носителям лекарственных средств означает, что изначально твердое вещество образует раствор.

Другим способом описания зависимости кумулятивного высвобождения препарата от времени является использование стандартных математических моделей кинетики

высвобождения. В первую очередь это модели нулевого (1.3) и первого порядка (1.4), исходящие из основ химической кинетики [81, 82].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t, \quad (1.3)$$

где M_t/M_∞ – доля препарата, высвободившаяся за время t ;

k_0 – константа скорости нулевого порядка;

t – время.

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = k_1 t, \quad (1.4)$$

где M_t/M_∞ – доля препарата, высвободившаяся за время t ;

k_1 – константа скорости первого порядка;

t – время.

Для достижения кинетики нулевого порядка применяют нанесение частичных покрытий, механическое ограничение набухания, создание уникальной геометрии, изменение пористости со временем и создание слоистых конструкций с различными концентрациями вещества в слоях [83]. Помимо изменения строения системы [84] возможно создание градиента концентрации путем неравномерного распределения вещества. Таким образом возможно увеличение концентрации от внешней к внутренней частям системы, чтобы компенсировать уменьшение контактной области между твердым лекарственным средством и жидкостью и увеличение длины пути диффузии. Кинетика высвобождения первого порядка достижима для систем любой геометрии, поскольку скорость высвобождения лекарства пропорциональна концентрации, которая постепенно снижается, то и скорость высвобождения экспоненциально уменьшается со временем [85].

Другими наиболее распространенными математическими моделями кинетики высвобождения являются модель Хигучи (1.5) и модель Пеппаса (1.6).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t}, \quad (1.5)$$

где M_t/M_∞ – доля препарата, высвободившаяся за время t ;

k_H – константа скорости Хигучи;

t – время.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_p t^n, \quad (1.6)$$

где M_t/M_∞ – доля препарата, высвободившаяся за время t ;

k_0 – константа скорости Пеппаса;

t – время;

n – экспонента, характеризующая механизм высвобождения.

Обе модели являются приближениями начального времени, как было показано ранее для решения уравнения диффузии, и их применимость ограничена 60 % высвобождения. Модели Хигучи и Пеппаса являются лучшими математическими моделями кинетики высвобождения для оценки стабильности систем, поскольку помимо описания высвобождения препарата их матричных систем, они также объясняют стабильность. Стабильность препарата [86] определяется физической стабильностью, то есть постоянство размера, формы, pH и т.д.; химической стабильностью, постоянством химического состава, приводящего к поддержанию терапевтической активности и отсутствию образования токсичных продуктов; микробиологической стабильностью, которая включает стабильность в отношении стерильности препарата.

Модель Хигучи тесно связана с рассмотренным ранее понятием «perfect sink conditions», поскольку изначально она была разработана для описания высвобождения препарата из тонкого слоя мази в кожу [87], а затем уже была применена для моделирования кинетики высвобождения лекарств из других систем. Модель Пеппаса же представляет собой полуэмпирическую модель, которая описывает высвобождение лекарства как экспоненциальную функцию времени [88]. Для определения значения M_{∞} необходимо учитывать эффективность инкапсуляции препарата, поскольку если эффективность инкапсуляции равна 100 %, то значение M_{∞} будет совпадать с начальным количеством вещества, если нет, то M_{∞} будет равно нагруженному количеству препарата.

Модель Пеппаса можно модифицировать если имеется взрывное высвобождение (1.7) или же отложенное высвобождение (1.8), в таких случаях модель Пеппаса будет иметь следующий вид:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = b + k_p t^n, \quad (1.7)$$

где b – количество вещества, которое высвобождается сразу же после погружения системы в жидкую среду.

$$M_{i-l} = k_p M_{\infty} (t - t_l)^n, \quad (1.8)$$

где M_{i-l} – начальная масса препарата если учитывать, что высвобождение начинается во время l .

Среди определяемых параметров кинетики высвобождения выделяют экспоненту диффузии – параметр, являющийся показателем степени в модели Пеппаса. Его используют для исследования механизма диффузии. На Рисунке 4 представлены типовые значения этого параметра в зависимости от геометрии носителя.

Экспонента диффузии, n

| Пленка | Цилиндр | Сфера | Механизм высвобождения |
|-----------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| 0.5 | 0.45 | 0.43 | Диффузия |
| $0.5 < n < 1.0$ | $0.45 < n < 0.89$ | $0.43 < n < 0.85$ | Аномальный транспорт |
| 1.0 | 0.89 | 0.85 | Case-II |

Рисунок 4 – Зависимость механизма высвобождения препарата от значения экспоненты диффузии для систем разной геометрии [89]

Следовательно, выделяют 4 механизма высвобождения лекарственных средств из носителей. Когда механизмом высвобождения является Case II высвобождение происходит вследствие релаксации полимерных цепочек, а при аномальном транспорте высвобождение обусловлено как диффузией, так и набуханием. Также при дальнейшем увеличении n выделяют Super Case II, это происходит в системах, в которых после вступления матрикса в контакт со средой на поверхности образуется полностью гидратированный слой, который подвергается эрозии [90].

Механистически реалистичные математические теории [91] могут дать представление о механизме, управляющем высвобождением лекарственного средства; способах оптимизации системы; а также позволяют значительно сократить время и стоимость оптимизации системы. В соответствии с этим сочетание экспериментальных наблюдений с моделями помогает разобраться в физических основах процесса и определить механизм высвобождения.

1.5 Носитель лекарственных средств на основе биокерамики

Биокерамика применяется в реконструктивной хирургии уже более 50 лет, она биосовместима и обладают хорошими механическими свойствами, благодаря чему обеспечивается структурная поддержка [92]. Биокерамику классифицируют по таким характеристикам как инертность, биоактивность и резорбируемость [93].

Носители на основе биокерамики чаще всего являются частицами биокерамики [94], но также могут быть и объемными имплантируемыми изделиями [95]. В зависимости от типа керамики может меняться механизм высвобождения. Помимо диффузии также значительной может быть стадии деградации, которая вовлекается на поздних этапах исследования высвобождения из биорезорбируемых частиц. Вещество высвобождается по диффузионному механизму, когда скорость деградации мала по сравнению с диффузией

препарата. Также немаловажным является способность биоактивной керамики к осаждению апатитов на поверхности в *in vivo* условиях, этот слой на поверхности носителя может препятствовать диффузии лекарственного вещества [96]. Другим параметром, влияющим на кинетику высвобождения может быть размер частиц. Было показано, что при уменьшении размера частиц происходит увеличение выхода и как следствие изменения хода кривой, что вызвано увеличением удельной поверхности.

Рассмотрим методики создания носителей лекарственных средств на основе биокерамики. Как было отмечено ранее самой популярной биокерамикой является ГАП [97, 99], во многом благодаря его сходству по составу с нативной костью, а также относительной простоте получения, например методом соосаждения [100].

ГАП демонстрирует низкую растворимость при физиологическом pH и используется для локальной доставки путем инъектирования или имплантации. Для того чтобы создать носитель на основе ГАП используют следующие подходы [101]:

- Конъюгированные препараты или нагруженные в скаффолды на основе ГАП;
- Пористые или наноразмерные гранулированные частицы ГАП;
- Покрытые полимером частицы или наночастицы.

1.6 Носитель лекарственных средств на основе пористых полимерных матриц

Наряду с биокерамикой для восстановления костной ткани активно используются пористые полимерные матрицы, которые ввиду своих структурных особенностей будут имитировать нативную трабекулярную кость, способствуя адгезии клеток и прорастанию кровеносных сосудов [102-104]. В частности, в реконструктивной хирургии уже более 50 лет применяется сверхвысокомолекулярный полиэтилен [105], помимо эндопротезов [106] из него изготавливают пористые имплантируемые материалы [107, 108] и даже используют их в качестве носителей белков [109, 110].

Пористые полимеры активно изучают в качестве носителей лекарственных средств [111], множество способов получения обеспечивают различие структуры [112, 113], размера пор [114, 115], возможность создания градиента пористости [116] и градиента концентрации [59].

Пористые среды с точки зрения диффузии отличает необходимость оценки эффективного коэффициента диффузии, поскольку эти системы представляют собой извилистые заполненные средой пути, по которым диффундируют молекулы препарата. Для изучения диффузионных процессов в пористых материалах изучают их пористость и извилистость.

1.7 Носитель лекарственных средств на основе гидрогелей

Гидрогели представляют собой перспективный класс биоматериалов благодаря способности поглощать и удерживать воду и биологические жидкости, мягким условиям получения и отличной биосовместимости [117]. Использование гидрогелей в качестве носителей лекарственных средств возможно для инкапсуляции и контролируемого высвобождения лекарств и белков. Такая доставка может контролироваться следующими механизмами: диффузия, набухание и эрозия [118, 119]. Основным отличием гидрогелей от носителей других типов является осуществление процесса нагрузки препаратом. Так для гидрогелей характерна абсорбция, тогда как для других типов материалов – адсорбция. Ключевое отличие этих процессов заключается в том, что гидрогели вместе с водой способны поглощать лекарственное средство всем объемом. Таким образом хотя гидрогели и являются пористыми средами наряду с пористыми полимерами, они существенно превосходят последние по сорбционной ёмкости.

С развитием теории доставки лекарств ведутся споры касательно принадлежности гидрогелей к отдельному классу систем от монолитных матриц [53]. Для гидрогелей характерно несколько видов взаимодействий с препаратами: ковалентная связь, электростатическое взаимодействие, взаимодействие по типу «хозяин-гость» и гидрофобное взаимодействие (Рисунок 5) [120].



Рисунок 5 – Связи между гидрогелем и лекарством [120]

Те же типы связей присущи гидрогелям для его образования, традиционно гидрогели сшивают физически и химически [121]. Физически сшитые гидрогели образуются путем образования водородных связей, π - π взаимодействия, гидрофобного эффекта и электростатического взаимодействия. Физически сшитые гидрогели структурно нестабильны и обладают низкими механическими свойствами, потому что в местах сшивки случайно расположенные слабые межмолекулярные силы. Химическая сшивка гидрогелей улучшает их стабильность и механические свойства за счет прочных

однородных ковалентных связей, недостатком этого типа сшивки является использование токсичных сшивающих агентов и структурная необратимость ввиду невозможности ковалентных связей восстанавливаться спонтанно.

Формируемые сети характеризуются размером ячейки [122], а высвобождение помимо набухания может регулироваться сжатием (Рисунок 6). Размер ячейки один из важнейших параметров, влияющих на диффузию молекул лекарственного средства в объеме гидрогеля и зависит от концентраций полимера и сшивающего агента, а также от внешних стимулов. Желирование посредством полимеризации приводит к возникновению неравномерностей сетки и полидисперсности полимера, в результате размер ячейки может быть гетерогенным [123].



Рисунок 6 – Структура гидрогеля на молекулярном уровне [124]

Проницаемость гидрогелей относится к способности доставлять молекулы через эту трехмерную структуру [125]. Проницаемость зависит от таких факторов как молекулярная масса препарата, более крупные молекулы встречают большее сопротивление при движении в объеме материала и могут иметь ограниченную проницаемость; размер пор, который может контролироваться плотностью сшивки или введением порообразующих агентов в процессе синтеза; более высокая плотность сшивки в свою очередь приводит к меньшим порам; состав гидрогеля позволяет контролировать селективную проницаемость, позволяя одним молекулам беспрепятственно проходить в объеме материала и не допуская прохождения других.

Тогда, когда размер ячейки (mesh) больше размера молекулы препарата основным механизмом высвобождения является диффузия, маленькие же молекулы и вовсе могут свободно перемещаться в гидрогеле и диффузия в таком случае не зависит от размера ячейки. Для такой системы возможна оценка коэффициента диффузии с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна, согласно которому коэффициент диффузии зависит от радиуса молекулы вещества и вязкости раствора [126]. Если размеры ячейки и молекулы

лекарства близки, то на диффузию влияют стерические эффекты. Если размер ячейки очень мал или размер молекулы очень большой, сильный стерический эффект останавливает молекулу лекарственного средства, оставляя ее физически захваченной внутри полимерной сетки, это происходит до тех пор, пока система не деградирует или ячейка расширится, например при внешнем воздействии.

Гидрогели от других материалов отличает их способность к набуханию при контакте с термодинамически совместимым растворителем. Если гидрогель начинает контактировать с молекулами растворителя, они атакуют поверхность гидрогеля и проникают в полимерную сетку. Тогда считается, что нерастворимая стеклоподобная фаза отделена от резиноподобной фазы движущейся границей. При этом ячейки в резиноподобной фазе начинают расширяться, позволяя молекулам проникать в сетку гидрогеля [127]. В данном процессе осмотической силе противостоит сила упругости, которая уравнивает растяжение сетки и предотвращает ее деформацию, достигнув равновесия, где не происходит дополнительно набухания. Высвобождение лекарственного средства из набухшего нейтрального гидрогеля может быть описано явлениями конвекции воды и диффузии молекул лекарственного средства [128]. Гидрогель в данном случае можно рассматривать как смесь двух фаз: твердой полимерной сетчатой структуры и жидкой водной фазы, при этом предполагается, что обе фазы несжимаемы, полимерная сетка полностью насыщена водой и не происходит химических реакций.

Абсорбция воды гидрогелем из окружающей среды приводит к изменению размеров и физико-химических характеристик, такие изменения облегчают высвобождение лекарственного средства. Контролируемое высвобождение лекарственного средства из гидрогелевого материала происходит в 3 этапа: гидратация системы за счет поглощения среды, релаксация или эрозия полимера, выход растворенного лекарственного средства из разрушенного или гидратированного матрикса в окружающую среду [129].

Набухание гидрогелевых материалов описывают скоростью набухания, которая определяется рядом физико-химических параметров, такими как пористость и тип пористой структуры. Для этого разработана классификация гидрогелей в зависимости от пористости (Рисунок 7) [127]. Гидрогели разделяют на 4 класса: непористые, микропористые, макропористые и суперпористые.

| Тип | Морфология | Тип абсорбированной воды | Основной механизм набухания | Скорость набухания | Применение |
|---------------|--|--------------------------|--|---|--|
| Непористый | Без пористости | В основном связанная | Диффузия через свободные объемы | Очень медленная, зависит от размера образца | Контактные линзы, искусственные мышцы |
| Микропористый | Различная пористость с закрытыми порами (100-1000 Å) | В основном связанная | Сочетание молекулярной диффузии и конвекции в порах, заполненных водой | Медленная, зависит от размера образца | В основном в биомедицинских приложениях и контролируемом высвобождении |
| Макропористый | Различная пористость с закрытыми порами (0.1-1 μm) | В основном связанная | Диффузия в порах, заполненных водой | Быстрая, зависит от размера образца | В основном в суперсорбентах |
| Суперпористый | Высокая пористость с взаимосвязанными открытыми порами | В основном свободная | Капиллярные силы | Очень быстрая, зависит от размера образца | Системы доставки лекарств, тканевая инженерия |

Рисунок 7 – Классификация гидрогелей в зависимости от пористости [127]

Макропористые гидрогели характеризуются порами, которые гораздо больше молекул диффундирующего вещества, поэтому эффективный коэффициент диффузии определяется коэффициентом диффузии вещества в заполненных водой порах (1.9):

$$D_{eff} = D_{iw} \frac{K_p \varepsilon}{\tau}, \quad (1.9)$$

где D_{eff} – эффективный коэффициент диффузии;

D_{iw} – коэффициент диффузии вещества в заполненных водой порах;

K_p – коэффициент распределения;

ε – пористость;

τ – извилистость.

Было отмечено влияние 7 параметров на высвобождение лекарственных средств из гидрогелей. К ним относятся размер, форма, химический мономер, аффинность, вторичная система доставки, химические стимулы и физические стимулы [130]. Чтобы контролировать высвобождение посредством размера гидрогеля можно варьировать объем геля и его толщину [131], изменяя форму, меняется отношение площади поверхности к объему. Также на высвобождение влияют молекулярная масса, химический состав и концентрация мономера, и доля аффинных групп [132]. При наличии вторичной системы доставки возможно изменение концентрации частиц, при увеличении приводящее к увеличению высвобождения, и химического состава частиц [133]. Управление высвобождением за счет химических и физических стимулов возможно при

изменении концентрации химического стимула [134] и, например, интенсивности света [135].

1.8 Существующие гибридные конструкции

Гибридные конструкции – это мультикомпонентные системы для восстановления костных дефектов, которые за счет сочетания различных компонентов позволяют гибридам обладать улучшенными свойствами по сравнению с индивидуальными компонентами. Из представленных в литературе гибридных конструкций наибольшее соответствие предлагаемая в работе концепция имеет с гибридным имплантатом на основе пористого СВМПЭ, заполненного коллагеном [136]. Совмещение пористого СВМПЭ и коллагена было направлено на ускорение процессов остеоинтеграции.

В биомедицинской инженерии широко распространены гибридные покрытия на металлических имплантируемых изделиях, например на подложки из титана наносят покрытия из нанотрубок на основе оксида титана и стержневидных частиц Ag/F-ГАП [137], которые при нанесении попадают в пустоты нанотрубок, таким образом приводя к усилению адгезионной прочности покрытий. Создание гибридных покрытий направлено на преодоление ограничений однослойных покрытий, таких как коррозионная стойкость, адгезия и структурная целостность, путем комбинации органических и неорганических покрытий [138].

1.9 Выводы по Главе 1

В Главе 1 представлен литературный обзор теоретических и экспериментальных работ в области изучения кинетики высвобождения лекарственных средств из носителей, которые в том числе могут применяться для восстановления костных дефектов.

Разработанная концепция гибридной конструкции была реализована в рамках выполнения проекта РФФИ №22-15-00216 «Гибридные имплантаты с рекомбинантными белками, обеспечивающими остеогенные и антибактериальные свойства, для лечения патологий костной ткани, в том числе, осложненных инфекцией». Отличием от данной работы является использование в качестве препарата белков: костного морфогенетического белка 2 (BMP-2) и лизостафина, а также отличие состава используемого гидрогеля. В проекте предлагается гидрогель на основе желатиновой и ксантановой камедей. Гидрогель на основе альгината натрия был использован на первом этапе реализации проекта, но не являлся достаточным для успешного выполнения

поставленных задач. В данном проекте предлагается комплекс имплантируемых материалов и изделий, одним из которых является композиционный гидрогель, состоящий из геллановой и ксантановой камедей, наполненный частицами диопсида. Частицы использовали как носитель BMP-2, а гидрогель – лизостафина, поскольку диопсид продемонстрировал слабую связывающую способность к лизостафину. Однако ввиду необходимости вводить очень большие количества диопсида (80% масс. от массы высушенного композиционного гидрогеля), гидрогель на основе альгината заменили из-за разрушения при помещении композиционного гидрогеля в среду.

В данной работе усиление способности полимерной матрицы сорбировать и высвобождать лекарственное средство предлагается путем введения в поры гидрогеля. Для этого предлагается разработать биосовместимый гидрогель, который можно ввести в пористый полимер, например на основе альгината натрия, поскольку это один из наиболее популярных биосовместимых гидрогелей.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Исходные материалы

В качестве исходных реагентов для синтеза биоактивной керамики были использованы:

- Нитрат кальция (РусХим, Россия) и яичная скорлупа, использовались в качестве источника кальция;
- Нитрат магния и оксид магния (РусХим, Россия) в качестве источника магния;
- Тетраэтоксисилан (TEOS, 99,99%, ЭКОС-1, Россия) и рисовая шелуха (BeerMachines, Россия) в качестве источника кремния;
- Глицин в качестве восстановителя для осуществления экзотермической реакции при синтезе диоксида;
- Концентрированная азотная кислота (70%) в качестве катализатора процесса гидролиза TEOS;
- Дистиллированная вода.

Для получения пористых полимерных матриц на основе сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ) и композиционного материала на основе СВМПЭ и биоактивной керамики были использованы:

- Порошки СВМПЭ марок GUR 4113 (*Ticona GmbH*, Германия) и UTEC с молекулярной массой около $3,9 \cdot 10^6$ и $8 \cdot 10^6$ г/моль соответственно;
- Выварочная соль NaCl с размером частиц 300-500 мкм и менее 300 мкм сферической морфологии;
- Порошок диоксида, полученный золь-гель методом горения с механоактивацией.

Для получения биосовместимого гидрогеля были использованы следующие материалы:

- Порошки альгината натрия (Na-Alg) разной молекулярной массы;
- Порошок натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-CMC);
- Хлорид кальция CaCl_2 , безводный.

Для проведения исследований *in vitro* были использованы:

- среда Игла, модифицированная по Дульбекко (DMEM, кат.# 12491-015, Gibco (США));
- Фетальная бычья сыворотка (FBS, кат.# 16000-044, Gibco (США));
- Антибиотик-антимикотик (кат.# 15240-062, Gibco (США));
- Раствор трипсина-ЭДТА (кат.# 25200-114, Gibco (США));
- Фосфатно-солевой буфер (PBS, кат.# 18912-014, Gibco (США));
- L-глутамин (кат.# F032, Панэко (Россия));
- CellTox Green kit (кат.# G8742, Promega (США));
- Натриевая соль резазурина (кат.# R7017-5G, Sigma-Aldrich (США)).

Для проведения исследований сорбции и кинетики высвобождения были использованы:

- Доксорубин (DOX, 2 мг/мл, Teva, Нидерланды);
- Фосфатно-солевой буфер (PBS);
- HCl.

2.2 Разработка гибридной конструкции для восстановления костных дефектов

Разработка гибридной имплантируемой конструкции включает несколько этапов: разработка концепции конструкции, выбор материалов компонентов, выбор методов изготовления компонентов, получение экспериментальных образцов и проведение исследований компонентов и гибридной конструкции.

2.2.1 Концепция гибридной конструкции

Гибридная конструкция, или же гибрид, для восстановления костных дефектов должна быть биоактивной и обладать структурой, имитирующей структуру нативной трабекулярной кости, в идеальном случае даже анизотропией, а также схожими механическими свойствами. Помимо этого, гибридная конструкция может нести дополнительную функциональную нагрузку, быть носителем лекарственных препаратов, обеспечивающих повышение регенеративного потенциала, подавление инфекций и угнетение опухолевых клеток.

На Рисунке 8 представлена иллюстрация концепции гибридной конструкции для восстановления костных дефектов, одним из возможных мест имплантации, на которых

изучается поведение имплантируемых материалов *in vivo*, является бедренная кость мыши. Согласно концепции гибридной конструкции в качестве пористой полимерной основы предложены пористые СВМПЭ и композиционный материал СВМПЭ/Диопсид, поры которых заполнены гидрогелем состава Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂.



Рисунок 8 – Иллюстрации концепции гибридной конструкции для восстановления костных дефектов

2.2.2 Моделирование пористой структуры полимерной основы

В качестве материала полимерной основы гибридной конструкции предлагается СВМПЭ, биоинертный полимер, уже много лет применяющийся в качестве материала эндопротезов. Из-за высокой вязкости расплава некоторые способы переработки этого полимера недоступны. Получение пористых материалов из СВМПЭ возможно методом термопрессования с порообразующим агентом, с последующим удалением порообразующего агента. Структура такого пористого материала (пористость и размер пор) должна имитировать структуру нативной трабекулярной кости. Ранее автором также был предложен способ получения изделий сложной формы на основе СВМПЭ, структура которых повторяет структуру трабекулярной кости [139, 140].

Для улучшения остеоинтеграции в полимерную матрицу вводят биоактивную керамику, таким образом получают биоактивные композиционные материалы. Ранее научной группой под руководством Сенатова Ф.С. и Карягиной-Жулиной А.С., сформированной для выполнения работ по РНФ №16-15-00133, были исследованы пористые композиционные материалы на основе СВМПЭ и гидроксиапатита в том числе в экспериментах *in vivo* на краниальных дефектах мышей. В данной работе в качестве наполнителя композиционного материала на основе СВМПЭ предложен диопсид (CaMgSi₂O₆). Его введение в матрицу СВМПЭ возможно с помощью механоактивационной обработки.

Пористость материалов на основе СВМПЭ является одним из ключевых параметров при разработке имплантируемых конструкций для восстановления костных дефектов. Значение этого параметра сравнивали со значением объемной пористости нативной трабекулярной кости – 50–90 %. Для расчета количества порообразующего агента провели моделирование достижения порога перколяции. Одним из популярных методов моделирования случайных процессов является метод Монте-Карло. Следовательно, для оценки значения порога перколяции реализовано простейшее моделирование методом Монте-Карло, где случайным процессом являлось расположение частиц соли в матрице СВМПЭ (Приложение 1). Порог перколяции определяет, когда образуется связная сетка, что в случае с термопрессованием СВМПЭ приводит к эффективному удалению порообразующего агента и как следствие связной пористости.

Принято, что для создания смеси СВМПЭ/соль используется соль сферической морфологии со средним размером частиц 300 мкм. Для подбора минимального содержания соли, при котором наблюдается перколяция, создана 2Д-модель, которая визуализирует сечение образца. Эта модель представляет собой квадрат, в котором в произвольном порядке расположены N сферических частиц соли. Для максимального совпадения с реальным экспериментом размер квадрата и частиц подобраны таким образом, чтобы в масштабе модели диаметр частиц был около 300 мкм. Для большого количества частиц карта распределения выглядит очень похоже на образцы пористого СВМПЭ без дополнительно увеличения (Рисунок 9). Определившись с этими параметрами, количество частиц N варьировали от 10 до 140. На Рисунках 10-11 представлены полученные модели в зависимости от количества частиц.

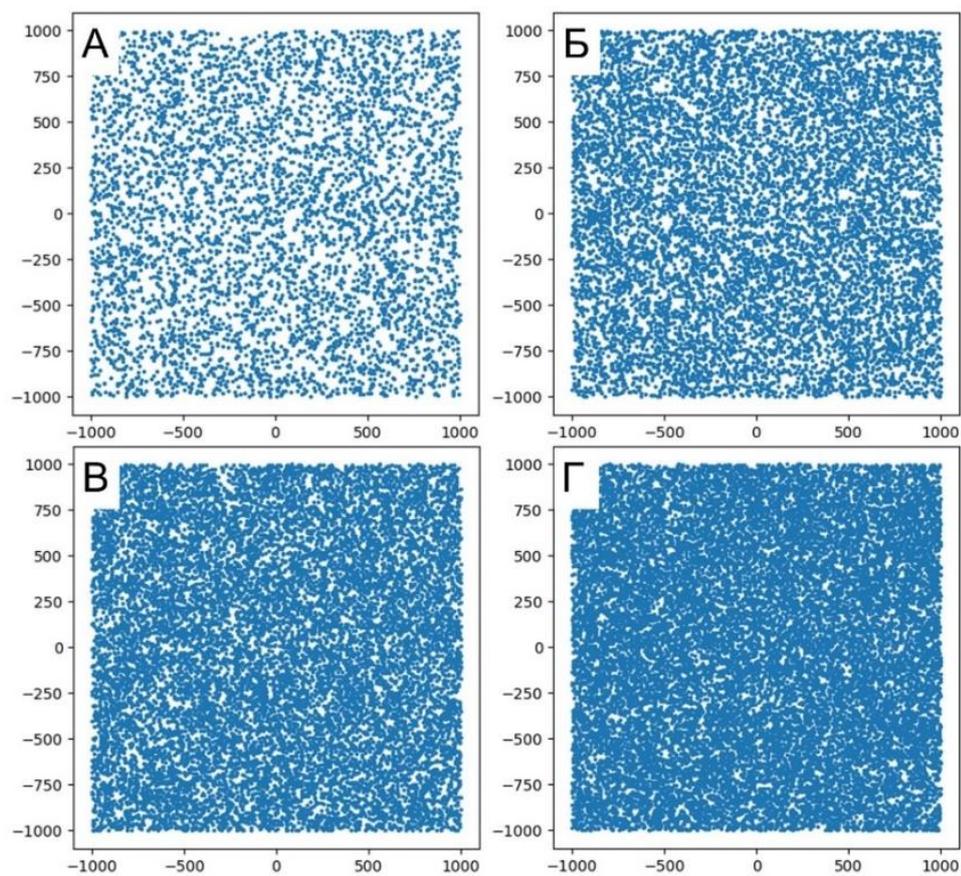


Рисунок 9 – Случайное распределение N частиц соли: 5000 (А), 10000 (Б), 15000 (В), 20000 (Г)

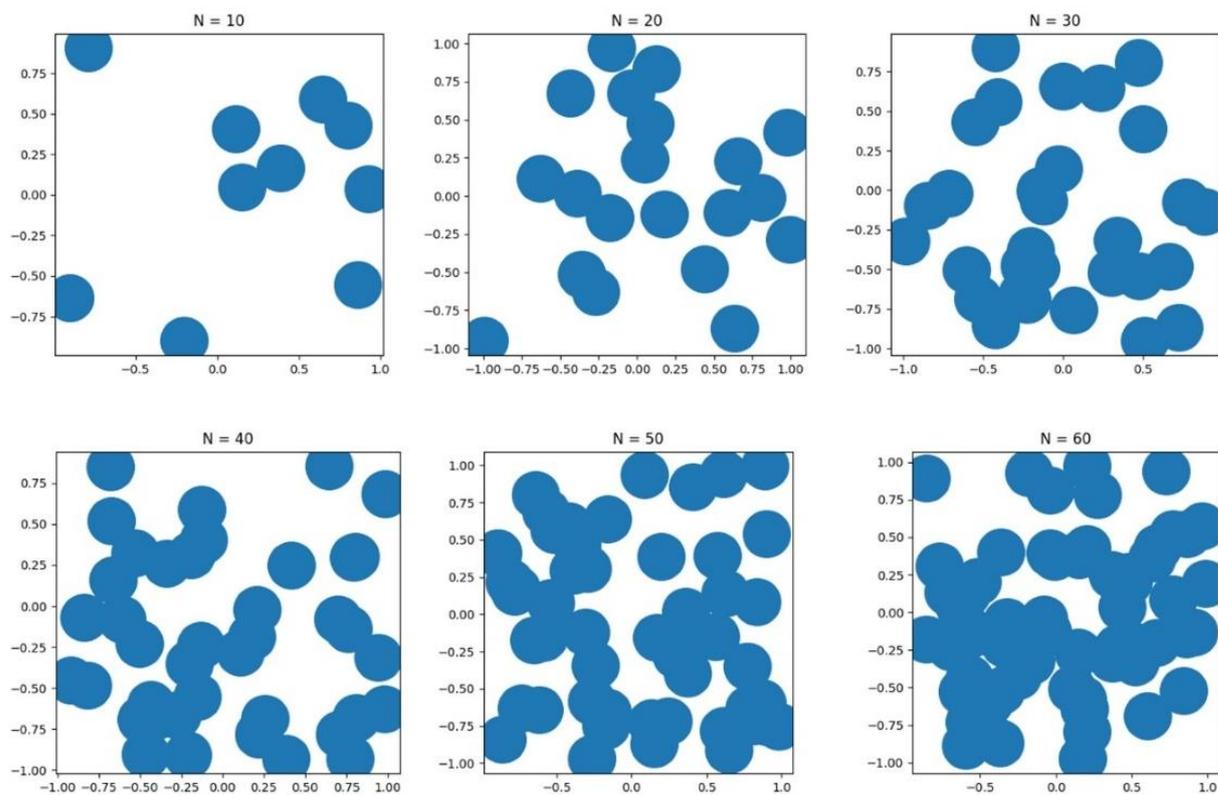


Рисунок 10 – Карты распределения соли при числе частиц от 10 до 60

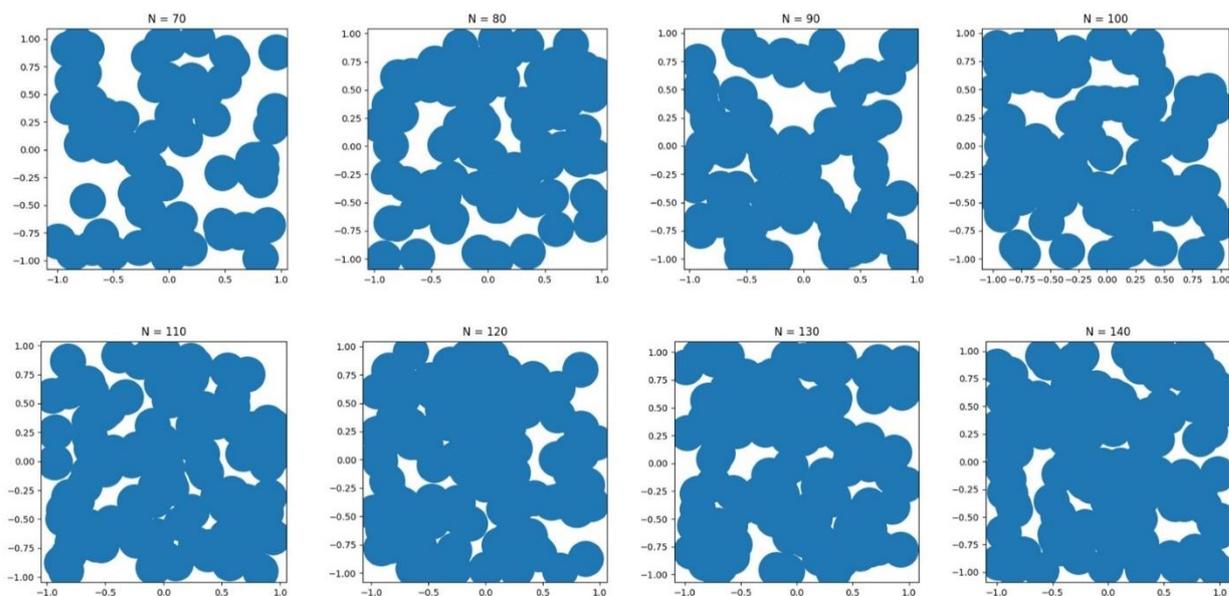


Рисунок 11 – Карты распределения соли при числе частиц от 70 до 140

Наблюдающееся слияние частиц на картах распределения отражает естественный процесс, когда более мелкие частицы находятся рядом и образуют более крупные поры. Чтобы связать модели со значением объемной пористости необходимо обработать каждое изображение. Для этого было использовано программное обеспечение ImageJ в режиме threshold 8-bit изображений, позволяющее по градации серого оценить долю частиц на изображении. В Таблице 1 приведены значения объемной пористости в зависимости от количества частиц и массовой доли, а на Рисунке 12 представлен график зависимости объемной пористости полимерных матриц в зависимости от массовой доли соли в смеси.

Таблица 1. Зависимость объемной пористости от массовой доли соли

| Количество частиц N | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Массовая доля соли в смеси, % | 30 | 50 | 60 | 67 | 78 | 80 | 83 | 86 | 87 | 90 | 92 | 92 | 92 | 95 |
| Объемная пористость, % | 16 | 30 | 39 | 47 | 61 | 63 | 67 | 72 | 75 | 79 | 84 | 84 | 84 | 89 |

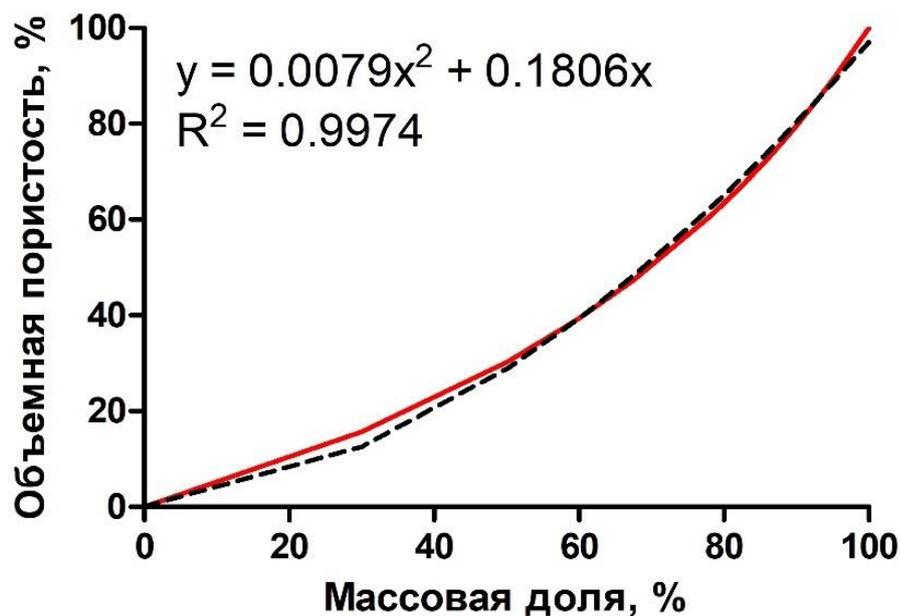


Рисунок 12 – Зависимость объемной пористости (%) пористого СВМПЭ от массовой доли (%) соли в смеси

Согласно полученным данным порог перколяции соли в СВМПЭ составил 60 % масс. В результате измерения объемной пористости материалов на основе СВМПЭ методом гидростатического взвешивания значение пористости составило 79 ± 3 %. При содержании соли 90 % масс. это значение хорошо согласуется со смоделированным – 79 %, что говорит о возможности прогнозирования объемной пористости образцов при значениях соли выше порога перколяции. В соответствии с перколяционной моделью получено уравнение, связывающее массовую долю соли в смеси с объемной пористостью СВМПЭ, при приведении смоделированной кривой и линии тренда к общему началу (отсутствие пористости при прессовании образца без соли) получим уравнение вида (2.1):

$$\varphi = 0,0079 * \omega^2 + 0,1806 * \omega \quad (2.1)$$

где φ – объемная пористость (%);

ω – массовая доля NaCl в смеси (%).

2.3 Разработка компонентов гибридной конструкции

В данной работе впервые разработан композиционный материал на основе СВМПЭ и диоксида. Также автором синтезированы порошки биоактивной керамики, которые рассматривались в качестве наполнителя полимерного композиционного материала.

Состав гидрогеля оптимизирован под задачи исследования и был изучен автором данной работы относительно интересующих свойств.

2.3.1 Синтез частиц биоактивной керамики

Как потенциальный носитель лекарственных средств были рассмотрены 3 вида биоактивной керамики: волластонит (CaSiO_3), форстерит (Mg_2SiO_4) и диопсид. Эти представители силикатной керамики были получены твердофазным методом согласно опубликованной методике [141].

Также эти материалы были получены золь-гель методом горения [142]. В основе этого синтеза лежит гидролиз и поликонденсация тетраэтоксисилана под действием катализатора – азотной кислоты, а также протекание экзотермической окислительно-восстановительной реакции при окислении топлива.

Рассмотрим методики синтеза на примере диопсида, выбор диопсида обусловлен результатами адсорбции и высвобождения костного морфогенетического белка 2 (BMP-2), обсуждение результатов находится в разделе 4.1. Диопсид принадлежит к семейству тройных силикатных биокерамик состава CaO-MgO-2SiO_2 и среди них выделяется более низкой скоростью деградации, улучшенными механическими свойствами и хорошей цитосовместимостью [143].

Для синтеза биоактивной керамики – диопсида, которую в данной работе использовали в качестве носителя DOX и наполнителя композиционного материала на основе СВМПЭ, был использован золь-гель метод горения с механоактивацией. Данная методика направлена на первичное зародышеобразование в процессе экзотермической реакции горения топлива и уменьшение размера частиц и как следствие увеличение поверхностной энергии в процессе высокоэнергетического измельчения. Методика была опробована для получения частиц волластонита - другого представителя силикатной керамики (CaSiO_3) [144].

2.3.1.1 Твердофазный синтез

Для синтеза диопсида твердофазным методом было произведено смешивание при помощи планетарной шаровой мельницы [145]. В качестве источников кальция и кремния были использованы яичная скорлупа и рисовая шелуха соответственно. Яичная скорлупа была промыта под проточной водой, а затем помещена в воду, нагретую на магнитной мешалке до 100°C , на 3 часа при постоянном перемешивании. Затем очищенную скорлупу

сушили в сушильном шкафу 24 часа при температуре 150°C, после чего измельчали в ступке до образования порошка. Рисовую шелуху промывали дистиллированной водой, а органические составляющие удаляли погружением в серную кислоту разной концентрации. После обработки кислотой шелуху промывали, сушили при 110°C, после чего нагревали в муфельной печи до 730°C и выдерживали при этой температуре 25 минут до образования белого порошка.

Измельченную скорлупу (CaCO₃), оксид кремния, извлеченный из рисовой шелухи, (SiO₂) и синтетический оксид магния (MgO) брали в соотношении 1 : 2 : 1 в соответствии с формулой диопсида и смешивали в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 5 (Fritsch GmbH, Germany) в агатовых барабанах с агатовыми мелющими телами. После этого полученная смесь была подвергнута кальцинации в муфельной печи при температуре 1100 °C в течение 6 часов.

2.3.1.2 Золь-гель метод горения

В отличие от твердофазного метода золь-гель метод обеспечивает перемешивание на молекулярном уровне, что позволяет минимизировать фазообразование вторичных фаз, возникающее из-за образования нестехиометрических областей богатых кальцием, при синтезе диопсида такой фазой часто является акерманит. Для синтеза диопсида данным способом окислитель (нитраты металлов) и органическое топливо (глицин) были взяты в стехиометрическом соотношении, соотношение окислитель/топливо было рассчитано в соответствии с уравнением (2.2) [146]:

$$\phi(\text{Glycine}) = \frac{\text{Oxidation valency of Ca and Mg nitrate}}{-(\text{Reducing valency of glycine})} = \frac{-20}{-9} = 2,22 \text{ M} \quad (2.2)$$

В качестве источника кальция был использован раствор нитрата кальция, полученный из яичной скорлупы, обработанной как описано в разделе 2.3.1.1. Для приготовления 1М раствора нитрата кальция 37,5 мл концентрированной азотной кислоты добавили к 25 г порошка яичной скорлупы. Смесь оставили в колбе на 12 часов, а после отфильтровали непрореагировавшие вещества используя фильтровальную бумагу. Полученную жидкость довели до 250 мл деионизированной водой.

Эквимольярные концентрации нитрата магния и нитрата кальция смешивали в лабораторном стакане до образования гомогенного раствора, после чего добавляли раствор глицина и 2М TEOS. Для того чтобы начался процесс гидролиза рН раствора

довели до значения 1,7 путем добавления по каплям концентрированной азотной кислоты при постоянном перемешивании. Запуск процесса гидролиза приводит к поликонденсации и превращению раствора в гель. Формирование вязкой гелеподобной структуры было обнаружено после перемешивания при нагреве до 50°C, последующий нагрев до 100°C приводит к образованию плотного геля. Полученный гель подвергали старению при комнатной температуре в течение 2-3 дней, после чего гель сушили в сушильном шкафу при температуре 150°C. В процессе наблюдалось пожелтение геля, а затем частичное разрушение до порошкообразного состояния. Высушенный гель помещали в муфельную печь, предварительно нагретую до 300°C, что приводило к протеканию экзотермической реакции горения топлива с выделением большого количества газов. Выделяемое при реакции тепло участвует в кристаллизации продукта, тогда как газы способны приносить пористость. Полученный порошок кальцинировали в муфельной печи при температуре 1100°C в течение 6 часов.

2.3.1.3 Золь-гель метод горения с механоактивацией

Синтез практически не отличается от синтеза, описанного в подразделе 2.3.1.2 Золь-гель метод горения. Помимо нитрата кальция полученного из яичной скорлупы в качестве источника кальция в работе также использовался синтетический нитрат кальция в виде раствора необходимой концентрации. Ожидаемыми улучшениями относительно предыдущего метода синтеза является уменьшение размера частиц вследствие механоактивационной обработки прекурсора.

Ранее данный метод был использован для получения частиц волластонита, а затем исследованы скаффолды на основе полилактида и волластонита. Рассмотрим методику синтеза, адаптированную для получения частиц диопсида.

Полученный после протекания реакции горения глицина при нагреве порошок подвергали кальцинации при температуре 700°C для того, чтобы удалить остатки углерода и нитратов. Затем порошок механоактивировали в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 5 (Fritsch GmbH, Germany) в течение 2 часов с целью уменьшения размера частиц. Механоактивация проводилась в агатовых барабанах при скорости вращения 300 об/мин и соотношении массы мелющих тел к порошку 5/1. Механоактивированный порошок кальцинировали при температуре 1100°C в течение 6 часов для достижения фазовой чистоты.

Введение дополнительной механоактивации по сравнению с предыдущим синтезом было направлено на уменьшение размера частиц, однако последующая кальцинация

приводит к образованию мезопористых частиц, что также является эффективным подходом к увеличению удельной поверхности материала.

2.3.2 Разработка пористой основы гибридной конструкции

В качестве материала пористой основы гибридной конструкции предложен СВМПЭ, одобренный для медицины материал, который применяется, в частности, для изготовления эндопротезов суставов, обеспечивая относительно малый износ и хорошие трибологические характеристики. Пористую основу получали методом термопрессования с выщелачиванием порообразующего агента, в качестве такого агента выбрана соль NaCl определенного размера. В исследовании рассмотрены две марки СВМПЭ разной молекулярной массы: GUR 4113 – $3,9 \cdot 10^6$ г/моль и UTEC – $8 \cdot 10^6$ г/моль. СВМПЭ является гидрофобным полимером, что в случае с восстановлением костных дефектов не является предпочтительным, для получения гидрофильного материала можно использовать несколько подходов.

Для модификации в матрицу СВМПЭ вводят биоактивную керамику, таким образом получают биоактивные полимерные композиционные материалы, также это является подходом к гидрофилизации поверхности. Ранее научной группой под руководством Сенатова Ф.С. изучались пористые и сплошные материалы на основе СВМПЭ и гидроксиапатита, а разрабатываемый в данной работе материал является продолжением этого направления. На основе полученных ранее результатов выбрано содержание диоксида в композиционном материале на основе СВМПЭ – 20 % масс.

Помимо этого, были опробованы методы химического травления хромосерной кислотой и низкотемпературной плазменной обработки. В результате был оценен краевой угол смачивания и индекс окисления данных материалов.

2.3.2.1 Механоактивация и смешивание

Порошки СВМПЭ и диоксида подвергали механоактивации, а СВМПЭ и механоактивированной смеси СВМПЭ/диоксид смешиванию при помощи планетарной шаровой мельницы Fritsch Pulverisette 5 (Fritsch GmbH, Германия). Для этого использовали агатовые барабаны и мелющие тела в виде агатовых шаров диаметром 10 мм. Механоактивацию проводили, используя 6 агатовых шариков на 1 г порошка, в течение 30 циклов – 3 минуты вращения/5 минут пауза, со скоростью 370 об/мин.

Для изготовления пористых образцов в качестве порообразующего агента была выбрана соль NaCl. Выварочная соль сферической морфологии была разделена на фракции при помощи набора сит. Таким образом, были получены фракции соли размером более 800 мкм, 500-800 мкм, 300-500 мкм, менее 300 мкм.

Для приготовления смесей с солью, фракции 300-500 мкм и менее 300 мкм были взяты в соотношении 65% и 35% соответственно, масса соли составляла 90% масс. от массы смеси. На каждые 5 г смеси брали 1 мелющее тело. Смешивание проводили в течение 12 циклов (10 мин / 3 мин) со скоростью 90 об/мин.

2.3.2.2 Термопрессование

Термопрессование смесей СВМПЭ/соль и СВМПЭ/Диоксид/соль проводили, используя гидравлический пресс с нагревателем, в прессформе с отверстием диаметром 27 мм. После нагрева до 180°C на пресс-форму начинали оказывать давление, по достижении 190°C нагрузка составила 60 МПа, суммарное время нагрева 55 минут. После этого начинали стадию выдержки при этой температуре в течение 3 часов и охлаждения под давлением.

2.3.2.3 Удаление порообразующего агента

По окончании термопрессования образцы извлекали из пресс-формы, с образцов удаляли алюминиевые фольги, препятствующие прилипанию образцов к пресс-форме. Полученные образцы взвешивали на аналитических весах, измеряли их толщину, после чего помещали в дистиллированную воду и подвергали воздействию ультразвука (УЗ) в УЗ ванне. После этого образцы сушили в сушильном шкафу при температуре 70°C и повторно взвешивали. По массам образцов до и после обессоливания рассчитывали пористость образцов, которая должна соответствовать теоретическому значению – 90%.

2.3.3 Получение гидрогеля

Для создания гибридной конструкции для восстановления костных дефектов было необходимо получить биосовместимый гидрогель, который можно ввести в пористый полимерный матрикс. Возможно использование следующих подходов для введения гидрогеля в пористый полимер: инъектирование, желирование после введения и сшивка погружением в сшивающий агент заполненного матрикса. В данной работе выбран

последний способ введения. Для этого необходимо чтобы вязкость раствора полимерной основы позволяла его введение в полимерную матрицу. Таким образом, оказалось возможным выбрать наиболее известный биосовместимый гидрогель на основе альгината натрия, который может быть сшит с помощью физической ионной сшивки в присутствии ионов кальция (Рисунок 13) [147].

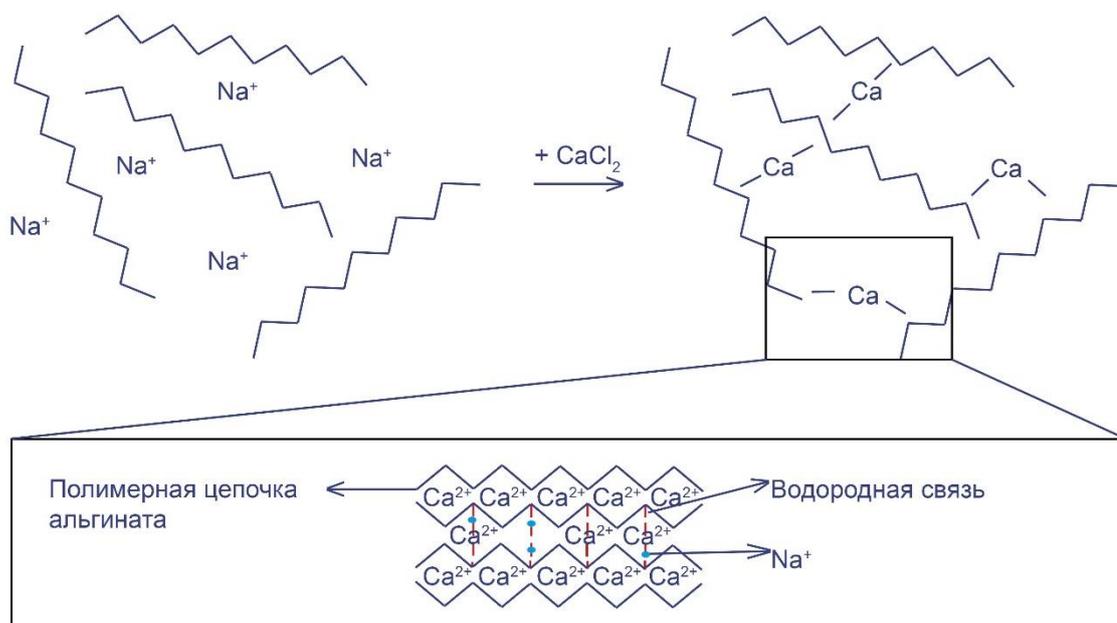


Рисунок 13 – Иллюстрация физической сшивки альгината натрия ионами кальция

Альгинаты состоят из двух видов блоков, которые могут быть расположены в неправильном порядке, это М-блоки и G-блоки, являющиеся соответственно маннуроновой кислотой и гулууроновой. Альгинат натрия подвергается физической сшивке ионами кальция в соответствии с моделью «яичной коробки», где межмолекулярные связи формируются между двухвалентным катионом и G-блоками. На физические свойства гидрогеля влияют такие параметры как молекулярная масса, длина G-блока и соотношение M/G. Физическая сшивка является обратимой, например при погружении в раствор PBS происходит постепенное замещение Ca^{2+} на Na^+ .

Модификация свойств гидрогеля возможна введением наполнителей или других полисахаридов. В частности, для изменения вязкости раствора и степени набухания гидрогеля использована натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы.

В данной работе были получены гидрогели на основе альгината натрия с добавлением натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы различных концентраций, сшитые 3% масс./об. раствором CaCl_2 . Для этого был приготовлен раствор альгината натрия путем растворения порошка альгината натрия в дистиллированной воде, нагретой до 50°C , при постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки. Затем в этот раствор

добавляли порошок Na-CMC и перешивали до полного растворения, из полученного раствора удаляли пузырьки и с помощью пипетки формировали образцы известного объема. Сшивку гидрогелей проводили добавлением раствора хлорида кальция к гелеобразующему раствору, для полной сшивки оказалось достаточно порядка 20 минут для образцов данного объема, достижение полной сшивки характеризуется максимальной оптической плотностью.

Поскольку основными механизмами высвобождения из гидрогелей являются диффузия, деградация и набухание, было изучено набухание гидрогелей. Как будет показано, возможно отсутствие набухания вовсе при некоторых концентрациях полимерной основы гидрогеля, а также набухание много свыше 100% восстановления, что приведет к выходу гидрогеля из ограниченной области гибридной конструкции.

2.4 Получение экспериментальных образцов гибридной конструкции

На основе предложенной концепции гибридной конструкции для восстановления костных дефектов и выбранных материалов были получены экспериментальные образцы. Экспериментальные образцы изготовлены из пористого СВМПЭ и композиционного материала СВМПЭ/Диопсид и гидрогеля на основе Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂. Выбор диопсида обоснован в Главе 4 данной работы.

Для этого из пористых СВМПЭ и СВМПЭ/Диопсид были нарезаны образцы тех же размеров, что и образцы для исследования адсорбции и кинетики высвобождения DOX пористыми полимерными матрицами, затем образцы в микроцентрифужных пробирках заливали гелеобразующим раствором и центрифугировали, после чего погружали в раствор хлорида кальция.

2.5 Методики исследования структуры и состава разработанных биомедицинских материалов

2.5.1 Определение прочности при сжатии

Статические испытания на сжатие проводились для образцов пористого СВМПЭ и СВМПЭ/Диопсид прямоугольного сечения в соответствии с ASTM D695-15 при помощи универсальной испытательной машины Zwick/Roell Z020 (Zwick GmbH & Co. KG, Германия), оснащенной датчиками на 1 и 20 кН. В результате были определены предел прочности и модуль Юнга при сжатии.

2.5.2 СЭМ/ЭДС

Представленные в данной работе СЭМ микрофотографии, а также карты распределения элементов получены в режиме вторичных электронов с помощью сканирующей электронной микроскопии, совмещенной с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией. СЭМ/ЭДС проведена с помощью сканирующего электронного микроскопа VEGA 3 (TESCAN, Чехия), оснащенного ЭДС детектором (SDD-X-act Detector, Oxford Instruments Inc., Оксфорд, Великобритания).

Также частицы биокерамики, полученные золь-гель методом горения были исследованы с помощью сканирующего электронного микроскопа MIRA 3 (TESCAN, Чехия) в Техническом университете Дортмунда.

Методом СЭМ проводили исследование формы и размера частиц керамики; формы и размера пор, а также пористости пористых полимерных матриц на основе СВМПЭ; микроструктуры гидрогелей, а также методом ЭДС проводили элементный анализ полученных образцов. Поверхность образцов перед изучением была покрыта слоем углерода (~10 нм).

2.5.3 СПЭМ

Изображения тёмного поля для частиц биокерамики были получены в режиме сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (СПЭМ) в ЦКП «Визуализации высокого разрешения» Сколковского института науки и технологий на просвечивающем электронном микроскопе Titan Themis Z (Thermo Fisher Scientific, США) при напряжении 200 кВ.

2.5.4 ИК-Фурье спектроскопия

С помощью ИК-спектроскопии методом нарушенного полного внутреннего отражения были исследованы порошки биоактивной керамики, СВМПЭ и композиционный материал СВМПЭ/диоксид, а также высушенные гидрогели. Для этого был использован спектрометр Nicolet 380 (Thermo Scientific, Waltham, MA, США). Это позволило исследовать материалы на предмет наличия функциональных групп, а также оценить индекс окисления материалов на основе СВМПЭ.

2.5.5 Рентгенофазовый анализ

Порошковая рентгеновская дифракция (РФА) один из основным методов исследования керамики, подтверждающий фазообразование. Он используется как для описания эволюции фаз, так и оценки размера кристаллитов. Для проведения РФА использовался дифрактометр Ultima IV (Rigaku, Япония). Съемка проводилась в диапазоне от 10° до 100° при скорости сканирования $5^\circ/\text{мин}$. Источник излучения Co K α ($\lambda = 1,7902 \text{ \AA}$).

2.5.6 Оценка дзета-потенциала

Оценка дзета-потенциала позволяет оценить возможное электростатическое взаимодействие материалов с лекарствами, биологическими молекулами и клетками. Изучение дзета-потенциала получаемых порошков керамики было проведено с использованием анализатора распределения по размерам и дзета-потенциала частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Оценка дзета-потенциала по экспериментальным данным проводилась в соответствии с уравнением Смолуховского.

2.6 Методики оценки объемной пористости пористых полимерных матриц

Для оценки объемной пористости полимерных матриц на основе СВМПЭ были обработаны СЭМ микрофотографии в программном обеспечении ImageJ. Для этого была использована функция threshold для выделения интересных областей по градации серого 8bit изображения. Помимо оценки по микрофотографиям пористость была оценена по объему поглощенной жидкости. Для такого исследования необходимо знать массу образца и массу поглощенной жидкости известной плотности, в данной работе в качестве такой жидкости был использован изопропиловый спирт.

2.7 Методика исследования степени набухания высушенных гидрогелей

Исследование кинетики набухания гидрогелей не является стандартизированным исследованием, поэтому в ходе экспериментов разработана методика исследования набухания гидрогелей на основе альгината натрия.

Исследование состоит из следующих этапов:

1. Образцы после получения взвешиваются на аналитических весах;

2. Образцы подвергаются сушке при выбранных условиях (либо в сушильном шкафу, либо в лиофильной сушке);

3. Высушенные образцы взвешиваются, их масса и толщина в идеальных условиях должны быть одинаковыми.

В случае исследования композиционных гидрогелей с частицами и без них, большее внимание нужно обратить на совпадение геометрических размеров, поскольку разница в массе образцов с частицами при увеличении их содержания может значительно увеличиваться, несмотря на те же размеры;

4. Образцы помещаются в среду (дистиллированная вода или PBS) для исследования набухания, на каждый образец приходится 200 мл жидкости на 1 г высушенного гидрогеля;

5. По прошествии 2 минут, образцы аккуратно извлекаются из бюкса, в зависимости от состояния образца при помощи пинцета или ложки, и кладутся на фильтровальную бумагу, затем переворачиваются, чтобы убрать всю влагу с поверхности и взвешиваются;

6. Образцы снова помещаются в жидкость на 3 минуты, затем извлекаются, удаляется поверхностная влага, взвешиваются (точка 5 минут). Затем еще на 5 минут (точка 10 минут), 20 минут (точка 30 минут), 30 минут (точка 1 час), 1 час (точка 2 часа) и т.д;

7. Измерения продолжают первые несколько часов, затем раз в сутки. Продолжительность проведения исследования зависит от способности исследуемого гидрогеля к набуханию. Эксперимент считается успешно завершенным, когда масса образца выходит на плато.

В результате проведенных измерений рассчитывается степень восстановления и степень набухания. В зависимости от состава исследуемого образца и среды восстановление может быть более 100%, при этом образцы теряют свою первоначальную форму, контуры становятся более размытыми и образуются трещины. Такое явление имеет место при исследовании набухания в PBS, это обусловлено наличием в буферном растворе ионов, при избытке которых образец начинает растворяться за счет постепенного замещения ионов кальция на ионы натрия и разрушения сшивков.

2.8 Сорбция доксорубина разработанными носителями

Доксорубин использовался в качестве модельного лекарственного средства для изучения сорбции и кинетики высвобождения из компонентов и вариантов гибридной

конструкции. Проверялись различные условия сорбции, в зависимости от типа носителя. Общая схема такова, что навеска определенной массы заливалась раствором DOX, концентрация которого соответствует рабочим растворам, предлагаемым для медицинского использования. После выдержки надосадочная жидкость собирается и анализируется на содержание остаточного DOX при помощи спектрофотометра.

Для подтверждения наличия DOX и определения его концентрации, растворы анализировали при помощи мультимодального микропланшетного ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) при длинах волн возбуждения и испускания 470 и 590 нм соответственно.

2.9 Методика исследования кинетики высвобождения доксорубина

Носители, нагруженные DOX, заливались 1 мл PBS, через определенное время среда отбиралась и заменялась свежим PBS. Отобранная жидкость исследовалась на спектрофотометре, при необходимости проводилось разбавление. Исследование проводили до выхода на плато или полного высвобождения препарата.

В частности, нагруженный DOX порошок диоксида инкубировали при комнатной температуре в 1 мл PBS (pH 5,5 и 7,4) в течение 28 дней. В каждой временной точке (1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17, 19, 22, 26 и 28 дней), 1 мл супернатанта отбирали и заменяли 1 мл свежего PBS (pH 5,5 и 7,4). Остальные носители изучали при pH 7,4.

2.10 Формирование тканевых сфероидов

Для формирования тканевых сфероидов как модели трехмерной ткани были использованы два типа клеток: клетки линии MG-63 (остеосаркома человека, приобретены в АТСС) и первичные фибробласты человека (HF, приобретены в Lonza (кат.# CC-2511)). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% FBS с добавлением 1-кратного раствора антибиотика/антимикотика и 2 мМ L-глутамин. Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ и рассаживали при достижении 85-95% конфлюэнтности.

Для снятия клеток с подложки и подготовки суспензии использовали раствор 0,25% трипсина/0,53мМ ЭДТА. В клетках отсутствовала контаминация микоплазмой, что было подтверждено окрашиванием с помощью DAPI (Invitrogen, кат. # D1306).

Тканевые сфероиды из клеток HF и MG-63 получены в планшетах для формирования сфероидов (Corning spheroid microplates, Corning, кат.# 4520). Для этого

монослой клеток с конфлюэнтностью 95% промывали раствором Версена (Панэко, кат.# P080), снимали с подложки при помощи раствора 0,25% трипсина/0,53мМ ЭДТА (Gibco, кат.# 25200-114), а затем ресуспендировали в культуральной среде. При этом концентрация клеток составила $8 \cdot 10^4$ клеток/мл. 100 мкл клеточной суспензии вносили в лунки планшета для формирования сфероидов, который затем инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂.

2.11 Изучение кинетики роста сфероидов

Кинетика роста сфероидов была исследована на сфероидах с начальной концентрацией 8000 клеток на сфероид. Для изучения роста сфероидов 24 сфероида из каждого типа клеток были сфотографированы при помощи оптического инвертированного микроскопа Eclipse Ti-S (Nikon, Japan) во временные точки 1, 2, 3 и 6 дней.

2.12 Изучение жизнеспособности сфероидов при воздействии доксорубина

Однодневные сфероиды, сформированные из 8000 клеток, подвергали обработке различными концентрациями доксорубина (10^{-3} – 10^{-8} М, шаг разбавления 3,16). После 48 и 72 часов инкубации в культуральную среду был добавлен 0,02% раствор резазурина, а затем при помощи мультимодального планшетного ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, USA) измерен сигнал флуоресценции при длине волны возбуждения 555 нм, а испускания – 580 нм. Абсолютные значения флуоресценции были нормализованы с использованием сигнала флуоресценции необработанных доксорубином сфероидов, который был взят за 100% жизнеспособности.

2.13 Изучение жизнеспособности сфероидов в присутствии диоксида, нагруженного доксорубином

Порошок диоксида был нагружен доксорубином как было описано ранее в разделе 2.8 5 мг диоксида и диоксида, нагруженного доксорубином, были равномерно распределены в 5 мл полной культуральной среды. Затем 50 мкл полученных суспензий добавили к однодневным сфероидам и инкубировали в течение 9 дней. В каждой временной точке (2, 3, 6 и 9 дней) в культуральную среду добавляли 0,02 % раствор резазурина и измеряли сигнал флуоресценции аналогично разделу 2.12.

2.14 Исследование распластывания тканевых сфероидов

Распластывание тканевых сфероидов, сформированных из 8000 клеток, было изучено в коллагеновом гидрогеле, полученном из коллагена I типа, выделенного из крысиных хвостов. Для визуализации мертвых клеток к сфероидам был добавлен реагент CellTox Green в объемном соотношении 1:500. Для этого исследования однодневные сфероиды инкубировали с диопсидом, нагруженным доксорубицином, в течение 3 дней. Затем сфероиды были помещены в коллагеновый гидрогель в 24-луночной планшете. Гидрогель подвергали полимеризации при 37 °C в течение 1 часа, а затем добавляли культуральную среду. Во временные точки 0, 24, 48 и 72 часа были сделаны светлопольные изображения при помощи оптического инвертированного микроскопа.

2.15 Численное моделирование

Численное моделирование методом конечных элементов проводили с помощью пакета численного моделирования COMSOL Multiphysics. Также численное моделирование в соответствии с решением уравнения диффузии осуществляли на языке Python в среде разработки PyCharm.

2.16 Статистический анализ

Статистический анализ и построение графиков было проведено при использовании GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla), результаты отображены как среднее значение со стандартным отклонением. Концентрации, соответствующие IC₅₀, были рассчитаны методом нелинейного регрессионного анализа при помощи четырех параметрической дозо-зависимой модели. Для сравнения количественных характеристик групп был использован тест Манна-Уитни. Статистическая значимость определена на уровне $p < 0,05$.

Анализ экспериментальных данных кинетики высвобождения DOX проводили в Excel при помощи встроенного решателя для нахождения оптимальных значений констант. Эксперименты по сорбции и высвобождению DOX всеми типами разработанных систем были проведены не менее чем в трех повторах, а также повторены в независимых экспериментах, сходимость теоретических и экспериментальных данных оценивалась по значению коэффициента детерминации.

Глава 3. Исследование микроструктуры и свойств разработанных биомедицинских материалов

В данной диссертационной работе предложен комплекс биомедицинских материалов, включающий в себя как материалы в их исходном после получения состоянии (порошки биоактивной керамики, гидрогелевые материалы), так и полимер-матричные композиционные материалы, и гибридные конструкции для восстановления костей. Разработанные материалы являются представителями трех классов материалов: биоактивные (биокерамика), биоинертные (пористые материалы на основе СВМПЭ) и биорезорбируемые (гидрогель). Для установления зависимостей между характеристиками материала и параметрами сорбции и высвобождения доксорубина были изучены микроструктура и свойства материалов различных составов.

3.1 Изучение микроструктуры, фазового состава и свойств частиц биокерамики

Различие способности предлагаемых носителей адсорбировать и высвобождать лекарственные средства во многом может зависеть от морфологии частиц и химии поверхности. На Рисунке 14 представлены СЭМ изображения частиц силикатной биокерамики, демонстрирующие различие структурных характеристик силикатной керамики: волластонита, форстерита и диопсида

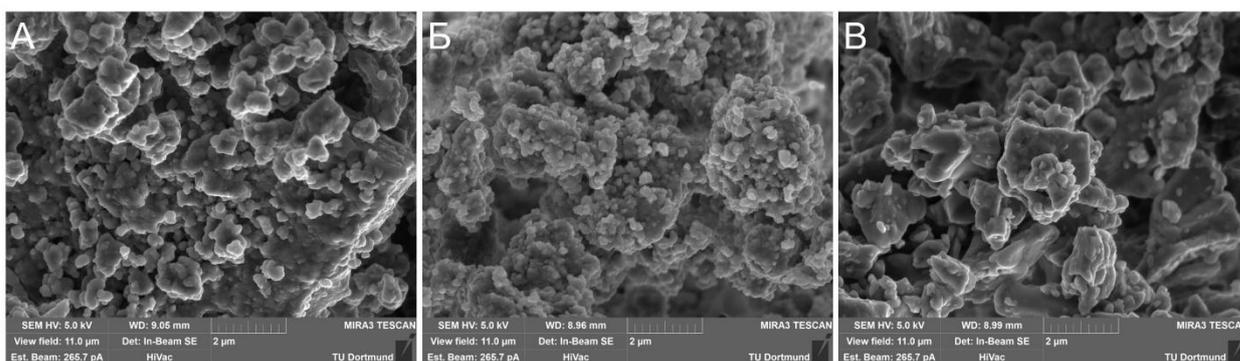


Рисунок 14 – СЭМ изображения частиц волластонита (А), форстерита (Б) и диопсида (В)

Как видно из представленных СЭМ изображений частицы, полученные золь-гель методом горения, имеют схожую морфологию и субмикронный размер частиц, которые имеют тенденцию к агрегированию.

Диопсид, полученный золь-гель методом горения с механоактивацией был охарактеризован методами РФА, ИК-Фурье спектроскопии, СПЭМ и оценки дзета-потенциала (Рисунок 15). Первым этапом в исследовании синтезируемой керамики

является РФА, который проводится до и после кальцинации, а также для подбора режима кальцинации.

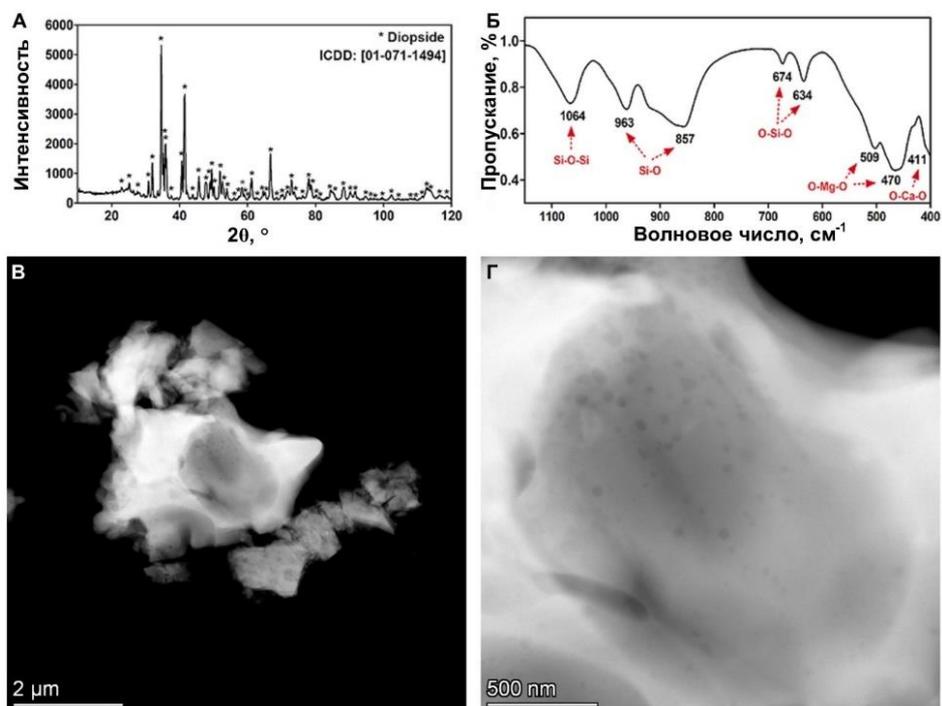


Рисунок 15 – Характеризация диопсида, полученного золь-гель методом горения с механоактивацией: РФА (А), ИК-Фурье спектроскопия (Б), СПЭМ (В, Г)

На Рисунке 16 представлены исследования диопсида, полученного твердофазным методом. Они демонстрируют схожую микроструктуру, однако в данном случае ниже выход продукта в ходе синтеза, в результате смешения не на молекулярном уровне, более вероятно образование нестехиометрических участков богатых кальцием, что приводит к образованию акерманита [148].

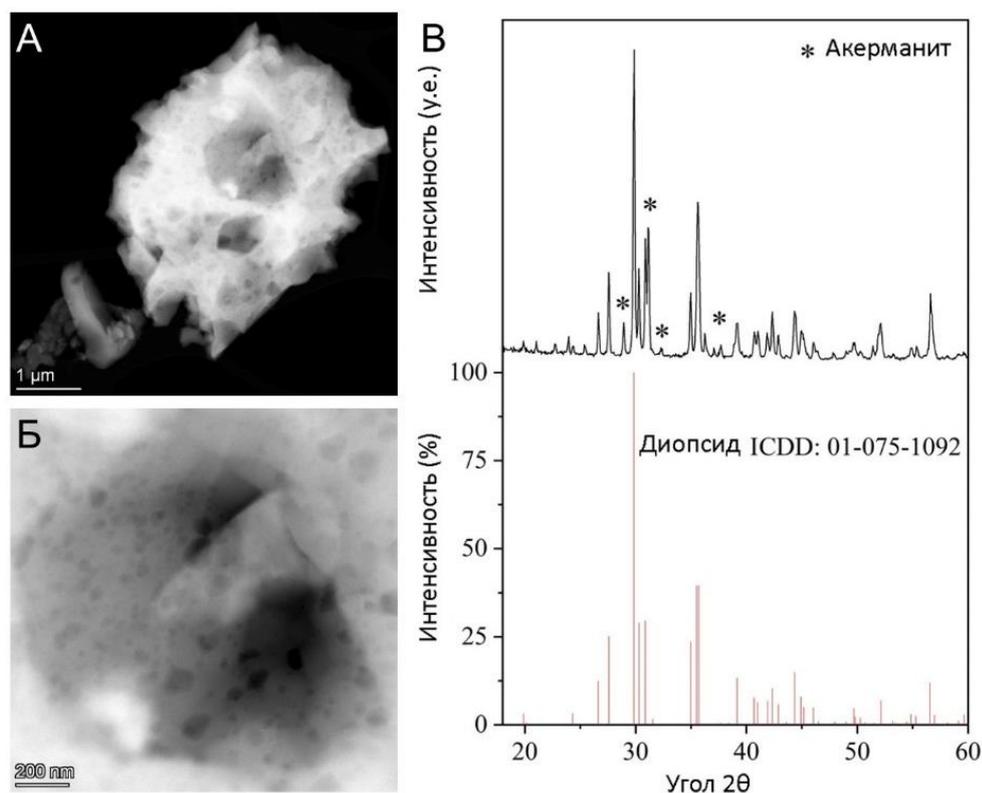


Рисунок 16 – Характеризация диопсида, полученного твердофазным методом: СПЭМ (А, Б), РФА (В)

Также был оценен дзета-потенциал частиц волластонита и диопсида с целью обоснования различия в адсорбции и высвобождении ВМР-2. Результаты приведены в Таблице 2. Согласно результатам адсорбции и высвобождения ВМР-2, нет различия между частицами диопсида, полученными разными методами, однако для дальнейших исследований выбран материал с наибольшей фазовой чистотой и развитой поверхностью.

Таблица 2. Дзета-потенциал волластонита и диопсида в дистиллированной воде и PBS (рН 7,4)

| Материал | Дзета-потенциал, mV | |
|-------------|-----------------------|-------|
| | Дистиллированная вода | PBS |
| Волластонит | -9.7 | -8.9 |
| Диопсид | -17.7 | -14.3 |

Оценка дзета-потенциала дает информацию о стабильности систем частиц, распределенных в жидкостях. Если значения меньше ± 30 мВ наблюдаются агрегирование и седиментация. Широко известна зависимость дзета потенциала от рН среды, ранее при синтезе это значение поддерживали на уровне 1,7, что соответствует изоэлектрической

точке диоксида, в таких условиях дзета потенциал равен 0 мВ. Значение дзета потенциала играет большую роль в адсорбции. Было выявлено, что частицы диоксида адсорбируют BMP-2 и DOX, а лизостафин напротив не адсорбируют. Природа этих явлений объясняется значениями дзета потенциалов, как показано в Таблице 2 диоксид имеет отрицательный дзета потенциал. Тогда как BMP-2 катионный белок, а лизостафин – анионный белок. DOX также положительно заряжен. Следовательно, неспособность диоксида адсорбировать лизостафин происходит из-за электростатического отталкивания.

3.2 Изучение микроструктуры и свойств материалов на основе СВМПЭ

Микроструктура пористых материалов на основе СВМПЭ играет важную роль при разработке материалов для костных имплантатов, поскольку размер пор и пористость должны быть оптимальны для дальнейшего прорастания костной ткани и сосудов, что в свою очередь говорит о биомиметичности этих материалов и соответствии их структуры структуре нативной трабекулярной кости. Для обоснования возможности использовать разработанные пористые материалы на основе СВМПЭ в качестве структурной поддержки в области имплантации, материалы были исследованы методами СЭМ/ЭДС и ИК-Фурье спектроскопии. Также были изучены их механические свойства на сжатие и оценена объемная пористость. Помимо этого, сравнивали материалы на основе СВМПЭ с разной молекулярной массой, от этого зависит выбор условий термопрессования и как следствие появление дефектов сплавления СВМПЭ и окисление поверхности.

Микроструктура пористых образцов на основе СВМПЭ марки GUR представлена на Рисунке 17. Как видно из микрофотографий в результате термопрессования происходит полная консолидация материала и формирование пор сферической геометрии в соответствии с формой используемого порообразующего агента. На изображениях отсутствуют дефекты сплавления СВМПЭ, которые бы проявлялись на границах раздела частиц СВМПЭ.

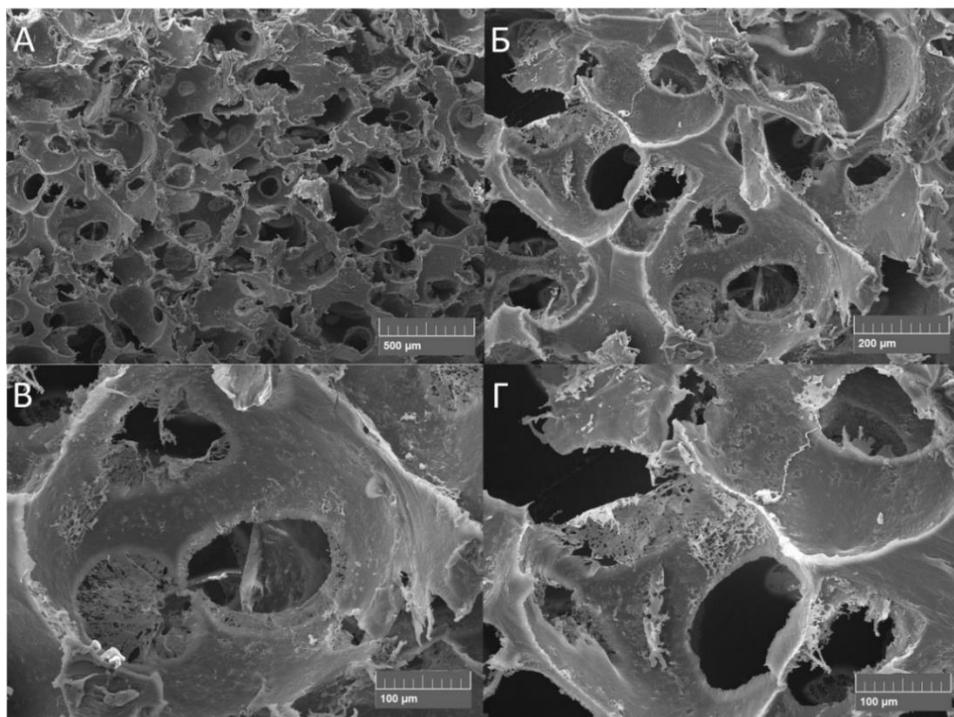


Рисунок 17 – СЭМ микрофотографии пористых материалов на основе СВМПЭ (GUR)

Аналогичное исследование микроструктуры было проведено для композиционного материала на основе СВМПЭ (GUR) при добавлении 20 % масс. диоксида. На Рисунке 18 представлены СЭМ микрофотографии пористого композиционного материала СВМПЭ(GUR)/Диоксид.

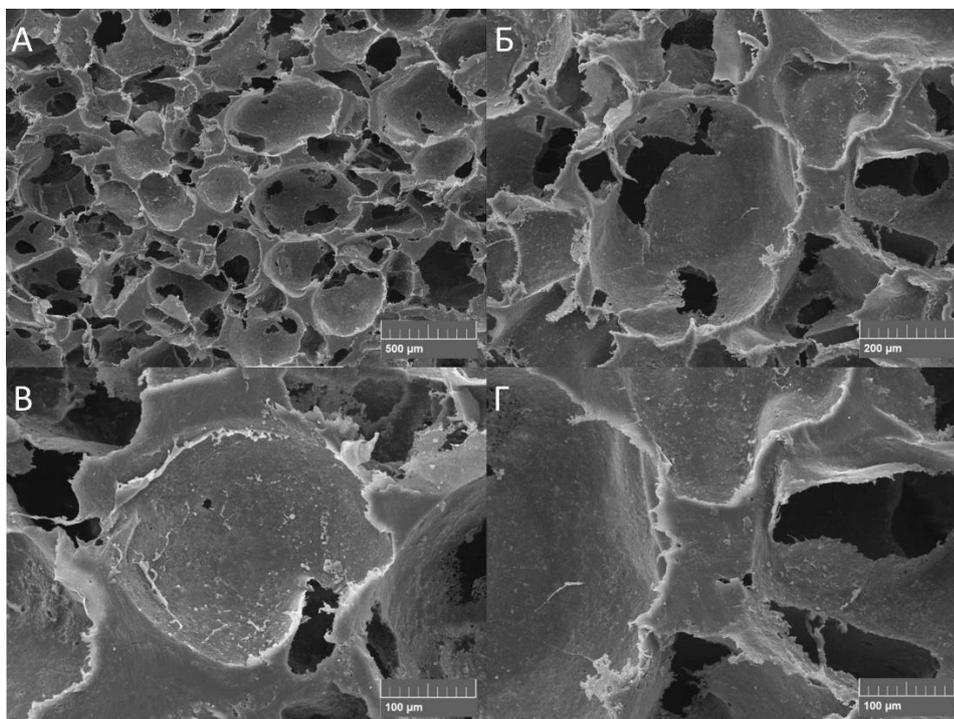


Рисунок 18 – СЭМ микрофотографии пористых материалов на основе СВМПЭ(GUR)/Диоксид

Методом гидростатического взвешивания была оценена объемная пористость полученных пористых материалов. Согласно проведенному исследованию при использовании в качестве среды изопропилового спирта получили, что объемная пористость составляет 79 %, что при содержании порообразующего агента – сферических частиц NaCl со средним размером 300 мкм 90 % масс., хорошо согласуется с предложенной ранее моделью перколяции в системе СВМПЭ/соль.

Равномерность распределения диопсида обеспечивается механоактивацией, когда частицы диопсида распределяются по поверхности частиц СВМПЭ, а затем сохраняют свое положение при термопрессовании. Это подтверждается результатами энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

На Рисунках 19, 20 обобщены результаты исследований пористых материалов на основе СВМПЭ и СВМПЭ/Диопсид. В результате сделан вывод, что использование порообразующего агента одного размера и количества приводит к формированию пор схожей морфологии, размер пор в обоих материалах составил 260 ± 120 мкм.

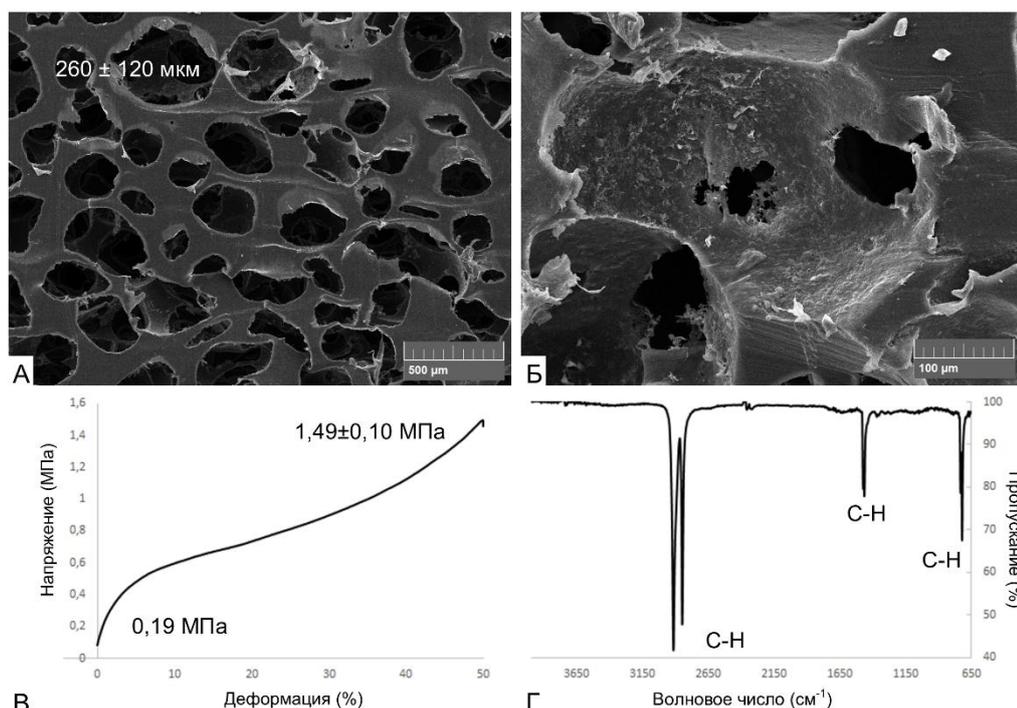


Рисунок 19 – Характеризация пористого СВМПЭ: СЭМ (А, Б), механические испытания на сжатие (В), ИК-Фурье спектроскопия (Г)

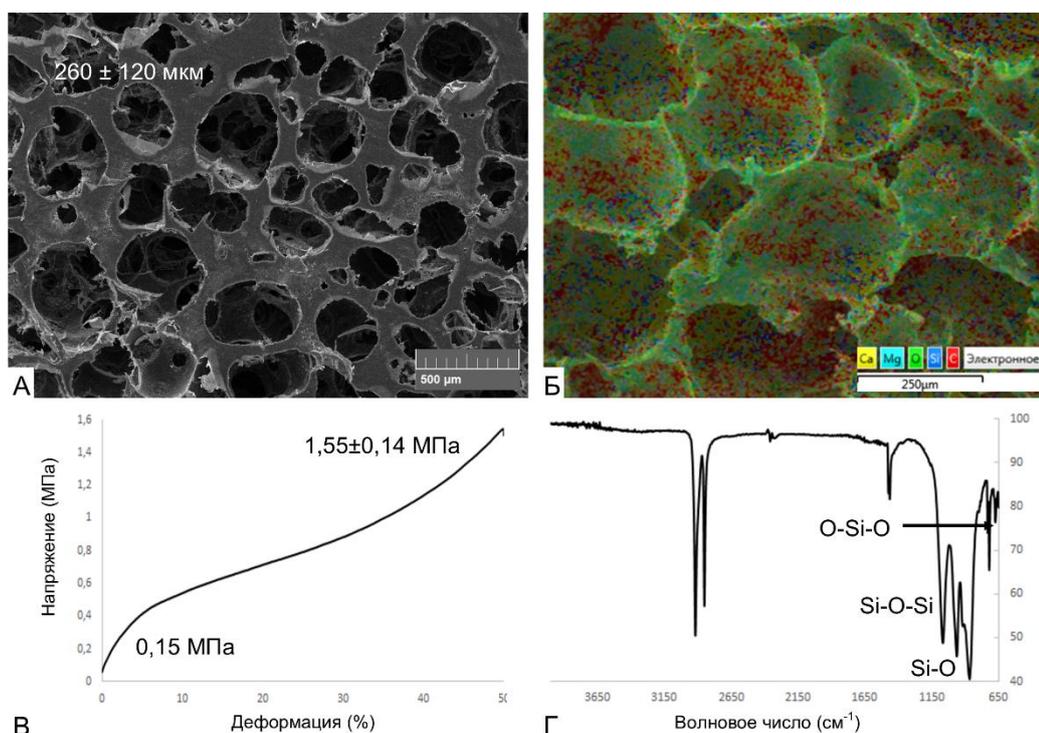


Рисунок 20 – Характеризация пористого СВМПЭ/диоксид: СЭМ (А), ЭДС (Б), механические испытания на сжатие (В), ИК-Фурье спектроскопия (Г)

Полимерные материалы были исследованы методом ИК-Фурье спектроскопии с помощью метода нарушенного полного внутреннего отражения в диапазоне $650-4000 \text{ см}^{-1}$. ИК-Фурье спектры СВМПЭ и СВМПЭ/Диоксид представлены на Рисунках 19Г и 20Г соответственно. В результате наблюдали, что спектр пористого СВМПЭ содержит исключительно функциональные группы углеводов. ИК-спектры СВМПЭ характеризуются дуплетом симметричных и асимметричных валентных колебаний C-H (2915 см^{-1} и 2848 см^{-1}), деформационных колебаний C-H (1472 см^{-1} и 1462 см^{-1}), и полосами кристалличности (730 см^{-1} и 719 см^{-1}). Однако при добавлении диоксида также появляются дополнительные пики, присущие диоксиду. Диоксид характеризуется ножничным колебанием O-Si-O на 671 см^{-1} , симметричными валентными колебаниями Si-O на 866 и 962 см^{-1} и симметричным валентным колебанием группы Si-O-Si на 1070 см^{-1} .

Также по ИК-спектрам можно оценить индекс окисления материала, окисление материала может происходить как при имплантации, так и при получении материала, его травлении и стерилизации. В Таблице 3 приведен расчет индекса окисления СВМПЭ после получения, травления хромосерной кислотой и стерилизации оксидом этилена [139].

Таблица 3. Индекс окисления образцов СВМПЭ

| Образец | Индекс окисления |
|---|------------------|
| Порошок СВМПЭ | 0 |
| Термопрессование | 0 |
| Термопрессование + травление хромосерной кислотой | 1 |
| Термопрессование + стерилизация (EtO) | 0,04 |

Согласно механическим испытаниям на сжатие, проведенных на образцах с размерами 5*5*10 мм, что соответствует стандарту ASTM D695-15, механические свойства материалов при добавлении диоксида значительно не изменились, прочность на сжатие составила $1,49 \pm 0,10$ МПа и $1,55 \pm 0,15$ МПа для пористого СВМПЭ и СВМПЭ/Диоксид соответственно.

3.3 Изучение микроструктуры и свойств гидрогелей

Гидрогели будучи объемной сеткой, заполненной водой, при лиофилизации способны формировать губчатые объекты. Однако это присуще не для всех составов гидрогелей. Хотя считается, что любой гидрогель набухает, этот процесс может быть затруднен и также зависит от состава и поглощаемой жидкости.

На Рисунке 21 приведены СЭМ микрофотографии лиофильно высушенных гидрогелей на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, сшитых хлоридом кальция.

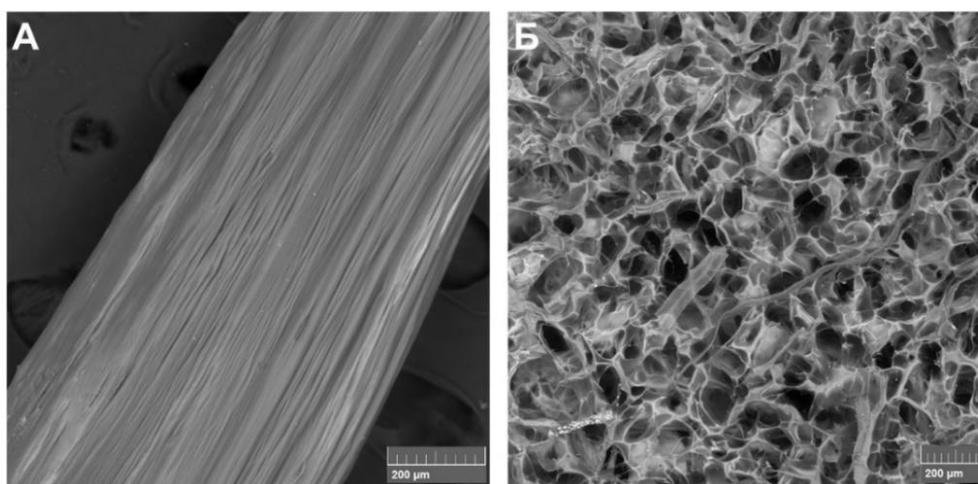


Рисунок 21 – СЭМ изображения гидрогеля на основе альгината натрия (А) и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Б)

Полученные гидрогели на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы были исследованы методом ИК-Фурье спектроскопии (Рисунок 22), и в соответствии с представлениями о гидрогелях они характеризуются массивным пиком гидроксильной группы в области $2750-3750\text{ см}^{-1}$, помимо этого им присущи стандартные группы полисахаридов симметричное и асимметричное валентное колебание COO- , а также C-O-C . Стерилизация гидрогелевых материалов один из важнейших этапов при изготовлении биомедицинских изделий, она возможна путем стерилизации компонентов и последующим формированием гидрогеля в стерильных условиях или стерилизации гидрогелевого изделия после получения. Последнее было опробовано с помощью электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов [147]. При этом показано, что при использовании излучения 100 кГр исчезают пики в области до 1500 см^{-1} , что говорит о разрушении материала, которое также подтверждалось визуальным осмотром.

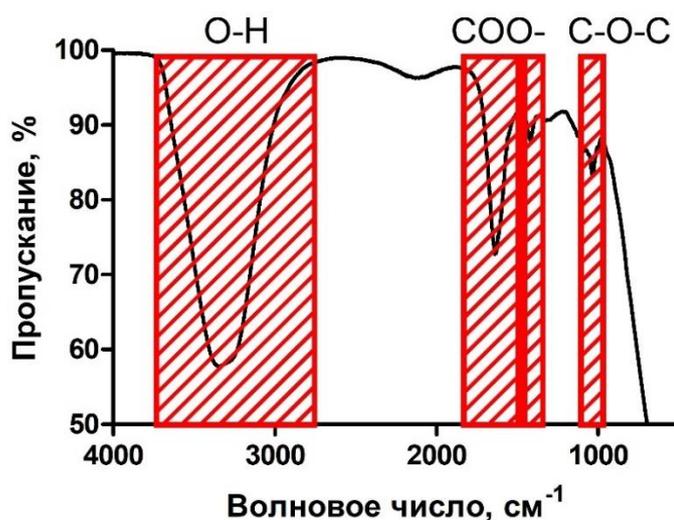


Рисунок 22 – ИК-Фурье спектрография гидрогеля на основе Na-Alg и Na-CMC

3.3.1 Набухание гидрогелевых материалов

Набухание является неотъемлемым свойством гидрогелей и важно как с точки зрения изучения процессов высвобождения лекарственных средств, что может проявляться в изменении механизма высвобождения с диффузионного на набухание, так и при формировании имплантируемых изделий и гибридных конструкций.

В ходе работы было исследовано набухание высушенных гидрогелей на основе альгината натрия двух молекулярных масс. В результате повышения молекулярной массы происходит сильное переплетение полимерных цепочек, что препятствует набуханию, и

требует снижения концентрации. Также было изучено влияние концентрации на pH растворов. При этом наблюдался разный характер изменения pH, 6 % масс./об. растворы альгината натрия разбавляли и измеряли pH, таким образом pH раствора на основе альгината натрия большей молекулярной массы (Русхим, 1144 кДа) изменился с 7,7 до 7, а с меньшей (Sigma-Aldrich, 100 кДа) с 5 до 6. На Рисунке 23 приведены кривые кинетики набухания гидрогелей системы Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂ (образцы 1AlgXCMC содержат 1 % масс./об. Na-Alg и X % масс./об. Na-CMC) в воде и PBS.

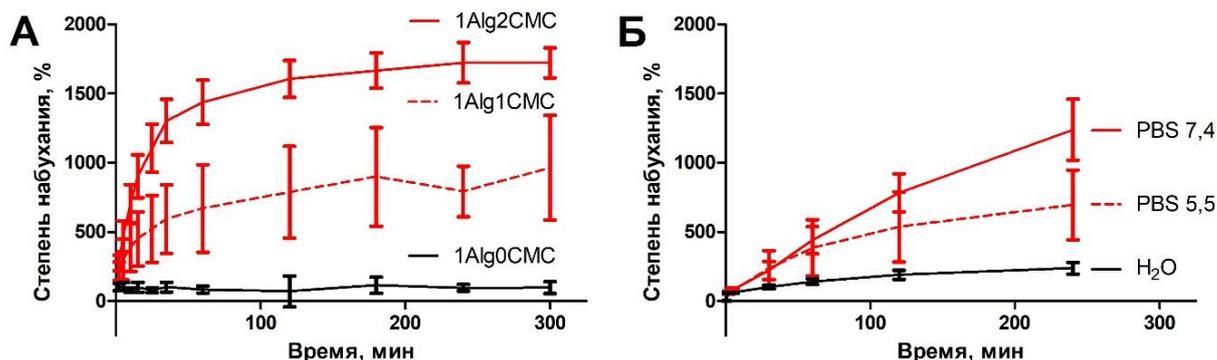


Рисунок 23 – Зависимость степени набухания от состава гидрогеля и среды: набухание гидрогелей разного состава в воде (А), набухание гидрогелей состава 1Alg05CMC в разных средах (Б)

Продемонстрировано, что разработанный гидрогель набухает лучше в PBS чем в дистиллированной воде, однако в PBS с pH 5,5 гидрогель набухает значительно хуже, что вызвано стремлением альгината натрия сворачиваться в клубки в кислой среде и переходить в альгиновую кислоту.

3.4 Выводы по Главе 3

Таким образом, для исследования сорбции и кинетики высвобождения доксорубина предложены 3 принципиально разных по природе, структуре и свойствам носителя лекарственных средств для восстановления костных дефектов.

Установлена взаимосвязь между структурой и составом частиц биоактивной керамики и адсорбцией и кинетикой высвобождения BMP-2 и DOX, что позволило разработать биокерамический материал, способствующий росту костной ткани на примере имплантации порошка диоксида, нагруженного BMP-2, в составе суспензии в гиалуроновой кислоте (ГК), введенной в диски из деминерализованного костного матрикса (ДКМ) в модель краниального дефекта критического размера у мышей (Рисунок 24) [145], а также успешному подавлению метастатического потенциала опухолевых

клеток при нагрузке DOX. Те же связи позволили разработать гибридные конструкции с улучшенными сорбционными характеристиками и профилем кумулятивного высвобождения. Эти положения будут рассмотрены подробнее в следующих главах.

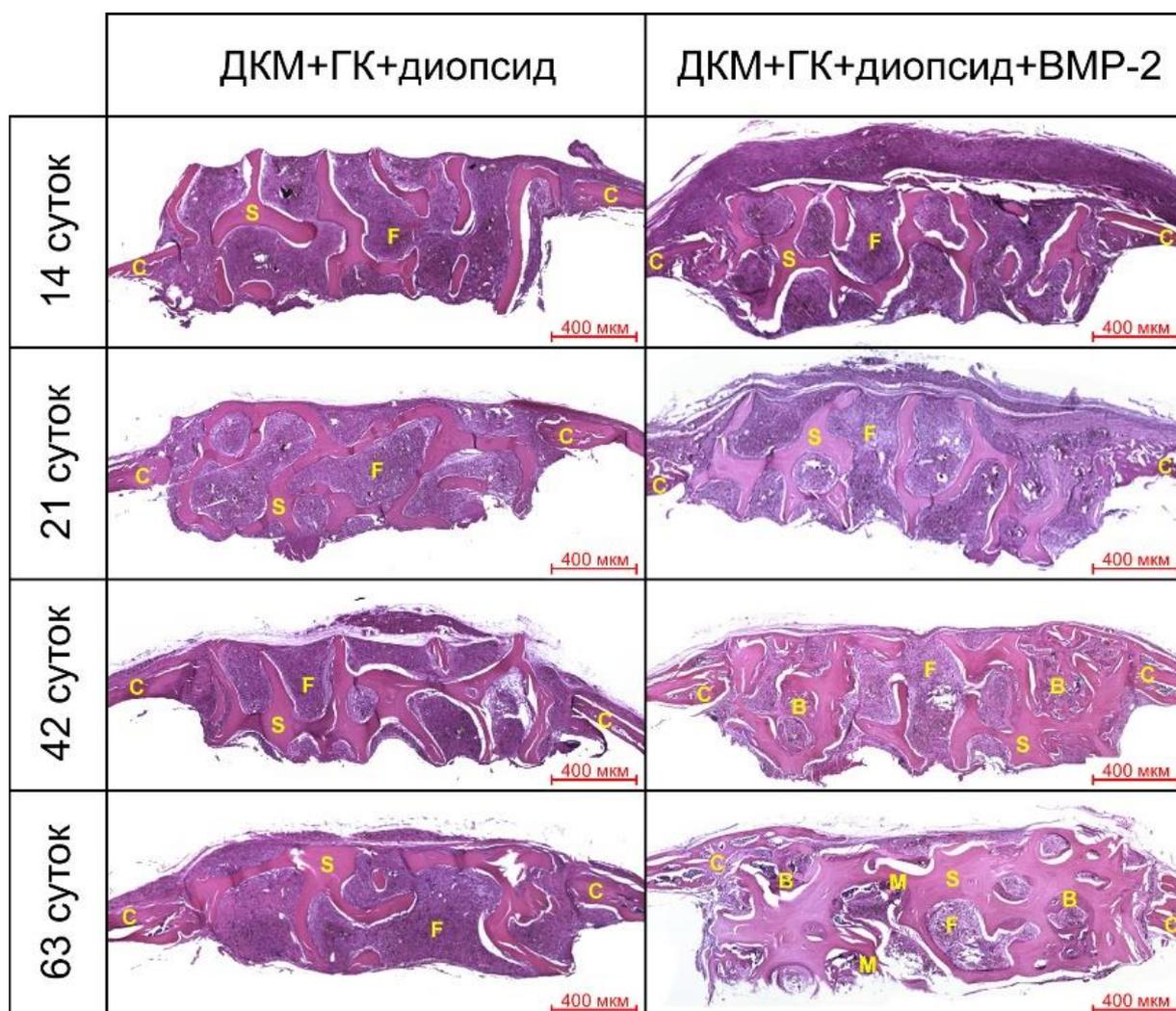


Рисунок 24 – Результаты гистологического анализа на сроках 12, 21, 42, 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков ДКМ с диопсидом и ГК с/без добавления рекомбинантного ВМР-2 (3,5 мкг/имплантат). С – кость черепа, В – новообразованная костная ткань, М – костный мозг, F – фиброзная ткань, S – каркас (скаффолд)

Глава 4. Изучение сорбции и кинетики высвобождения лекарственных средств из компонентов гибридной конструкции

Изучение сорбции и кинетики высвобождения является ключевым исследованием в рамках разработки новых носителей лекарственных средств. Имплантируемые изделия должны быть биосовместимы, а лекарственное средство должно соответствовать предлагаемому применению. Изучены сорбция и высвобождение DOX из всех типов материалов, рассмотренных в Главе 3. Также рассмотрены результаты адсорбции и высвобождения BMP-2 – костного морфогенетического белка 2, исследования проведены сотрудниками НИЦЭМ Гамалеи в рамках РНФ № 22-15-00216. В рамках данного проекта проводится проверка возможности использования разрабатываемых материалов, как самостоятельно, так и в качестве компонентов гибридной конструкции, для восстановления костных дефектов в серии *in vivo* экспериментов на краниальных дефектах и сегментарной модели бедренной кости мыши.

4.1 Изучение частиц биокерамики как потенциального носителя лекарств

Сотрудниками НИЦЭМ Гамалеи под руководством Карягиной-Жулиной А.С. была изучена способность к адсорбции и высвобождению BMP-2 разработанными силикатными керамиками. Тогда как волластонит, форстерит и диопсид продемонстрировали связывание с белком, только диопсид показал возможность его высвобождения. Схожее исследование было проведено на другом белке – ферменте, разрушающем пептидогликаны, лизостафине [149]. 1 мг синтезированных частиц диопсида адсорбировал 150 мкг BMP-2 и лишь 5,2 мкг лизостафина.

Аналогичное исследование было проведено для сравнения частиц диопсида, полученных тремя методами, методики синтеза приведены в разделе 2.3.1. Разницы между ними обнаружено не было, что говорит об отсутствии влияния незначительной разницы в морфологии и размере частиц, а также фазовом составе. Поэтому для дальнейших исследований выбран диопсид, полученный золь-гель методом горения с механоактивацией, обладающий наилучшей фазовой чистотой и развитой поверхностью. В результате оценки дзета-потенциала было продемонстрировано, что заряд влияет на адсорбцию. Поскольку диопсид является отрицательно заряженным он эффективно адсорбирует BMP-2, но не способен к связыванию лизостафина, это объясняется тем, что лизостафин также отрицательно заряжен и электростатически отталкивается от носителя. Следовательно, для изучения сорбции и кинетики высвобождения разработанными

компонентами гибридной конструкции необходимо выбрать лекарственный препарат с положительным зарядом.

4.1.1 Выбор модельного лекарственного препарата

Модельный лекарственный препарат был выбран, основываясь на измерении флуоресценции. С целью исследования компонентов костных имплантатов был выбран доксорубин – цитотоксический антрациклиновый антибиотик, применяющийся в терапии злокачественных опухолей, в том числе остеосаркомы.

С помощью мультимодального микропланшетного ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, USA) определены длины волн испускания и возбуждения, для DOX они составили 590 и 470 нм соответственно. Концентрационная кривая строится путем измерения флуоресценции при разбавлении изучаемого раствора в 2 раза. Таким образом получается зависимость флуоресценции от концентрации, за уравнение, связывающее эти два параметра берется уравнение линии тренда линейной области. На Рисунке 25 приведена концентрационная кривая доксорубина.

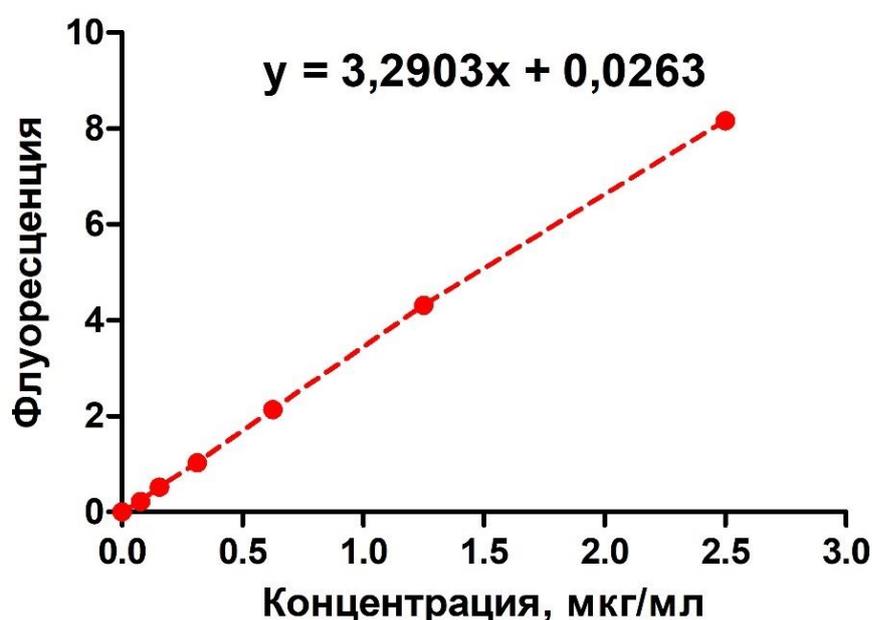


Рисунок 25 – Концентрационная кривая DOX

В дальнейших исследованиях концентрационная кривая будет использована для определения концентраций доксорубина, не связавшегося с носителем и вышедшем при изучении кинетики высвобождения. Согласно этой кривой разбавлению подлежат все растворы, концентрация которых превышает 2,5 мкг/мл, что соответствует сигналу флуоресценции 8.

4.1.2 Оценка содержания и эффективности инкапсуляции доксорубина диопсидом

Навески диопсида массой 5 мг были залиты 100 мкл раствора DOX с концентрацией 2 мг/мл и перемешаны с помощью вортекса в течение 10 с в микроцентрифужной пробирке объемом 2 мл, после чего инкубировались в течение 24 часов при комнатной температуре. После этого пробирки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Для удаления несвязанного DOX образцы были трижды промыты PBS до равенства сигнала флуоресценции с фоновым. Несвязанный DOX, в промывках и супернатанте, был использован для оценки содержания лекарства (DLC, drug loading content) и эффективности инкапсуляции (EE, encapsulation efficiency) (4.1, 4.2).

$$DLC = \frac{\text{масса добавленного DOX} - \text{масса несвязанного DOX}}{\text{масса носителя}} \quad (4.1)$$

$$EE = \frac{\text{масса добавленного DOX} - \text{масса несвязанного DOX}}{\text{масса добавленного DOX}} * 100\% \quad (4.2)$$

В результате проведения независимых экспериментов были оценены эти параметры, для диопсида, полученного золь-гель методом горения с механоактивацией, они составили 3,3 % и 83,5 % соответственно.

В результате выдержки диопсида в растворе доксорубина отмечено изменение цвета порошка с белого на розовый (Рисунок 26А). Спектры абсорбции и флуоресценции образцов диопсида, нагруженных DOX, подтвердили присутствие DOX (Рисунок 26Б, В). Это также было подтверждено ИК-Фурье спектроскопией. На спектре нагруженного препаратом диопсида наблюдаются пики, соответствующие валентному колебанию =C–O–CH₃ при 1215 см⁻¹, деформационному колебанию C–OH при 1288 см⁻¹, валентным колебаниям C=C при 1410, 1585, и 1614 см⁻¹ и валентному колебанию C=O при 1728 см⁻¹, которые являются характеристическими пиками доксорубина.

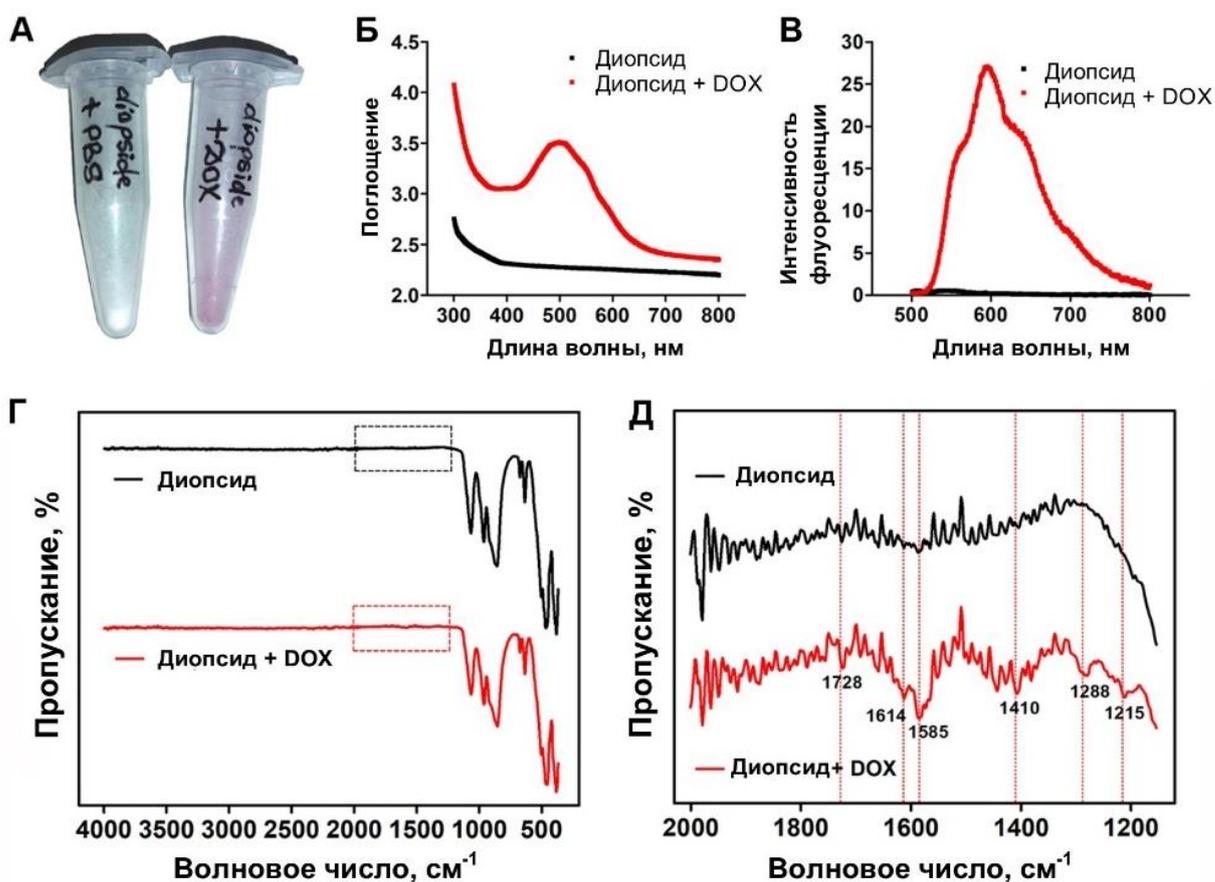


Рисунок 26 – Характеризация частиц диопсида после нагрузки DOX. А – фотография, образцов без и с DOX; Б, В – спектры абсорбции и флуоресценции образцов диопсида и диопсид с DOX; Г, Д – ИК-Фурье спектры диопсида и диопсида, нагруженного DOX

4.1.3 *In vitro* исследования на сфероидах из клеток HF и MG-63

Активность DOX была протестирована на сфероидах из клеток MG-63 как модели опухолевой и HF как модели здоровой тканей. В течение 6 дней изучалась кинетика роста сфероидов. Через 24 часа для обоих типов клеток наблюдалось формирование сфероидов шарообразной формы с четкими границами и равномерным размером в одном диапазоне концентраций. К 6 дню инкубации диаметр сфероидов из клеток MG-63 возрастал, тогда как диаметр сфероидов из клеток HF уменьшался (Рисунок 27А). Предел диффузии питательных веществ, кислорода и малых соединений в неваккуляризованных тканях составляет 200 мкм. Следовательно, оптимальный диаметр тканевых сфероидов не должен превышать 300-400 мкм, на основе этого для всех исследований выбраны однодневные сфероиды.

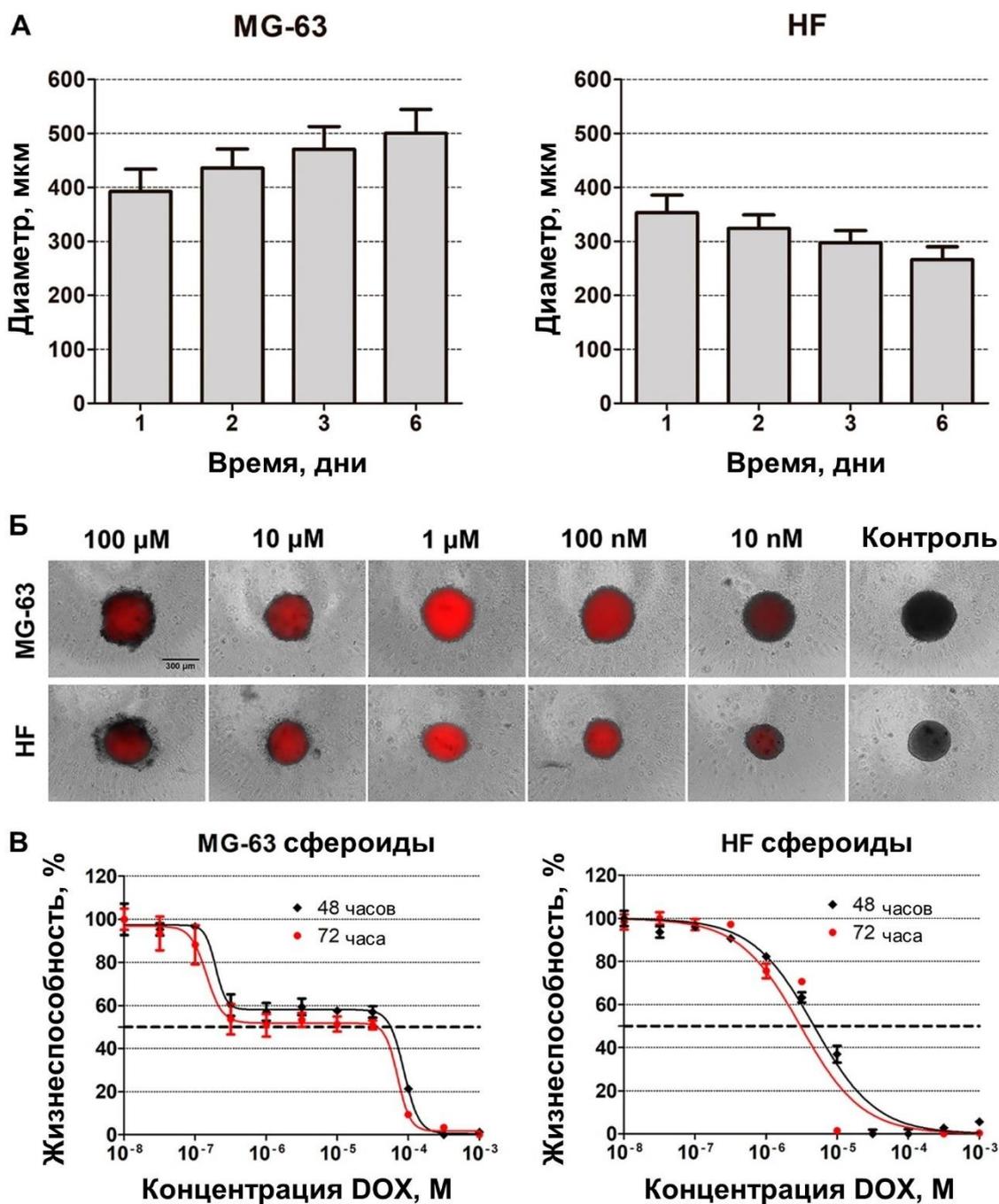


Рисунок 27 – Жизнеспособность сфероидов при обработке доксорубицином в течение 72 часов. А – кинетика роста сфероидов из клеток MG-63 и HF. Б – объединенное фазово-контрастное и флуоресцентное изображения сфероидов из клеток MG-63 (верхний ряд) и HF (нижний ряд), подвергнутых воздействию разных концентраций доксорубицина. В – Зависимость жизнеспособности сфероидов от концентрации доксорубицина.

К двум типам сфероидов добавили разные концентрации доксорубицина и инкубировали в течение 48 и 72 часов (Рисунок 27Б, В). Жизнеспособность сфероидов оценивалась с помощью резазуринового теста, основанного на восстановлении живыми клетками синего нефлуоресцентного красителя резазурина до розового флуоресцентного резорурфина.

Для сфероидов, сформированных из клеток MG-63, наблюдалась двухфазная дозозависимая кривая с плато 300 нМ – 30 мкМ. После 48 часов плато соответствовало 58 % жизнеспособности, а после 72 часов – 52 %. Действие доксорубицина на сфероиды из HF клеток описывается монофазной кривой. IC50 для 48 и 72 часов составляет $4,7 \pm 0,8$ и $3,1 \pm 0,2$ мкМ, соответственно. Таким образом для обоих типов сфероидов наблюдается незначительное увеличение влияния доксорубицина после 72 часов воздействия по сравнению с 48 часами.

Кумулятивное высвобождение DOX из частиц диоксида было исследовано в течение 28 дней. Нагруженный DOX порошок диоксида выдерживали при комнатной температуре в 1 мл PBS (pH 5,5 и 7,4) в течение 28 дней. В каждой временной точке (1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17, 19, 22, 26 и 28 дней), 1 мл супернатанта отбирали и заменяли на 1 мл свежего PBS (pH 5,5 и 7,4). Большая часть DOX (10,1 %) высвободилась в первые две недели и только 2,6 % в следующие две (Рисунок 28А). Помимо кинетики высвобождения изучено влияние DOX, высвобожденного из диоксида, на сфероиды из клеток MG-63 и HF. Результаты представлены на Рисунке 28Б, В. Сфероиды инкубировали с нагруженными DOX частицами диоксида в течение 2, 3, 6 и 9 дней, а затем оценивали их жизнеспособность.

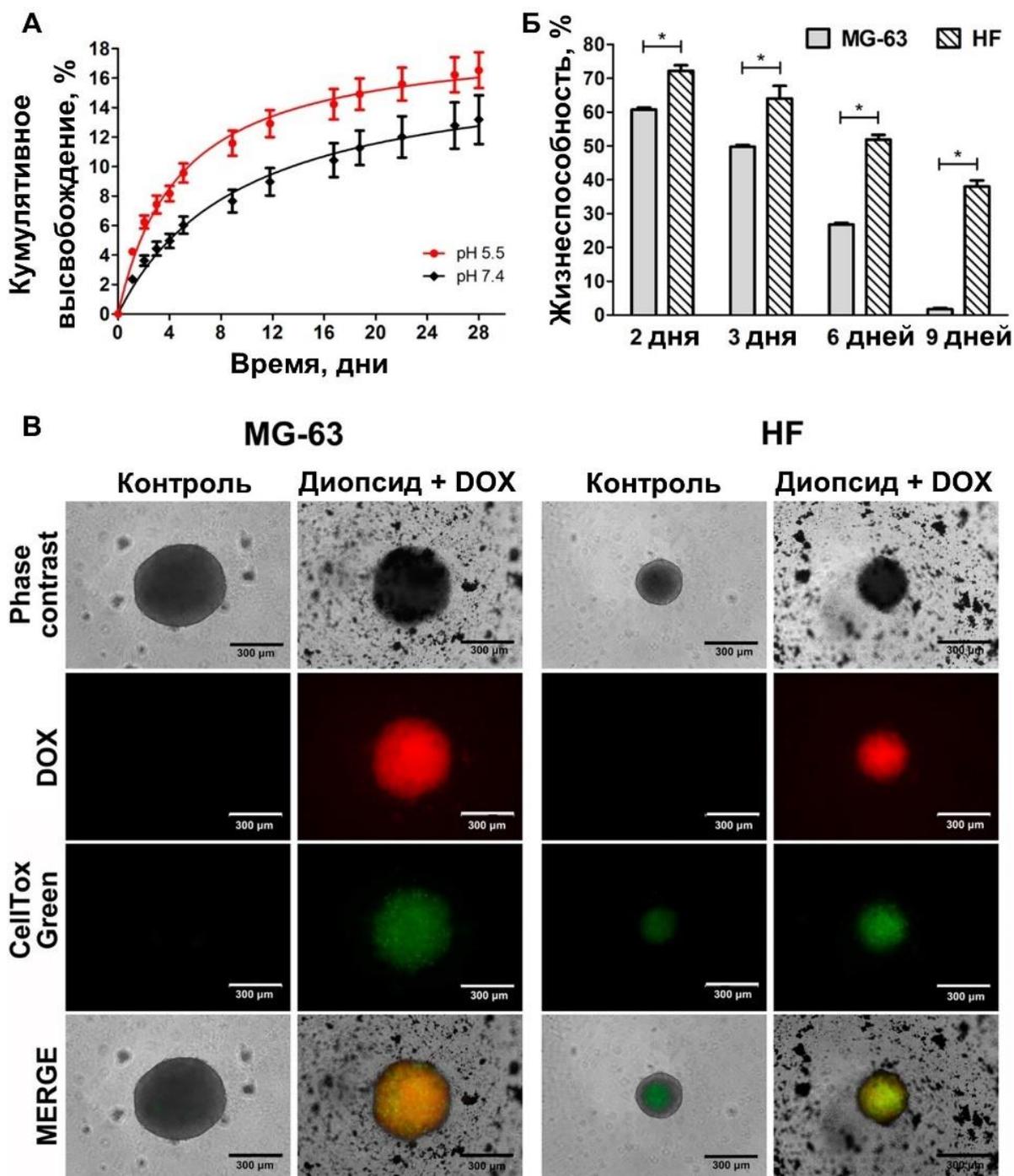


Рисунок 28 – Высвобождение DOX из диопсида. А – кривые кумулятивного высвобождения DOX из диопсида при pH 5,5 и 7,4; В – жизнеспособность сфероидов после инкубации с нагруженным DOX диопсидом в течение 2, 3, 6 и 9 дней; С – фазово-контрастные и флуоресцентные изображения сфероидов из клеток MG-63 и HF в присутствии DOX-содержащего диопсида и без него (Контроль).

Количество DOX-содержащего диопсида было рассчитано на основе зависимости жизнеспособности сфероидов от концентрации доксорубина и результатах высвобождения DOX из диопсида. Для обеспечения максимальной разницы в жизнеспособности между моделями опухолевой и здоровой тканей концентрация DOX должна составлять 300 нМ, но, чтобы гарантировать избирательность эта концентрация

была увеличена до 1 мкМ. Согласно кривой кумулятивного высвобождения через 72 часа из 5 мг диопсида высвобождается 8,35 мкг DOX. Следовательно оптимальное количество диопсида, нагруженного DOX, должно быть уменьшено в 100 раз. Таким образом, каждый сфероид должен инкубироваться с 50 мкг DOX-содержащего диопсида, что обеспечит концентрацию 1 мкМ через 72 часа.

Было обнаружено, что во все временные точки сфероиды, сформированные из фибробластов человека, содержали больше живых клеток, чем сфероиды из опухолевых клеток. После 9 дней было выявлено, что жизнеспособность сфероидов из фибробластов составляет $38,0 \pm 3,6 \%$, тогда как все сфероиды из клеток MG-63 погибли. В качестве контроля была протестирована жизнеспособность сфероидов в присутствии диопсида, не нагруженного DOX, и доказано отсутствие токсического эффекта частиц диопсида на сфероиды.

Флуоресцентная микроскопия подтвердила, что DOX проник внутрь сфероидов (Рисунок 28В). Отсутствие красного цвета в контрольных изображениях свидетельствует об отсутствии автофлуоресценции клеток. В контроле сфероиды из MG-63 состояли из живых клеток, тогда как сфероиды из фибробластов человека содержали 30 % мертвых клеток. Это хорошо согласуется с литературными данными, демонстрирующими очень быстрое снижение жизнеспособности сфероидов из первичных фибробластов в процессе культивирования [150]. При этом высокая жизнеспособность опухолевых сфероидов обусловлена резистентностью опухолевых клеток к гипоксии. В соответствии с полученными результатами сделан вывод о значительной гибели клеток в сфероидах обоих типов при воздействии доксорубицина.

Исследование миграции в 3Д условиях культивирования было проведено в коллагеновом гидрогеле с целью оценки метастатического потенциала клеток линии MG-63. В качестве контроля аналогичное исследование было проведено для фибробластов. Сфероиды из обоих типов клеток инкубировали с нагруженным DOX диопсидом в течение 3 дней и оценивали их распластывание (Рисунок 29). На представленных фотографиях могут быть выделены две области: основная область с плотно упакованными клетками и зона распластывания с мигрирующими клетками. В случае сфероидов из клеточной линии MG-63 обработка доксорубицином привела к потере сфероидами способности к распластыванию. Тогда как для сфероидов из HF лишь изменился паттерн распластывания, с плотной зоны клеток вокруг сфероида к единичным мигрирующим клеткам. На основе проведенных исследований предложен протокол *in vitro* оценки активности противоопухолевых препаратов в 3Д условиях культивирования (Приложение 2).

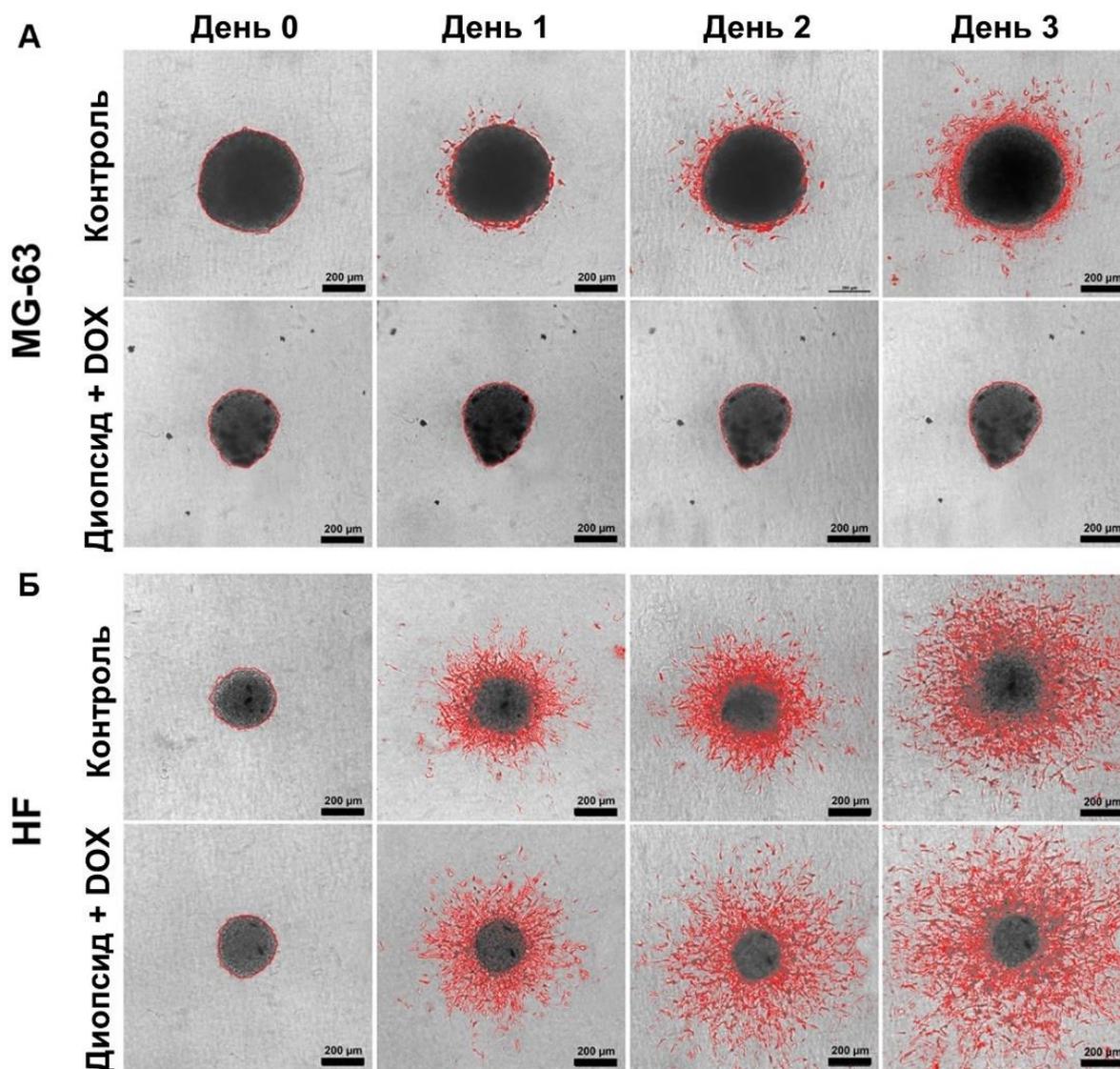


Рисунок 29 – Распластывание сфероидов после обработки DOX, высвободившимся из частиц диопсида. Фазово-контрастные изображения распластывания тканевых сфероидов из клеток MG-63 (А) и HF (Б). Красным цветом обозначена граница мигрирующих клеток или сфероида.

4.2 Исследование влияния условий адсорбции доксорубицина на адсорбционную ёмкость пористых полимерных матриц

Была оценена адсорбционная ёмкость пористых материалов на основе СВМПЭ (GUR) и СВМПЭ(GUR)/Диопсид при различных условиях введения лекарственного препарата. Измерение адсорбции проводилось в триплетах. Образцы пористых материалов со средней массой 3 мг были помещены в пробирки, залиты 50 мкл DOX, погружены в жидкость с использованием вортекса. Образцы 1 группы после этого были выдержаны в пробирке с DOX 1 сутки; 2 группы – отцентрифугированы в течение 2 минут

на скорости 14680 об/мин и выдержаны в пробирке с DOX 1 сутки; 3 группы – отцентрифугированы в течение 2 минут на скорости 14680 об/мин. После выдержки в DOX избыточный раствор был отобран с использованием пипетки для получения количества DOX (в мкг) в супернатанте. После этого 10 мкл супернатанта (надосадочная жидкость, содержащая неадсорбированный DOX) были отобраны из каждой пробирки и разбавлены в 1000 раз до попадания сигнала в диапазон линейной области концентрационной кривой. Также был измерен сигнал флуоресценции PBS и DOX в трех повторах. В Таблице 4 представлены результаты оценки адсорбированного DOX.

Таблица 4 – Влияние условий нагрузки DOX в пористые полимерные матрицы на основе СВМПЭ на эффективность адсорбции

| Образец/условие | DOX адсорбированный, мкг Из 100 мкг добавленных | мкг DOX/мг образца |
|---|--|--------------------|
| СВМПЭ, 24 ч | $30,7 \pm 2,3$ | $9,4 \pm 0,6$ |
| СВМПЭ/20% Диопсид, 24 ч | $82,0 \pm 20$ | $26,5 \pm 3,0$ |
| СВМПЭ, центрифугирование, 24 ч | $47,5 \pm 8,7$ | $14,1 \pm 2,2$ |
| СВМПЭ/20% Диопсид, центрифугирование, 24 ч | $92,6 \pm 9,1$ | $24,8 \pm 2,4$ |
| СВМПЭ, центрифугирование | $33,2 \pm 9,5$ | $10,0 \pm 2,5$ |
| СВМПЭ/20% Диопсид, центрифугирование | $43,9 \pm 3,9$ | $12,9 \pm 0,9$ |

Согласно приведенным данным способ нагрузки DOX в пористую полимерную матрицу на основе СВМПЭ значимо не влияет на адсорбцию, за исключением необходимости проводить инкубацию как минимум в течение 1 суток. Однако диопсид приводит к значительному увеличению эффективности инкапсуляции, что при схожей морфологии говорит о создании гидрофильной поверхности и возникновении связей между диопсидом и молекулами DOX.

4.3 Исследование адсорбции и кинетики высвобождения доксорубина из пористых полимерных матриц

Исследована кинетика высвобождения DOX из 4 типов носителей на основе СВМПЭ, нагрузка проведена методом, продемонстрировавшим большую эффективность согласно разделу 4.2. К пористым образцам добавляли 100 мкл DOX (200 мкг), центрифугировали в течение 2 минут на скорости 14680 об/мин и после выдерживали в

пробирке с DOX 1 сутки. Результаты оценки содержания DOX и эффективности инкапсуляции представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Параметры адсорбции DOX пористыми полимерными матрицами на основе СВМПЭ

| | DLC | ЕЕ, % |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| СВМПЭ (GUR) | $0,77 \pm 0,24$ | $11,5 \pm 1,7$ |
| СВМПЭ (УТЕС) | $0,68 \pm 0,21$ | $11,3 \pm 3,1$ |
| СВМПЭ (GUR)/Диопсид | $3,62 \pm 0,46$ | $58,5 \pm 17,8$ |
| СВМПЭ (УТЕС)/Диопсид | $4,55 \pm 0,37$ | $78,6 \pm 3,2$ |

Высвобождение DOX из пористого СВМПЭ продолжалось в течение 3 дней (Рисунок 30), причем взрывной выход DOX был отмечен в первые сутки, кумулятивное высвобождение составило 54,5 и 60 % для СВМПЭ (GUR) и СВМПЭ (УТЕС) соответственно. Учитывая малое время высвобождения проводить моделирование этого процесса не имеет смысла. Далее были рассмотрены только пористые полимерные матрицы на основе композиционного материала СВМПЭ/Диопсид.

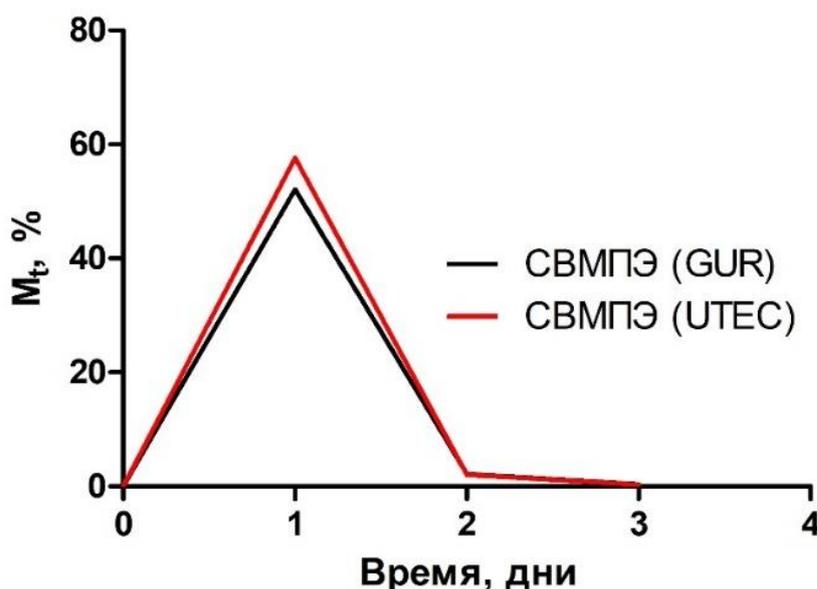


Рисунок 30 – Кривые высвобождения DOX из пористого СВМПЭ

Пористые полимерные матрицы на основе композиционного материала СВМПЭ/Диопсид представляют большой интерес. На Рисунке 31 приведены кривые кумулятивного высвобождения для этих носителей.

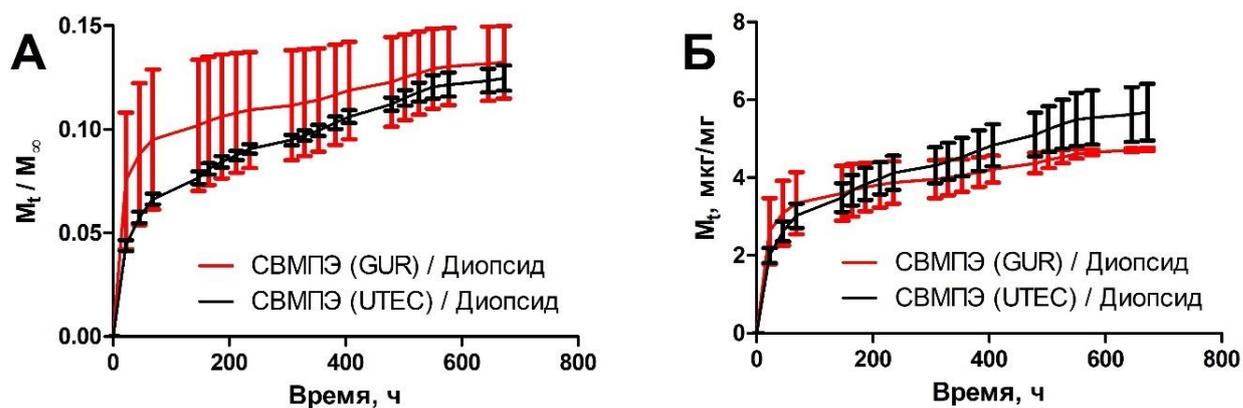


Рисунок 31 – Кумулятивное высвобождение доксорубицина из пористых композиционных материалов состава СВМПЭ/20%Диопсид: в долях от нагруженного количества доксорубицина (А) и в мкг доксорубицина на 1 мг носителя (Б)

Хотя по прошествии 2 недель кумулятивное высвобождение достигает величины лишь 10 % и в пересчете на количество выделенного DOX соответствует значениям для чистого СВМПЭ, в перспективе это может придавать больший регенеративный потенциал имплантатам, а создание гибридной конструкции, возможно, приведет к увеличению нагрузки и ускорению выхода препарата. После 4 недель исследования кумулятивное высвобождение достигает примерно 13%, что превышает предельное высвобождение из матриц на основе СВМПЭ.

Согласно Рисунку 31А оба типа композиционных материалов характеризуются схожим профилем кумулятивного высвобождения, большой разброс экспериментальных данных говорит о том, что исследуемые образцы сильно различаются по размеру и на этапе, когда происходит десорбция из приповерхностного слоя, сильно отличается объем и, следовательно, количество вещества. При пересчете на 1 мг материала оба материала характеризуются одинаковыми значениями высвобождаемого доксорубицина. Также лучшее связывание доксорубицина с пористыми материалами на основе СВМПЭ (УТЕС) /Диопсид может быть вызвано выходом на поверхность большего количества диопсида при создании дополнительной пористости.

4.4 Абсорбция доксорубицина гидрогелем

Все исследования, приведенные в данной Главе, были выполнены на сферических образцах состава 1Alg05СМС. Для исследования кинетики высвобождения DOX из гидрогеля образцы гидрогеля после получения необходимо поместить в дистиллированную воду для удаления свободных ионов (Ca, Na и Cl) на 48 часов, после чего залить раствором DOX.

Образцы шитого гидрогеля одного размера выдерживали в разном количестве раствора DOX, чтобы обеспечить разное количество действующего вещества. Таким образом, изучалась концентрационная зависимость абсорбции. После 3 суток нагрузки неадсорбированный DOX был отобран. Результаты приведены в Таблице 6.

Таблица 6 – Результаты исследования абсорбции доксорубицина гидрогелем состава 1Alg05CMC

| Объем раствора доксорубицина, мкл | Исходное количество доксорубицина, мкг | Абсорбированное гидрогелем количество доксорубицина, мкг | Эффективность инкапсуляции, % |
|-----------------------------------|--|--|-------------------------------|
| 50 | 100 | 94,2 ± 1,8 | 94,2 ± 1,8 |
| 100 | 200 | 185,4 ± 3,4 | 92,7 ± 1,7 |
| 150 | 300 | 280,0 ± 4,5 | 93,3 ± 1,5 |

Согласно полученным данным, в пределах изучаемых концентраций эффективность инкапсуляции остается постоянной, что говорит о возможности нагрузки большего количества DOX в носитель данного типа, а также о равномерности распределения DOX в гидрогеле, что в свою очередь создает системы с различной начальной концентрацией.

Как будет показано в Главе 6 кинетика высвобождения лекарства из гидрогеля может быть описана уравнением, демонстрирующим зависимость кумулятивного высвобождения от радиуса. Формирование сферического гидрогеля предлагается путем добавления в микроцентрифужную пробирку гелеобразующего раствора, а затем раствора сшивающего агента. Однако этот способ хорош для образцов малого радиуса, как например при добавлении по каплям раствора альгината натрия в хлорид кальция образуются практически идеальные шарики, при увеличении объема капли происходит увеличение отклонения от идеальности. Вследствие чего возможно увеличение отклонения от модели.

Для данного эксперимента подготовлены гидрогелевые шарики существенного разного диаметра и пропорционально увеличению объема изменено количество добавляемого DOX. В Таблице 7 приведены данные по размерной зависимости абсорбции.

Таблица 7 – Размерная зависимость эффективности инкапсуляции

| Объем раствора DOX, мкл | Радиус образца, мм | Объем образца, мкл | Исходное количество DOX, мкг | Адсорбированное гидрогелем количество DOX, мкг | ЕЕ, % |
|-------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--|-------|
| 50 | | 50 | 100 | 97,4 | 97,4 |
| 150 | | 150 | 200 | 286,0 | 95,3 |
| 300 | | 300 | 300 | 561,1 | 93,5 |

Согласно полученным данным при поддержании равенства концентрации DOX в образцах гидрогелей эффективность инкапсуляции остается на одном уровне.

4.5 Исследование кинетики высвобождения доксорубицина из гидрогеля

Было исследовано высвобождение DOX из гидрогелей с разным количеством препарата. На Рисунке 32А представлены кривые кумулятивного высвобождения DOX из образцов, на которых изучалась концентрационная зависимость. При исследовании высвобождения отмечается одинаковая скорость высвобождения, замедление высвобождения возникает при истощении источника согласно кривой высвобождения после нагрузки 100 мкг доксорубицина. При нагрузке из раствора с 200 мкг доксорубицина было проведено изучение влияния времени абсорбции (Рисунок 32Б). При увеличении времени выдержки в DOX гидрогелей при нагрузке препаратом в течение 1 и 3 дней произошло увеличение эффективности инкапсуляции на 4%. За 7 недель отмечается практически полное высвобождение препарата, а также различие между эффективностью инкапсуляции и высвобождения при нагрузке гидрогелей доксорубицином в течение 1 и 3 дней.

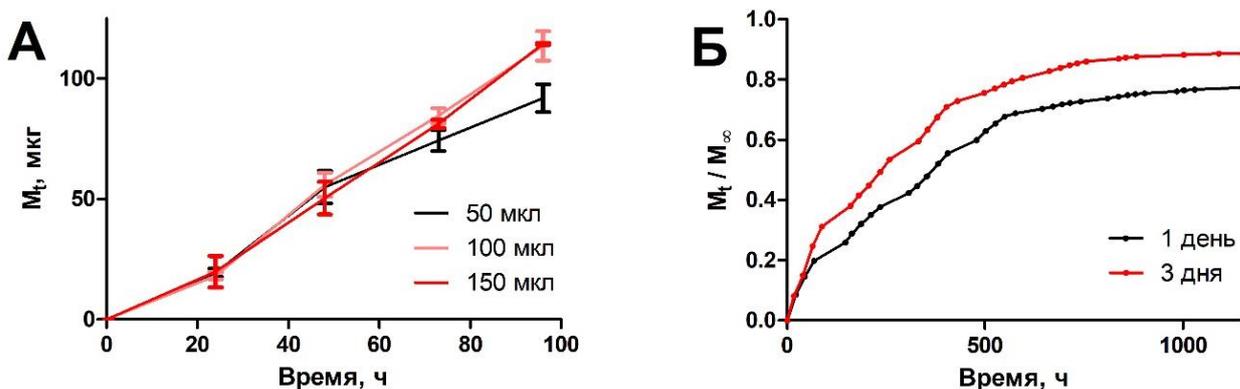


Рисунок 32 – Кривые кумулятивного высвобождения доксорубицина из гидрогелей состава 1Alg05CMC с разным количеством нагруженного DOX (А) и нагруженных DOX в течение разного времени (Б)

Согласно этим кривым, скорость высвобождения одинакова при достаточном количестве препарата. Недостижение 100% связано с протеканием процесса замещения ионов кальция ионами натрия, из-за чего при постоянном замещении PBS происходит фрагментация гидрогеля и удаление фрагментов из области исследования. Таким образом, можно свести эти кривые к 100%.

4.6 Диоксид и диоксид-содержащие материалы как носители лекарственных препаратов

В процессе поиска новых керамических носителей факторов роста были изучены представители силикатной биокерамики – волластонит, диоксид и форстерит. Как было отмечено в подразделе 4.1 диоксид характеризуется хорошей адсорбционной ёмкостью по отношению к ВМР-2 и отдает его значительно лучше других рассматриваемых керамических материалов. В процессе изучения композиционного материала СВМПЭ/Диоксид относительно адсорбции доксорубицина было отмечено увеличение эффективности инкапсуляции в 7 раз по сравнению с пористым СВМПЭ марки УТЕС. Однако, по кумулятивному высвобождению (%) чистый СВМПЭ оказался более эффективным, несмотря на взрывной характер высвобождения, это также подтверждается результатами испытания *in vitro* и *in vivo* по высвобождению ВМР-2. Таким образом показано, что использование пористого СВМПЭ может приводить к мгновенному выходу препарата, тогда как при введении наполнителя возможно замедление этого процесса.

4.7 Выводы по Главе 4

Оценены содержание и эффективность инкапсуляции DOX для трех типов систем. Доказана воспроизводимость полученных результатов, в том числе на частицах диоксида. Таким образом, подтверждая стабильность разработанных систем и возможность их использования для изучения кинетики высвобождения и в качестве носителя DOX.

Согласно результатам изучения концентрационной и размерной зависимости абсорбции DOX гидрогелевыми материалами можно сделать вывод о равномерном распределении DOX в пределах образцов. Также важным результатом, полученным в данной Главе, является признание гидрогелей единственной рассматриваемой системой, обеспечивающей полное высвобождение препарата, а также эффективно инкапсулирующей DOX.

Глава 5. Анализ кинетики высвобождения доксорубицина из компонентов гибридной конструкции

Наиболее распространенными и применимыми к гидрогелям моделями высвобождения являются модели нулевого и первого порядка, модель Хигучи и модель Пеппаса (Таблица 8). Последняя помимо константы скорости процесса позволяет определить механизм высвобождения препарата из рассматриваемой системы. Далее будет приведен анализ кривых кумулятивного высвобождения DOX из всех разработанных компонентов на предмет соответствия этим моделям, учитывая применимость моделей Пеппаса и Хигучи до значений кумулятивного высвобождения 60 %.

Таблица 8 – Математические модели кинетики высвобождения

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| Нулевой порядок | $\frac{M_t}{M_\infty} = kt$ | $[k_0] = c^{-1}$ |
| Первый порядок | $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_1 t}$ | $[k_1] = c^{-1}$ |
| Хигучи | $\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{0.5}$ | $[k_H] = c^{-0.5}$ |
| Пеппас | $\frac{M_t}{M_\infty} = k_P t^n$ | $[k_P] = c^{-n}$ |

5.1 Кинетика высвобождения доксорубицина из диопсида

Экспериментальные и смоделированные кривые для диопсида, нагруженного DOX, инкубированного при pH 7,4 и 5,5 представлены на Рисунках 33 и 34 соответственно.

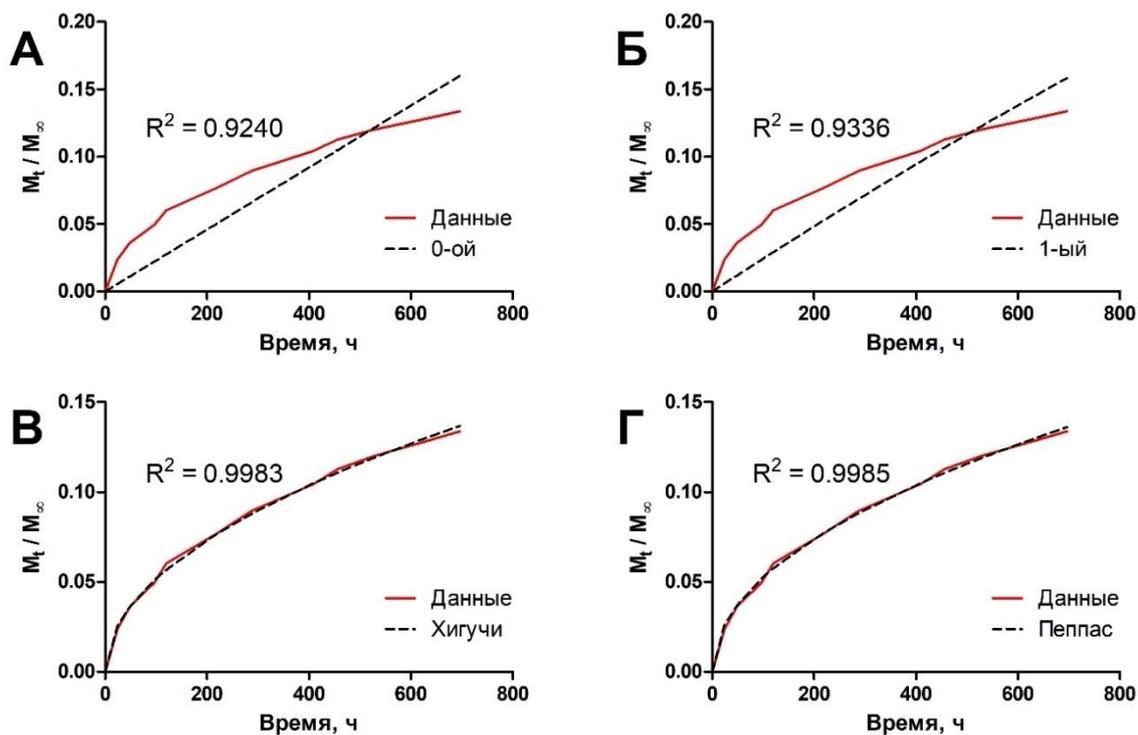


Рисунок 33 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения DOX из частиц диопсида при pH 7,4: модель нулевого порядка (А), модель первого порядка (Б), модель Хигучи (В), модель Пеппаса (Г)

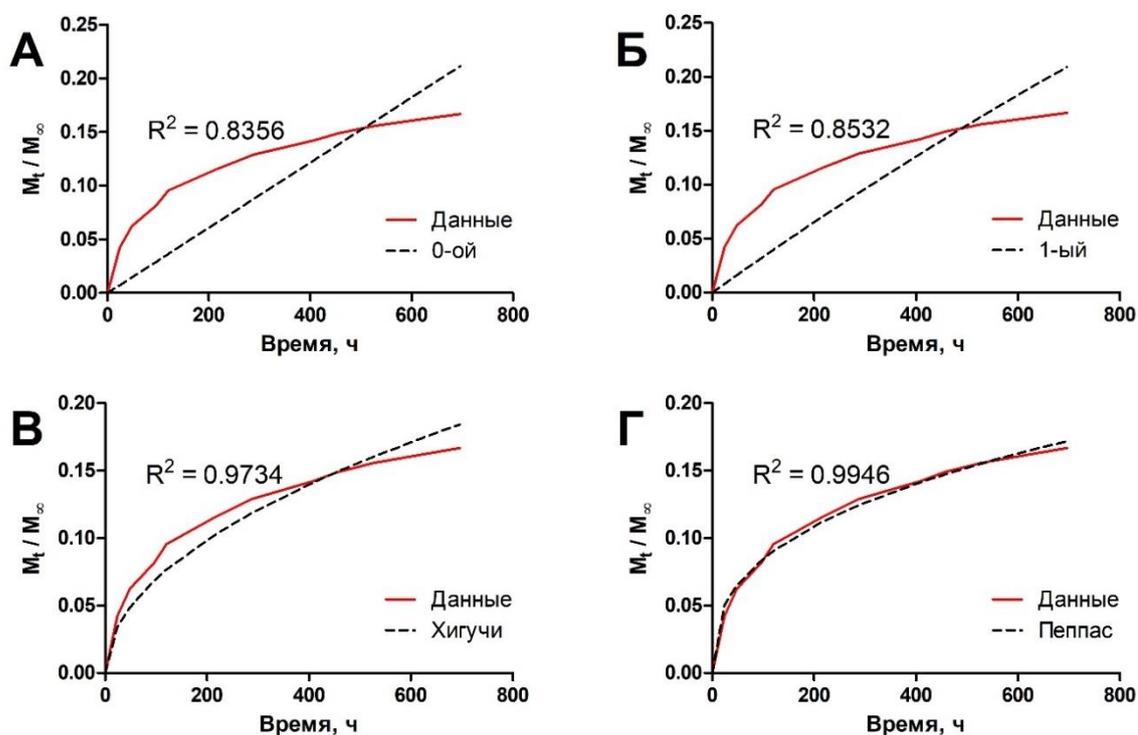


Рисунок 34 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения DOX из частиц диопсида при pH 5,5: модель нулевого порядка (А), модель первого порядка (Б), модель Хигучи (В), модель Пеппаса (Г)

Оцененные статистическим анализом константы приведены в Таблице 9.

Таблица 9 – Результаты моделирования кинетики высвобождения доксорубина из диопсида

| Система / Модель | | Диопсид, pH 7.4 | Диопсид, pH 5.5 |
|---------------------|--------------------------|--|--|
| Модель 0-го порядка | Константы | $k_0 = 6,38 \cdot 10^{-8}$ | $k_0 = 8,44 \cdot 10^{-8}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9240$ | $R^2 = 0,8356$ |
| Модель 1-го порядка | Константы | $k_1 = 6,88 \cdot 10^{-8}$ | $k_1 = 3,37 \cdot 10^{-4}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9336$ | $R^2 = 0,8532$ |
| Модель Хигучи | Константы | $k_H = 8,63 \cdot 10^{-5}$ | $k_H = 1,16 \cdot 10^{-4}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9983$ | $R^2 = 0,9734$ |
| Модель Пеппаса | Константы | $k_p = 1,01 \cdot 10^{-4}$ $n = 0,49$ | $k_p = 7,92 \cdot 10^{-4}$ $n = 0,37$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9985$ | $R^2 = 0,9946$ |

Согласно статистическому анализу кинетики высвобождения DOX из диопсида в PBS с pH 7,4 в равной мере соответствуют как модель Хигучи, так и модель Пеппаса. Это обусловлено близостью экспоненты диффузии к 0,5. Однако при изменении pH среды, модель Хигучи больше не подходит, экспонента диффузии составляет 0,37.

5.1.1 Особенности адсорбции на диопсид

В процессе изучения высвобождения доксорубина из всех компонентов имплантата было отмечено образование осадка при инкубации нагруженного диопсида в PBS. Такое явление, как образование кристаллов доксорубина в PBS, возможно является результатом процесса димеризации доксорубина в нейтральных буферах. Причем повышение температуры ускоряет этот процесс, хотя должно ускорять высвобождение лекарства. Таким образом формирующаяся система имеет вид околосферических частиц, в которые нагружен доксорубин, находящийся сразу в двух состояниях: растворенном и нерастворенном.

Такая система соответствует представлениям о монолитных дисперсиях. Это системы, в которых вещество, начальная концентрация которого превышает растворимость вещества, равномерно распределено в матрице. При контакте с жидкостью вода проникает в систему и частично растворяет вещество. Таким образом растворенное и нерастворенное вещество одновременно существуют в этой системе, а для диффузии доступно только растворенное. Зависимость кумулятивного высвобождения от времени для таких систем сферической геометрии описывается следующим уравнением (5.1):

$$\frac{M_t}{M_\infty} - \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right] = - \frac{3D}{R^2} \frac{C_s}{C_{ini}} t, \quad (5.1)$$

где M_t и M_∞ – кумулятивное количество препарата, высвобожденное за время t и ∞ соответственно;

D – коэффициент диффузии препарата в системе;

C_s – растворимость препарата в смоченной матрице, а не в среде;

C_{ini} – начальная концентрация препарата в системе;

R – радиус сферической системы.

Используя данную модель, можно оценить растворимость доксорубина в смоченном диопсиде. Для этого был оценен коэффициент диффузии доксорубина в PBS по уравнению Стокса-Эйнштейна.

$$D_{DOX}(PBS) = \frac{kT}{6\pi\eta r_{DOX}} \quad (5.2)$$

где k – постоянная Больцмана, $1,38 * 10^{-23}$ Дж/К;

T – абсолютная температура, К;

η – вязкость PBS;

r_{DOX} – радиус DOX.

Согласно литературным данным, вязкость PBS 0,01022 пз, а молекулярная масса – 579,98 г/моль [151]. За гидродинамический радиус приняли эффективный радиус молекулы доксорубина, согласно литературным данным эта величина в 5 раз больше эффективного радиуса молекулы воды, что составляет 0,69 нм [152]. Следовательно коэффициент диффузии DOX в PBS при температуре 25 °С составил $3*10^{-8}$ см²/с.

Для проведения моделирования была построена зависимость кумулятивного высвобождения DOX из частиц диопсида при pH 7,4 от времени (Рисунок 35А). Приняв за единую константу все константы справа, уравнение было решено относительно $\frac{M_t}{M_\infty}$. Найдём значение этой новой константы, приняв, что смоделированное время высвобождения должно быть равно экспериментальному. В итоге получена константа $K = 4,36*10^{-10}$ с⁻¹. Зная средний размер агрегатов $6,7 \pm 5,3$ мкм, примем радиус равным 0,000335 см. Аналогично была построена кривая кумулятивного высвобождения для образца, из которого высвобождение изучалось при pH 5,5.

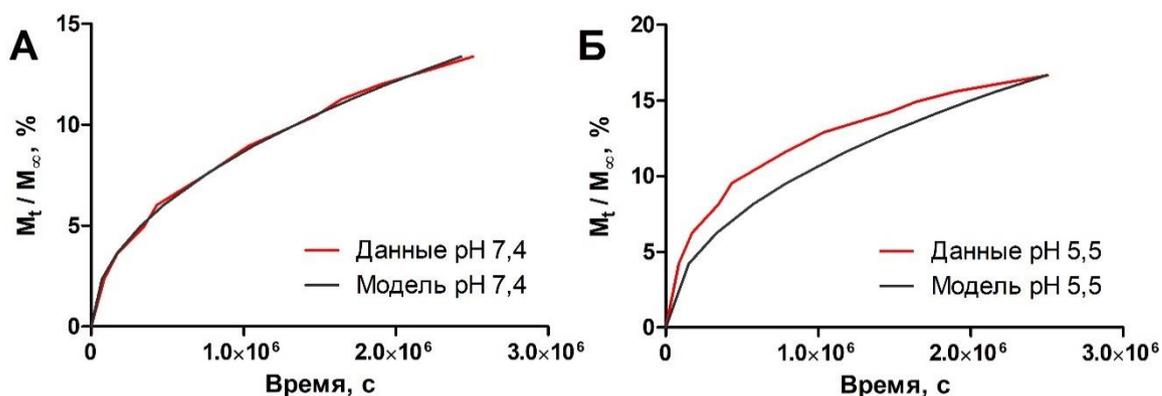


Рисунок 35 – Моделирование диопсида как монолитной дисперсии в зависимости от изменения pH среды: pH 7,4 (А), pH 5,5 (Б)

При начальной концентрации раствора DOX 2 мг/мл искомая растворимость DOX в смоченном матриксе составила 3,2 пг/мл. При понижении pH до 5,5 растворимость DOX в диопсиде увеличилась в полтора раза, что связано с увеличением растворимости DOX в кислой среде. Следовательно, при понижении pH происходит отклонение от модели Хигучи за счет увеличения скорости растворения DOX.

В результате была оценена растворимость доксорубицина в смоченном PBS диопсиде, которая при изменении pH среды с 7,4 до 5,5 увеличилась с 3,2 до 4,9 пг/мл.

5.2 Кинетика высвобождения доксорубицина из пористых полимерных матриц

Аналогично пункту 5.1 проведено моделирование кинетики высвобождения DOX для пористых полимерных систем на основе СВМПЭ. На Рисунках 36 и 37 представлены экспериментальные и смоделированные кривые для пористых композиционных материалов, наполненных диопсидом, на основе СВМПЭ двух марок.

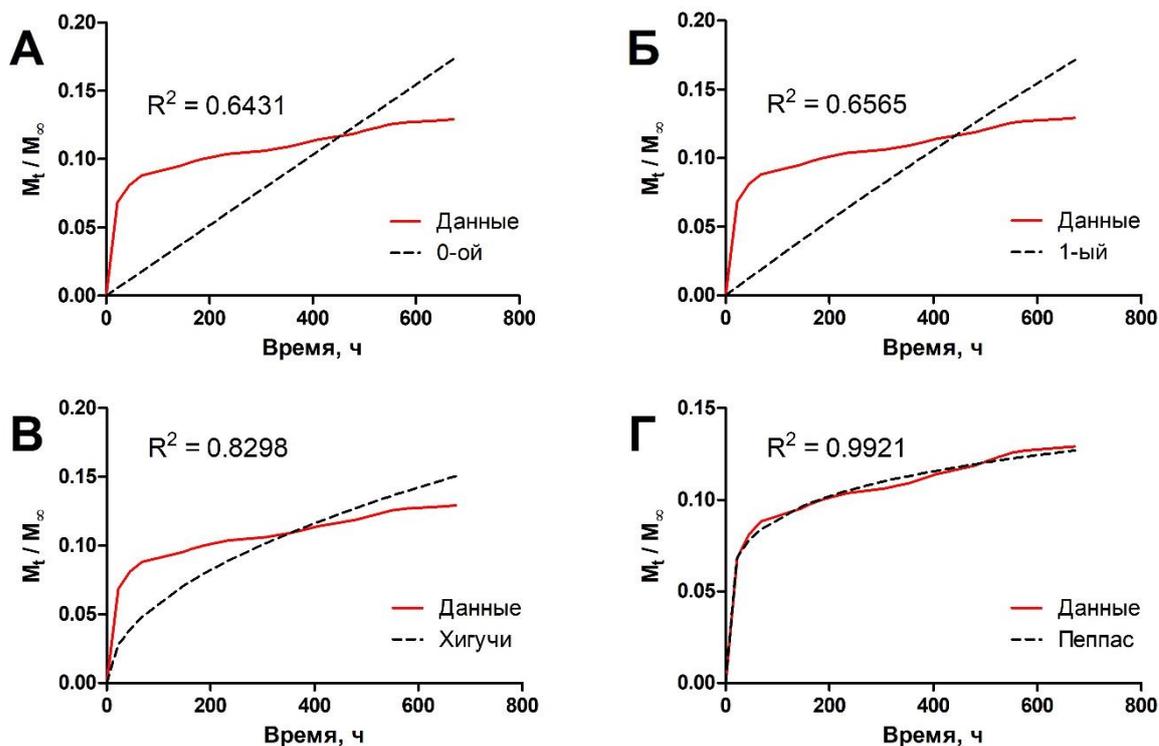


Рисунок 36 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения DOX из СВМПЭ(GUR)/Диопсид: модель нулевого порядка (А), модель первого порядка (Б), модель Хигучи (В), модель Пеппаса (Г)

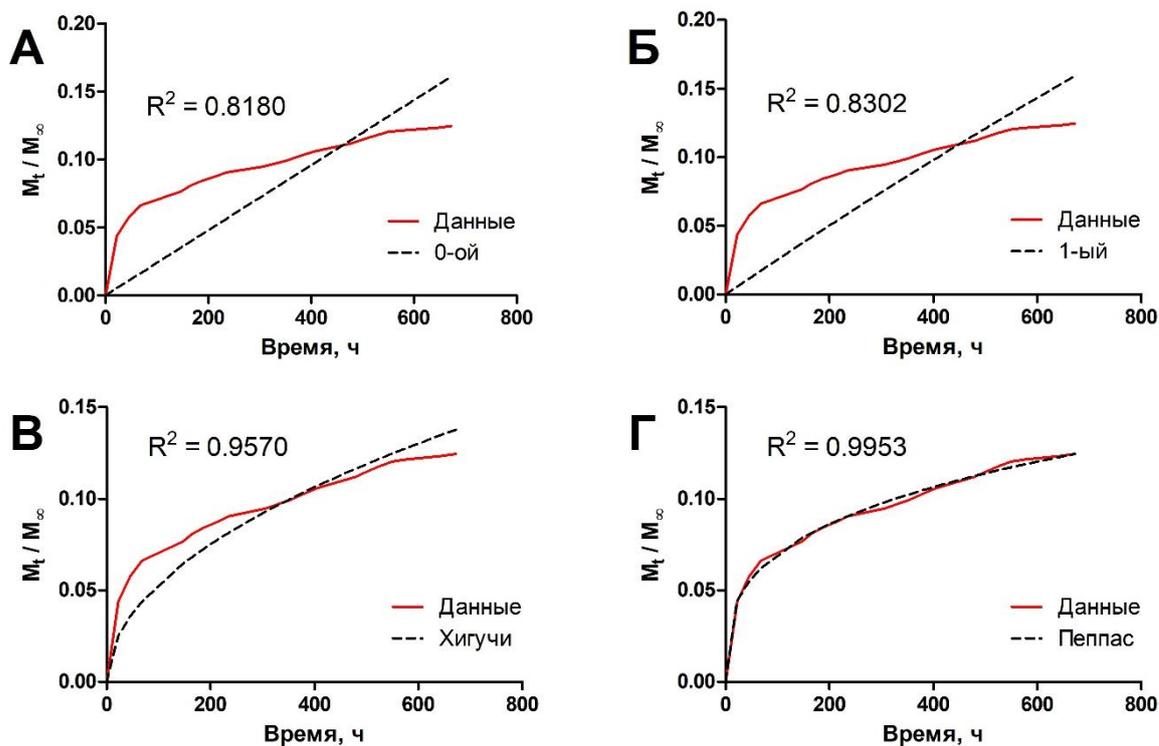


Рисунок 37 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения DOX из СВМПЭ(УТЕС)/Диопсид: модель нулевого порядка (А), модель первого порядка (Б), модель Хигучи (В), модель Пеппаса (Г)

В Таблице 10 представлены результаты оценки кинетических констант и коэффициентов детерминации для пористых матриц на основе СВМПЭ, наполненных диопсидом. Согласно рассчитанным коэффициентам детерминации для пористого композиционного материала СВМПЭ/Диопсид наилучшее соответствие продемонстрировала модель Пеппаса, при этом значение экспоненты диффузии значительно отклоняется от 0,5.

Таблица 10 – Результаты моделирования кинетики высвобождения доксорубина из пористых полимерных матриц диопсид-содержащих композиционных материалов на основе СВМПЭ

| Система / Модель | | СВМПЭ (GUR) / 20 % Диопсид | СВМПЭ (UTEC) / 20 % Диопсид |
|---------------------|--------------------------|--|--|
| Модель 0-го порядка | Константы | $k_0 = 7,15 \cdot 10^{-8}$ | $k_0 = 6,65 \cdot 10^{-8}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,6431$ | $R^2 = 0,8180$ |
| Модель 1-го порядка | Константы | $k_1 = 7,76 \cdot 10^{-8}$ | $k_1 = 7,15 \cdot 10^{-8}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,6565$ | $R^2 = 0,8302$ |
| Модель Хигучи | Константы | $k_H = 9,68 \cdot 10^{-5}$ | $k_H = 8,85 \cdot 10^{-5}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,8298$ | $R^2 = 0,9570$ |
| Модель Пеппаса | Константы | $k_p = 8,85 \cdot 10^{-3}$ $n = 0,18$ | $k_p = 1,43 \cdot 10^{-3}$ $n = 0,30$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9921$ | $R^2 = 0,9953$ |

Согласно проведенному статистическому анализу, кинетика высвобождения из пористых полимерных матриц подчиняется модели Пеппаса, механизм высвобождения – диффузионный.

5.3 Кинетика высвобождения доксорубина из гидрогеля

В отличие от рассмотренных ранее систем кинетика высвобождения из гидрогелей контролируется тремя процессами: диффузия, набухание и эрозия. Тогда как деградация за время полного высвобождения для альгинатных систем не является существенным фактором, стоит отметить, что при реализации эксперимента требуется замена рабочего раствора, в том числе с целью поддержания постоянства объема, это приводит к фрагментации образца в связи с разрывом сшивок. Набуханием тоже можно пренебречь, поскольку при изучении кинетики высвобождения система находится в относительно равновесном состоянии по сравнению с высушенным гелем, когда происходит интенсивное поглощение PBS и как следствие разрушение гидрогеля. Следовательно

изучаемая система приводится к равновесному состоянию, когда преобладающим механизмом высвобождения является диффузия. Это доказано проведением моделирования кинетических кривых высвобождения DOX. На Рисунке 38 представлены экспериментальные и смоделированные кривые для образцов гидрогелей состава 1Alg05СМС, нагруженных DOX из раствора в течение 1 дня.

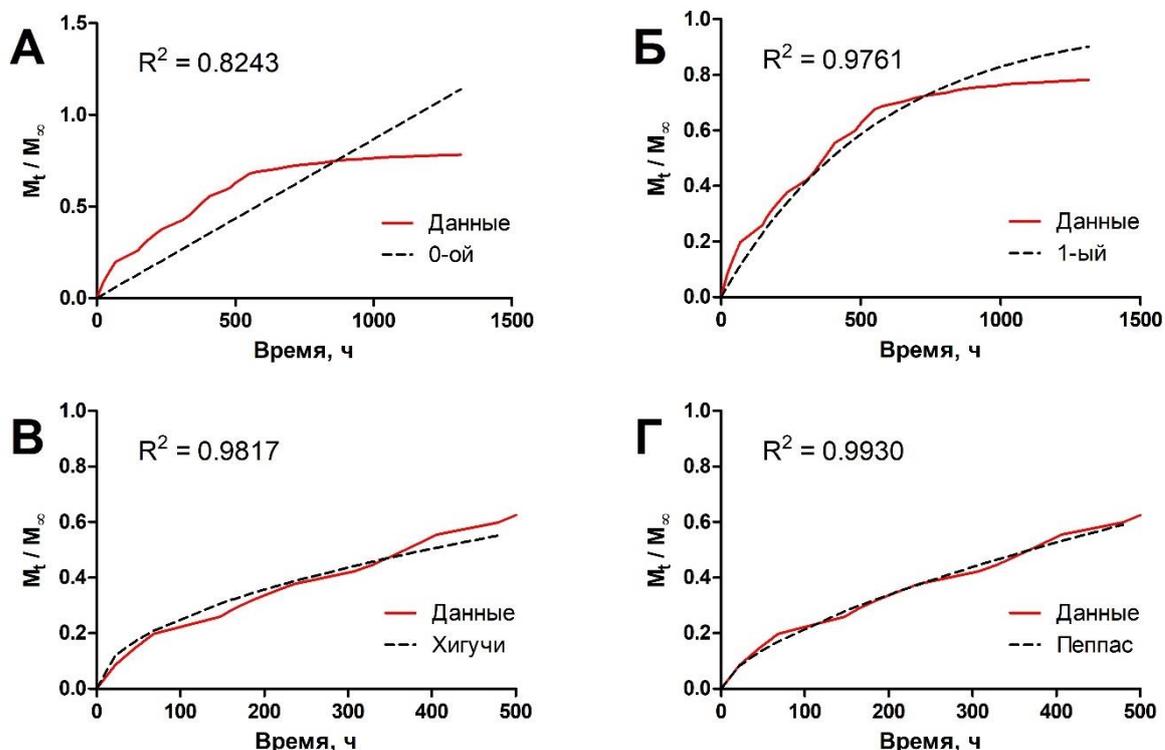


Рисунок 38 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения DOX из гидрогеля при нагрузке DOX в течение 1 дня: модель нулевого порядка (А), модель первого порядка (Б), модель Хигучи (В), модель Пеппаса (Г)

Кинетика высвобождения из гидрогеля при нагрузке 200 мкг DOX при времени выдержки 3 дня продемонстрирована на Рисунке 39, а в Таблице 11 значения определенных констант и коэффициента детерминации для обоих рассматриваемых времен нагрузке.

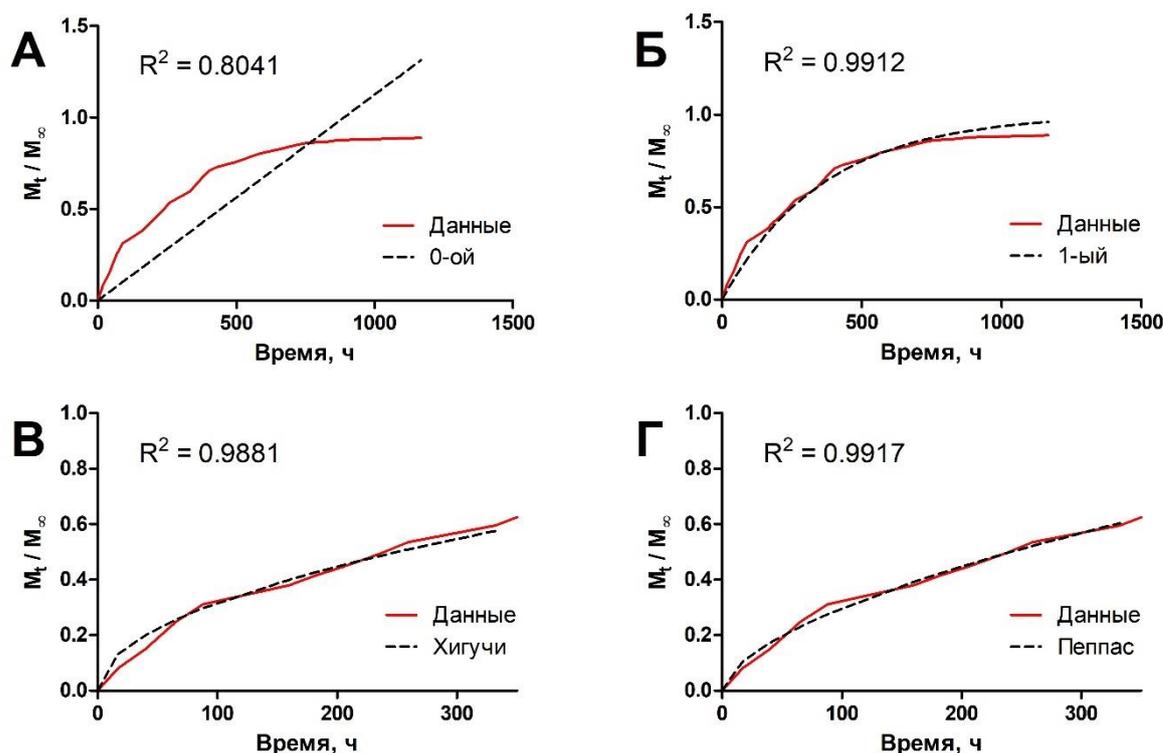


Рисунок 39 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения DOX из гидрогеля при нагрузке DOX в течение 3 дней: модель нулевого порядка (А), модель первого порядка (Б), модель Хигучи (В), модель Пеппаса (Г)

Таблица 11 – Результаты моделирования кинетики высвобождения доксорубина из гидрогеля

| Система / Модель | | Гидрогель, 1 день | Гидрогель, 3 дня |
|---------------------|--------------------------|--|--|
| Модель 0-го порядка | Константы | $k_0 = 2,40 \cdot 10^{-7}$ | $k_0 = 3,12 \cdot 10^{-7}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,8243$ | $R^2 = 0,8041$ |
| Модель 1-го порядка | Константы | $k_1 = 4,90 \cdot 10^{-7}$ | $k_1 = 7,66 \cdot 10^{-7}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9761$ | $R^2 = 0,9912$ |
| Модель Хигучи | Константы | $k_H = 4,20 \cdot 10^{-4}$ | $k_H = 5,27 \cdot 10^{-4}$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9817$ | $R^2 = 0,9881$ |
| Модель Пеппаса | Константы | $k_P = 6,14 \cdot 10^{-5}$ $n = 0,64$ | $k_P = 1,50 \cdot 10^{-4}$ $n = 0,59$ |
| | Коэффициент детерминации | $R^2 = 0,9930$ | $R^2 = 0,9917$ |

Для гидрогелей лучшее соответствие по коэффициенту детерминации демонстрируют модели 1 порядка, Хигучи и Пеппаса. Для модели первого порядка характерна концентрационная зависимость высвобождения, то есть через равные промежутки времени высвобождается равная доля оставшегося препарата.

Согласно смоделированным данным определены константы кинетики высвобождения. В случае если n – экспонента диффузии меньше 0,45 или же 0,43 для сферических образцов механизм соответствует диффузии Фика.

Таким образом, для гидрогелей, в которые препарат вводился в течение 1 дня, отмечается увеличение экспоненты диффузии, что говорит о незначительном влиянии набухания на процесс высвобождения, при этом доминирующим механизмом все равно является диффузионный. Также необходимо отметить, что в случае нагрузки в течение 3 дней происходит увеличение эффективности инкапсуляции, связанное с увеличением степени набухания гидрогеля по сравнению с гидрогелем после сшивки. Следовательно, при нагрузке гидрогелей доксорубицином возможно высвобождение по механизму смешанного типа: основным механизмом является диффузия, а побочным – релаксация полимерных цепочек вследствие набухания.

Варьирование содержания Na-СМС также может влиять на абсорбцию и кинетику высвобождения DOX. Ранее было показано, что добавление Na-СМС приводит к увеличению степени набухания гидрогеля, в этой Главе рассмотрели, как связаны содержание Na-СМС и характеристики гидрогелей как носителей DOX.

На Рисунке 40 представлены кривые кумулятивного высвобождения для 4 составов гидрогелей, на которые наложены смоделированные кривые в соответствии с моделью Пеппаса.

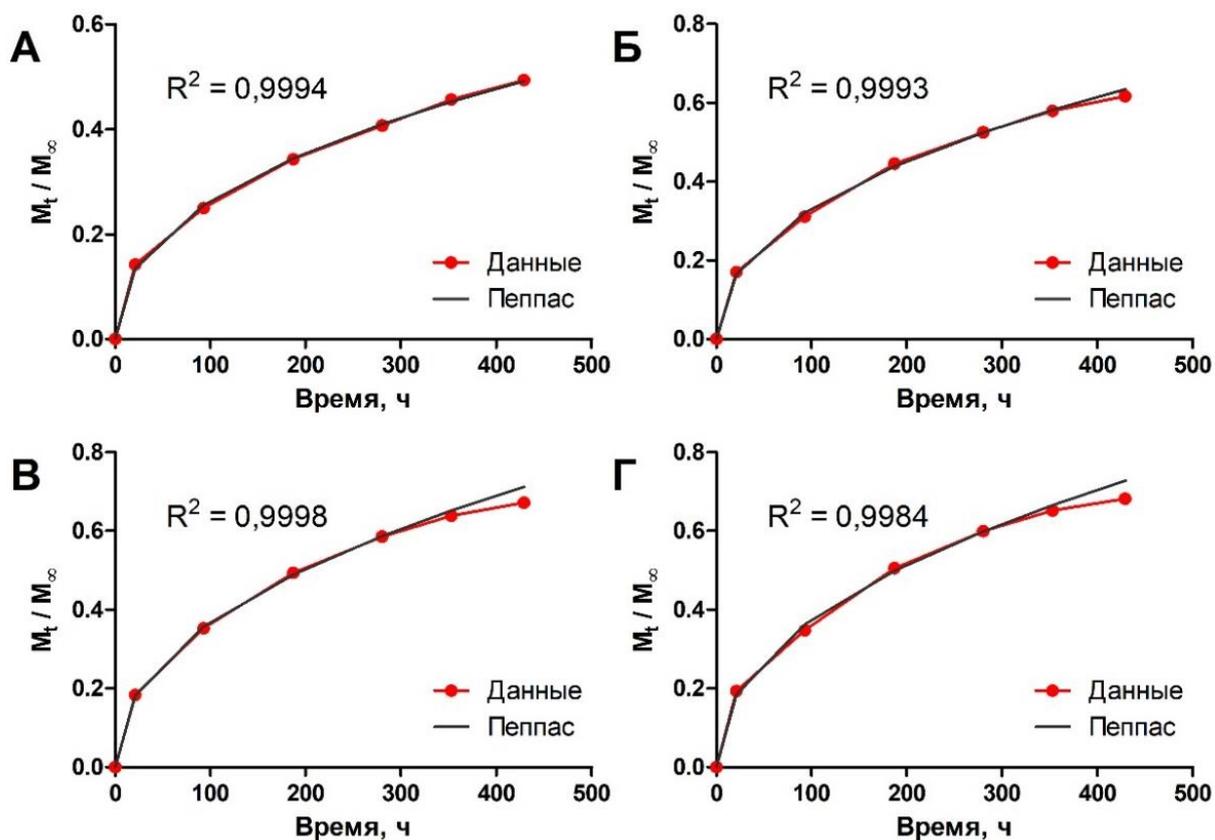


Рисунок 40 – Экспериментальные и смоделированные кривые кумулятивного высвобождения DOX из гидрогелей разного состава: 1Alg0СМС (А), 1Alg05СМС (Б), 1Alg1СМС (В), 1Alg2СМС (Г)

Как можно видеть из графиков при увеличении содержания Na-СМС увеличивается кумулятивное высвобождение, что может быть связано с большим изначальным расширением ячеек, что способствует более быстрому выходу DOX. Также стоит отметить, что в случае 1 и 2 % Na-СМС в профиле кумулятивного высвобождения разницы практически нет. В Таблице 12 приведены сведения о характеристиках абсорбции и высвобождения DOX из гидрогелей разного состава.

Таблица 12 – Характеристики абсорбции и высвобождения DOX сферическими гидрогеля разного состава

| Состав гидрогеля | ЕЕ, % | k_p, c^{-n} | n |
|------------------|-------|---------------|------|
| 1Alg0СМС | 88,5 | 0,00109 | 0,43 |
| 1Alg05СМС | 83,2 | 0,00111 | 0,45 |
| 1Alg1СМС | 79,6 | 0,00115 | 0,45 |
| 1Alg2СМС | 77,2 | 0,00111 | 0,46 |

Согласно приведенным данным, происходит снижение эффективности инкапсуляции, а также увеличение экспоненты диффузии, что может свидетельствовать как об незначительном отклонении от диффузионного механизма, так и о большей деформации образцов при увеличении вязкости гелеобразующего раствора. При этом снижение эффективности инкапсуляции при увеличении содержания Na-СМС может быть связано с большей степенью заполнения ячеек в гидрогеле на основе альгината натрия.

Соответственно преимущественным механизмом высвобождения DOX из гидрогеля системы Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂ является диффузия. В следующей Главе будет предложена модель гидрогеля сферической геометрии, нагруженного DOX.

5.4 Выводы по Главе 5

Проведено моделирование кинетики высвобождения DOX из разработанных компонентов гибридной конструкции. Выявлено наилучшее соответствие экспериментальных данных математическим моделям кинетики высвобождения. Предложена модель системы Диопсид/DOX. В результате оценена растворимость DOX в диопсиде, показано, что при понижении pH с 7,4 до 5,5 растворимость увеличивается в полтора раза.

Несмотря на возможное увеличение ошибки оценки адсорбции и высвобождения доксорубицина частицами диопсида, показана возможность проведения испытания действия нагруженных частиц *in vitro* и *in vivo*, а также доказано влияние диопсида на адсорбцию доксорубицина пористым композиционным материалом СВМПЭ/диопсид.

Глава 6. Моделирование кинетики высвобождения доксорубина из гидрогеля сферической геометрии

Изучение и моделирование высвобождения DOX из гидрогеля дает информацию о кинетике выхода и эффективном коэффициенте диффузии DOX в гидрогеле, которые могут быть использованы для моделирования высвобождения препарата из геометрически сложных гидрогелевых конструкций.

Для этого исследования гидрогели были получены в микроцентрифужных пробирках путем добавления 100 мкл гелеобразующего раствора на основе Na-Alg/Na-СМС, а после раствора сшивающего агента – CaCl_2 . В последствии для изучения абсорбции DOX в каждую пробирку было залито 100 мкл DOX. В результате была получена система, представляющая собой гидрогель сферической геометрии, нагруженный DOX (Рисунок 41).

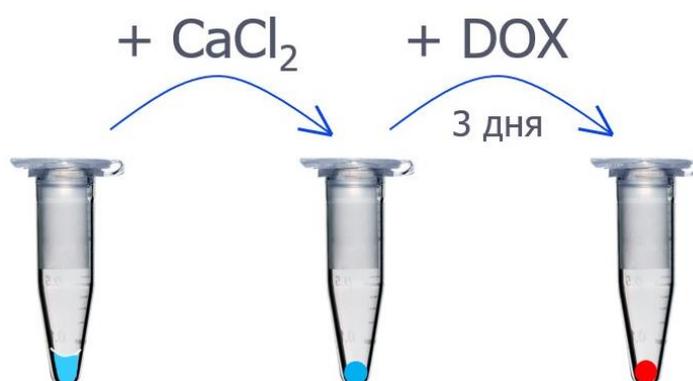


Рисунок 41 – Формирование сферических систем гидрогель/DOX

Полученная система относится к типу монолитных, для которых высвобождение зависит от геометрии, а DOX находится только в растворенном виде.

Также было принято, что рассматриваемый процесс происходит в неподвижной среде. Источник является ограниченным, начальная концентрация которого известна и равна абсорбционной ёмкости носителя.

6.1 Модель гидрогеля сферической геометрии

Для моделирования кинетики высвобождения лекарственных препаратов из гидрогелей разработана модель для экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии. Для этого приняли, что в основе модели лежит образец гидрогеля сферической геометрии, для которого справедливы следующие положения:

- 1) Сферическая система, симметрия относительно центра;

- 2) В начальный момент времени препарат равномерно распределен в системе ($c_0 = \text{const}$);
- 3) Коэффициент диффузии постоянен;
- 4) Сохраняется постоянство объема среды.

В соответствии с этими положениями сформулированы граничные условия системы (Рисунок 42).

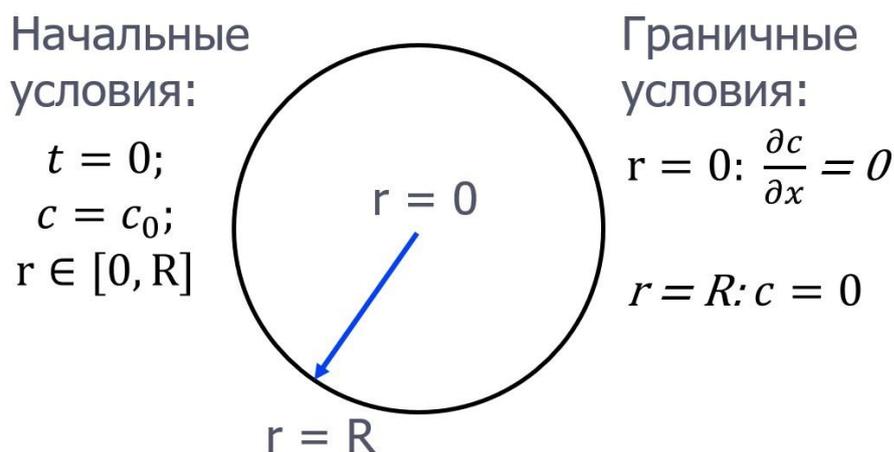


Рисунок 42 – Граничные условия модели гидрогеля сферической геометрии

В случае если основным механизмом высвобождения лекарства является диффузия, а другими можно пренебречь, то как было отмечено в Главе 1 кинетика высвобождения описывается законом Фика.

6.2 Численное моделирование методом Ньютона

Для сферического образца, в котором вещество распределено равномерно, а коэффициент диффузии является константой возможно решение уравнения диффузии в частных производных. От привычного вида уравнения диффузии переходим к уравнению диффузии в сферических координатах (6.1).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad 6.1$$

Решение уравнения диффузии для сферического образца, основным механизмом высвобождения из которого является диффузия, а набуханием можно пренебречь

представлено в (6.2). Это решение совпадает с решениями, предложенными в литературе [153].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp\{-Dn^2\pi^2 t/R^2\}}{n^2}, \quad 6.2$$

где M_t и M_∞ – кумулятивное количество препарата, высвобожденное за время t и ∞ соответственно;

D – коэффициент диффузии препарата в изучаемой системе;

t – время высвобождения M_t количества вещества;

R – радиус сферической системы.

Для численного моделирования высвобождения препарата из гидрогеля сферической геометрии предложен алгоритм, основанный на методе Ньютона, итерационном методе оптимизации. В Приложении 3 представлен код алгоритма, написанный на языке программирования Python.

Идея алгоритма заключается в том, что имея кривую кумулятивного высвобождения и значение радиуса исследуемого образца, можно оценить значение эффективного коэффициента диффузии DOX в гидрогеле. Алгоритм основан на методе Ньютона, проиллюстрируем его с помощью графика (Рисунок 43).

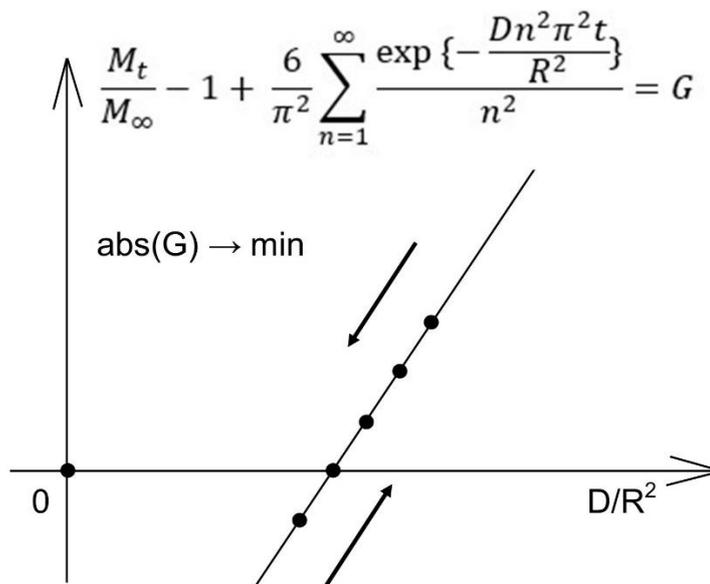


Рисунок 43 – Поиск значения D/R^2 по экспериментальным данным

При исследовании монотонной функции сначала двигались в сторону уменьшения функции, при смене знака направление меняли и уменьшали шаг. Таким образом нашли минимальное по модулю значение функции G и отношение D/R^2 . Для кривой

кумулятивного высвобождения D/R^2 рассчитывается в нескольких точках и усредняется, а затем рассчитывается значение коэффициента диффузии. Рассмотрим вычисление эффективного коэффициента диффузии на примере экспериментальных данных (Таблица 13) и модельной кривой, полученной для гидрогеля состава 1Alg05СМС после нагрузки DOX в течение 1 и 3 дней в соответствии с моделью Пеппаса (Таблица 14), ранее полученной в разделе 5.3.

Таблица 13. Экспериментальные данные

| | № | M_t/M_∞ | $D/R^2, c^{-1}$ | R, мм | D, m^2/c | $D_{cp}, m^2/c$ |
|-----------|---|----------------|-----------------|-------|------------|-----------------|
| Гидрогель | 1 | 0,0858 | 8,4877e-09 | 2,1 | 3,7431e-14 | 7,54E-14 |
| 1Alg05СМС | 2 | 0,2585 | 1,2828e-08 | | 5,6571e-14 | |
| 1 день | 3 | 0,3502 | 1,7398e-08 | | 7,6727e-14 | |
| | 4 | 0,4461 | 1,9598e-08 | | 8,6429e-14 | |
| | 5 | 0,5554 | 2,7166e-08 | | 1,1980e-13 | |
| Гидрогель | 1 | 0,0808 | 9,7317e-09 | | 4,2917e-14 | 1,18E-13 |
| 1Alg05СМС | 2 | 0,2469 | 2,6247e-08 | | 1,1575e-13 | |
| 3 дня | 3 | 0,3805 | 2,7830e-08 | | 1,2273e-13 | |
| | 4 | 0,4483 | 3,1663e-08 | | 1,3963e-13 | |
| | 5 | 0,5342 | 3,8593e-08 | | 1,7019e-13 | |

Таблица 14. Модельные данные: модель Пеппаса

| | № | M_t/M_∞ | $D/R^2, c^{-1}$ | R, мм | D, m^2/c | $D_{cp}, m^2/c$ |
|-----------|---|----------------|-----------------|-------|------------|-----------------|
| Гидрогель | 1 | 0,0826 | 7,8540e-09 | 2,1 | 3,4636e-14 | 7,60E-14 |
| 1Alg05СМС | 2 | 0,2777 | 1,4985e-08 | | 6,6085e-14 | |
| 1 день | 3 | 0,3508 | 1,7460e-08 | | 7,7002e-14 | |
| | 4 | 0,4644 | 2,1572e-08 | | 9,5132e-14 | |
| | 5 | 0,5312 | 2,4275e-08 | | 1,0705e-13 | |
| Гидрогель | 1 | 0,1036 | 1,6205e-08 | | 7,1464e-14 | 1,21E-13 |
| 1Alg05СМС | 2 | 0,2295 | 2,2435e-08 | | 9,8940e-14 | |
| 3 дня | 3 | 0,3915 | 2,9718e-08 | | 1,3106e-13 | |
| | 4 | 0,4548 | 3,2773e-08 | | 1,4453e-13 | |
| | 5 | 0,5210 | 3,6251e-08 | | 1,5987e-13 | |

Согласно проведенному моделированию, эффективный коэффициент диффузии DOX в гидрогеле 1Alg05CMC составил $1,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$. Далее эти данные были использованы для развития модельных представлений об абсорбции и высвобождении DOX сферическими системами состава Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂.

Также данный код позволяет строить графики кумулятивного высвобождения в зависимости от изменения радиуса образца и коэффициента диффузии. Смоделированные кривые приведены на Рисунках 44 и 45.

Рассмотрим, как влияет на кривую кумулятивного высвобождения значение эффективного коэффициента диффузии, рассчитав значение D/R^2 при радиусе образца 5 мм. Значение эффективного коэффициента диффузии варьировали в пределах от 10^{-10} до $10^{-14} \text{ м}^2/\text{с}$.

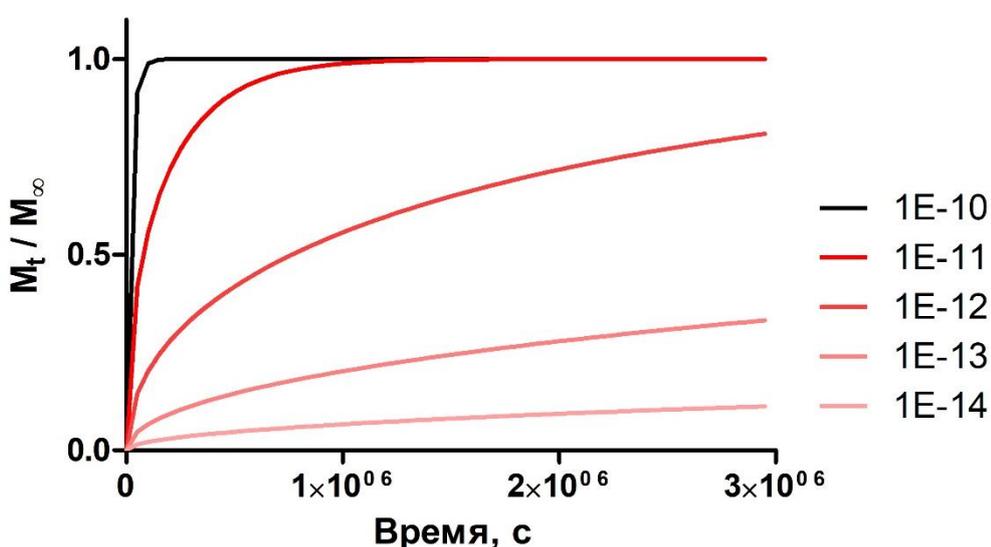


Рисунок 44 – Численное моделирование кривых кумулятивного высвобождения из сферических образцов радиусом 5 мм

Применительно к существующей экспериментальной задаче сложности контроля размера образцов заключаются в способе подготовке образцов к исследованию абсорбции и высвобождения DOX. Поскольку гелеобразующий раствор представляет собой вязкую жидкость, точный контроль объема при помощи пипетки является невозможным, таким образом, возможно отклонение размера образца от идеального. Если эффективный коэффициент диффузии в материале постоянен, рассмотрим, как в рассматриваемой задаче непостоянство радиуса повлияет на кумулятивное высвобождение DOX. Например, для сферического гидрогеля, эффективный коэффициент диффузии DOX в котором $D = 1,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$, при изменении радиуса с 1,5 до 2,5 мм кумулятивное высвобождение изменится следующим образом (Рисунок 45):

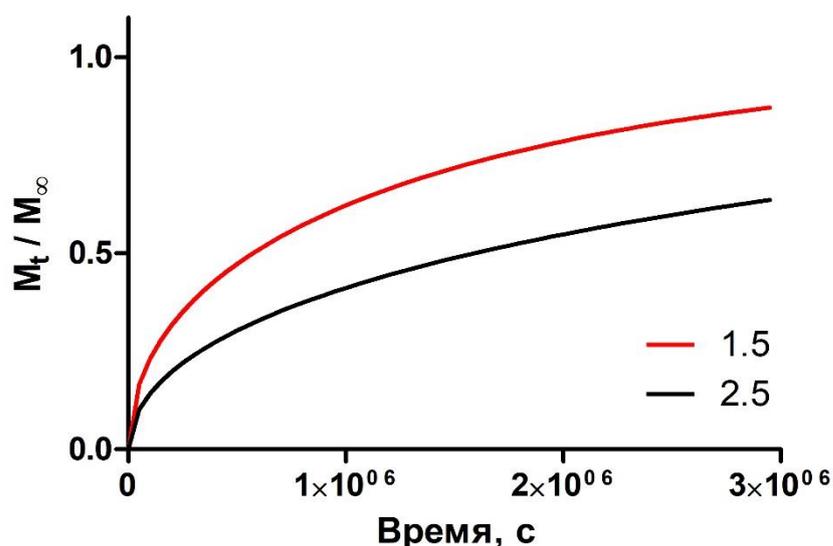


Рисунок 45 – Кривые кумулятивного высвобождения из гидрогеля сферической геометрии радиуса 1,5 и 2,5 мм ($D = 1,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$)

Как видно из графика, построенного с помощью численного решения уравнения диффузии, уменьшение радиуса при заданном коэффициенте диффузии приводит к значительному увеличению кумулятивного высвобождения. Флуктуация размера образцов в реальных экспериментах приводит к увеличению ошибки (SD) определения кумулятивного высвобождения, и может быть причиной отличия оцененных эффективных коэффициентов диффузии при повторе эксперимента на одном материале.

Также проведено численное моделирование методом Ньютона гидрогелей разного состава, кривые кумулятивного высвобождения DOX из которых проанализированы ранее. Они характеризуются близостью экспоненты диффузии к теоретическому значению 0,43. Пусть каждый образец радиусом 2,1 мм, поскольку из 100 мкл гелеобразующего раствора могли сформироваться сферические образцы радиусом 2,1 мм. Это дает информацию об изменении эффективного коэффициента диффузии при увеличении массовой доли натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. В Таблице 15 приведены результаты оценки эффективного коэффициента диффузии.

Таблица 15. Результаты оценки эффективного коэффициента диффузии доксорубицина в гидрогелях разного состава

| | Состав | $D/R^2_{cp}, c^{-1}$ | R, мм | $D_{cp}, m^2/c$ |
|-------------------|------------|----------------------|------------|-----------------|
| Модель | 1Alg0СМС | 1,9685E-08 | 2,1 | 8,68E-14 |
| Пеппаса | 1Alg05СМС | 3,3921E-08 | | 1,50E-13 |
| | 1Alg1СМС | 4,3141E-08 | | 1,90E-13 |
| | 1Alg2СМС | 4,4863E-08 | | 1,98E-13 |
| | Эксперимен | 1Alg0СМС | 1,9951E-08 | 8,80E-14 |
| тальные данные | 1Alg05СМС | 3,4118E-08 | | 1,50E-13 |
| | 1Alg1СМС | 4,3205E-08 | | 1,91E-13 |
| | 1Alg2СМС | 4,5532E-08 | | 2,01E-13 |

Таким образом если бы размер каждого образца был 4,2 мм, то эффективный коэффициент диффузии возрастал бы при увеличении массовой доли Na-СМС от 0 до 2 % масс./об. от $8,74 \cdot 10^{-14} m^2/c$ до $1,99 \cdot 10^{-13} m^2/c$, при этом даже при такой приближенной оценке эффективный коэффициент диффузии DOX в 1Alg05СМС составил $1,5 \cdot 10^{-13} m^2/c$, что близко к оцененному ранее значению, также для этого состава была отмечена хорошая сходимость значений эффективного коэффициента диффузии, определенного по анализу экспериментальных и смоделированных данных.

6.3 Численное моделирование методом конечных элементов

Для численного моделирования высвобождения DOX из гидрогеля сферической геометрии использовали пакет численного моделирования методом конечных элементов (МКЭ) COMSOL Multiphysics. Численное моделирование МКЭ позволяет продемонстрировать диффузионные процессы и количественно оценить кумулятивное высвобождение препарата. Конечно-элементная численная модель, учитывающая геометрию образца и эффективный коэффициент диффузии препарата в материале, позволяет смоделировать высвобождение вещества при диффузионном механизме высвобождения вещества.

Согласно модели, предложенной в разделе 6.1, построили конечно-элементную численную модель. Для этого создали геометрию на основе 2Д геометрии и для моделирования диффузии вещества использовали модуль «Diffusion of diluted species». После чего была построена сетка конечных элементов, в объеме вещества выбрана

начальная концентрация, а на границе 2Д геометрии, которая вращением преобразовалась в объемное тело, задана концентрация 0.

Для примера смоделировали высвобождение DOX из образца радиусом 1,5 мм при значении эффективного коэффициента диффузии $D = 1,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$ и начальной концентрации $8,4 \text{ моль}/\text{м}^3$ (Рисунок 46):

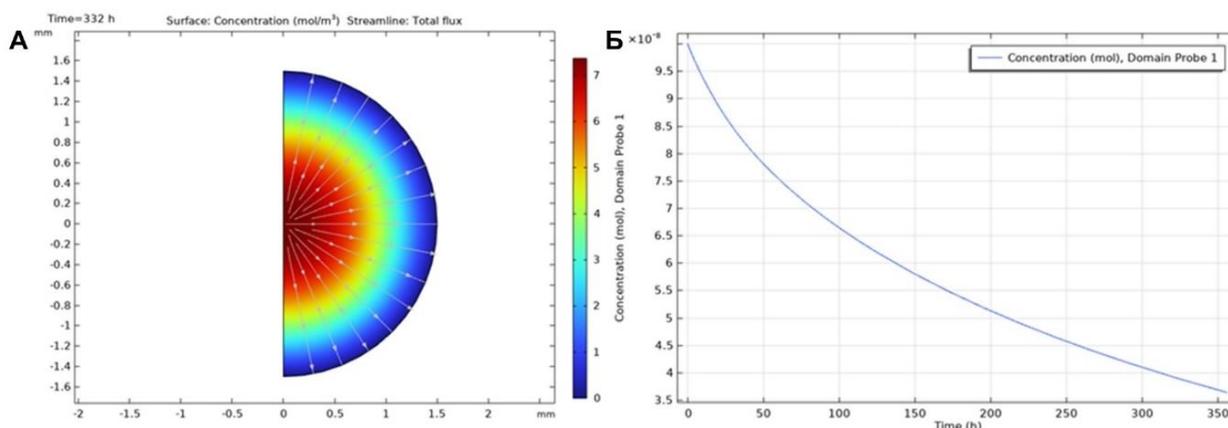


Рисунок 46 – Численная модель высвобождения DOX из гидрогеля сферической геометрии (А) и кривая кумулятивного высвобождения в координатах убыви концентрации в объеме образца (Б)

В Приложении 4 представлены изображения конечно-элементной численной модели в зависимости от времени высвобождения препарата.

Полученная кривая отображает изменение количества DOX в сферическом гидрогеле, эту кривую можно привести к стандартной кривой кумулятивного высвобождения. После перестроения кривая была сравнена с профилем кумулятивного высвобождения, полученным численным решением уравнения диффузии (Рисунок 47А). Также сравнили кривые кумулятивного высвобождения если концентрацию вещества в системе изменить до $20 \text{ моль}/\text{м}^3$ (Рисунок 47Б).

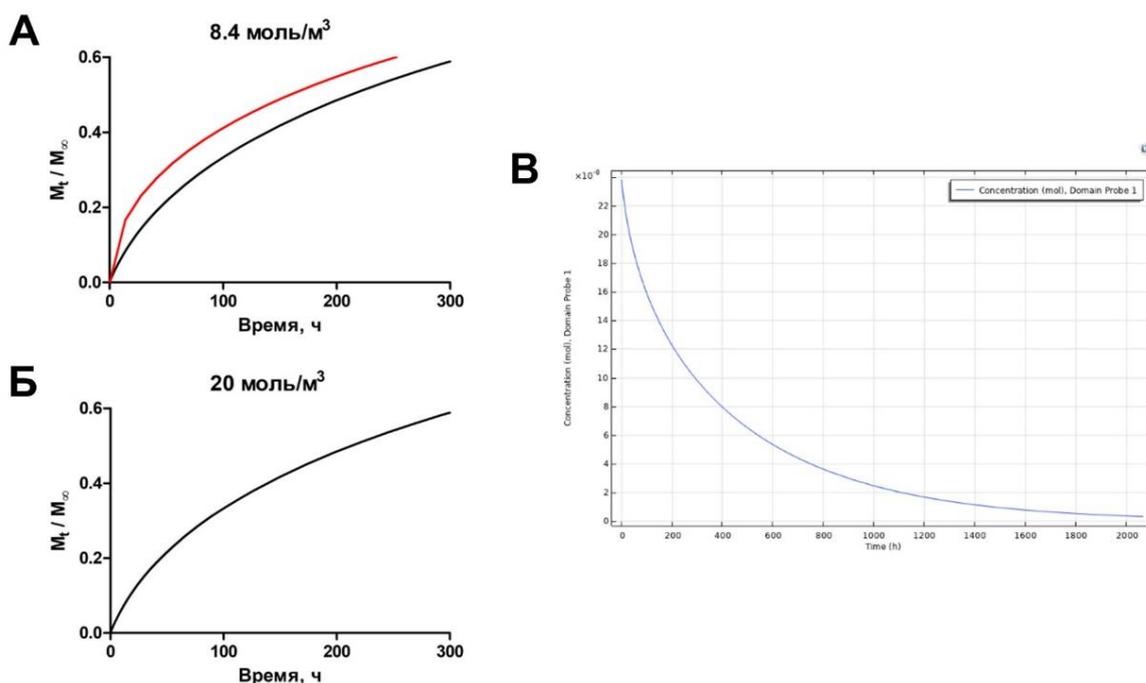


Рисунок 47 – Сравнение кривых кумулятивного высвобождения, полученных численным моделированием МКЭ (черный) и методом Ньютона (красный), для образцов радиусом 1,5 мм при $D = 1,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$ и концентрации 8,4 моль/м³ (А); кривая кумулятивного высвобождения, полученная МКЭ при концентрации 20 моль/м³ (Б) и график убывания содержания вещества в домене (В)

Кривые продемонстрировали хорошую сходимость. Отклонение от кривых, полученных моделированием методом Ньютона, заключается в точности расчета, если при численном решении уравнения диффузии с помощью предложенного алгоритма, обеспечили точность, которая при дальнейшем улучшении не приведет к изменению результата, то моделирование кинетики высвобождения в программном комплексе COMSOL Multiphysics зависит от точности построения сетки (mesh), которая определяет величину элементов. В первой модели была построена сетка с элементами размера «normal». Также видим, что изменение концентрации не оказывает влияния на кумулятивное высвобождение (%) препарата (Рисунок 47Б), однако если построить график изменения количества вещества в домене (Рисунок 47В), в данном случае всем сферическом объекте, получили изменение начального значения концентрации.

Проверена возможность достижения точности вычислений, аналогичной численному моделированию методом Ньютона. Для этого рассмотрели, как изменится кривая кумулятивного высвобождения при уменьшении размера элементов сетки. Модель образца с нанесенной сеткой с элементами размера «extremely fine» представлена на Рисунке 48А. Для гидрогеля сферической геометрии при тех же прочих параметрах при изменении сетки от «normal» до «extremely fine» профиль кумулятивного высвобождения будет приближаться к численному решению уравнения диффузии (Рисунок 48Б).

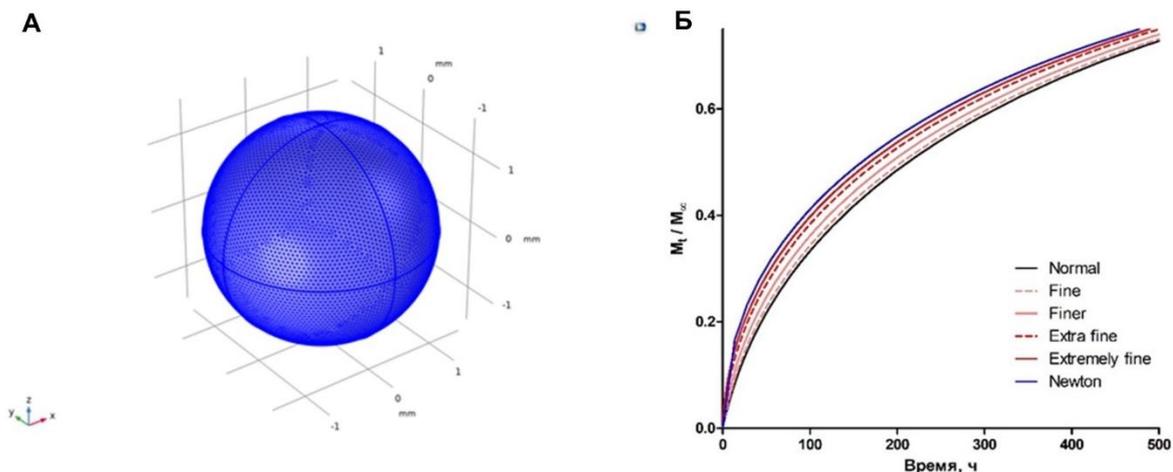


Рисунок 48 – Конечно-элементная модель гидрогеля сферической геометрии (А) и изменение кривой кумулятивного высвобождения при изменении размера конечных элементов (Б) в сравнении с кривой, смоделированной методом Ньютона

Затем провели численное моделирование методом МКЭ систем, изученных в разделе 6.2. Для этого используя оцененные значения эффективного коэффициента диффузии и принятое значение размера образцов, проанализировали сходимость кривых кумулятивного высвобождения (Рисунок 49). Концентрацию DOX задали произвольно, как было показано ранее это не влияет на результаты численного моделирования МКЭ. Размер элемента сетки задали «extremely fine».

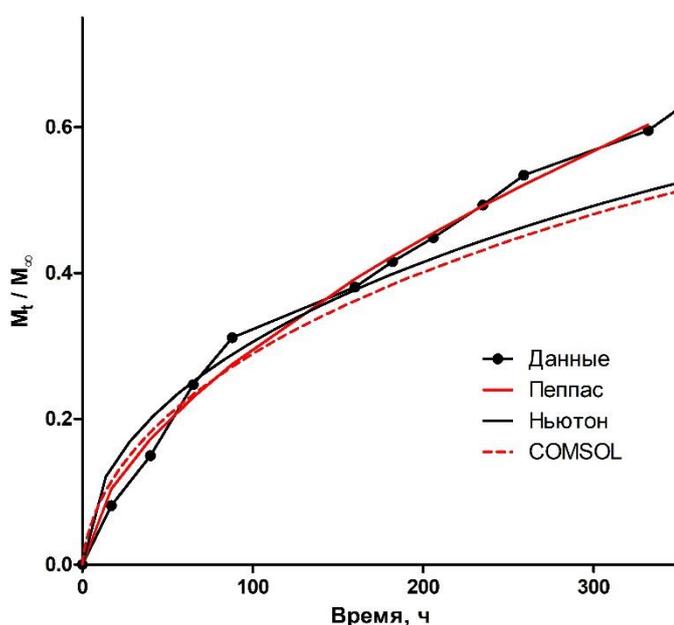


Рисунок 49 – Моделирование высвобождения DOX из гидрогеля 1Alg05CMC, нагруженного DOX в течение 3 дней

Как видно из графика все модели демонстрируют хорошую сходимость до 40 % кумулятивного высвобождения, дальнейшая оптимизация возможна за счет уточнения

значения эффективного коэффициента диффузия и радиуса образца. Затем было смоделировано высвобождение DOX из гидрогелевых материалов разного состава (Рисунок 50).

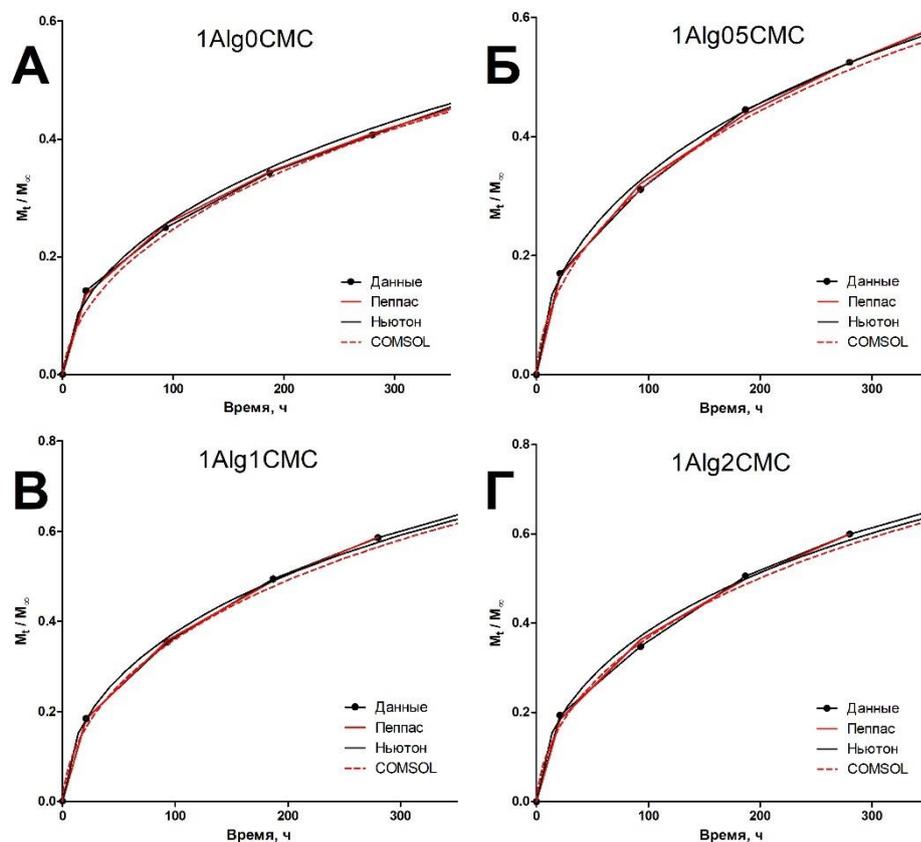


Рисунок 50 – Моделирование высвобождения DOX из гидрогеля на основе альгината натрия с добавлением 0 (А); 0,5 (Б); 1 (В) и 2 (Г) % (масс./об.) натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

Предсказанные кривые кумулятивного высвобождения демонстрируют достаточно хорошую сходимость с экспериментальными данными в допущении постоянного эффективного коэффициента диффузии, что говорит о возможности использования предложенной методики для моделирования кинетики высвобождения лекарственных средств из гидрогелей на основе альгината натрия. Также можно сделать вывод о совпадении экспериментальных и смоделированных кривых при значении экспоненты диффузии близком к теоретическому, что говорит об исключительно диффузионном механизме высвобождения. Однако учитывая использование при моделировании соотношения D/R^2 , обе величины могут быть больше при этом сохраняя соотношение на том же уровне. Далее будет представлено изучение высвобождения DOX из образцов

разного размера, чтобы продемонстрировать вклад набухания и изменения геометрических размеров образцов.

Таким образом, предложена методика моделирования кинетики высвобождения DOX из гидрогелей на основе альгината натрия, заключающаяся в экспресс-оценке эффективного коэффициента диффузии на основе экспериментальных данных кинетики высвобождения DOX из гидрогелей сферической геометрии и численного решения уравнения диффузии методом Ньютона и численном моделировании МКЭ высвобождения DOX при известных концентрации и эффективном коэффициенте диффузии с помощью программного комплекса COMSOL Multiphysics. Однако для совпадения результатов моделирования с экспериментальными данными на значение экспоненты диффузии накладываются ограничения, константа должна стремиться к теоретическому значению для сферических образцов 0,43, а при смешанном типе механизма высвобождения диффузионный механизм должен быть преобладающим.

6.4 Модель ограничения абсорбционной ёмкости гидрогелевых систем

Для изучения абсорбции и кинетики высвобождения лекарственных средств из гидрогелей, а также последующего моделирования кинетических кривых необходимо проводить нагрузку препаратом в одних условиях. Было рассмотрено влияние условий нагрузки DOX на эффективность инкапсуляции гидрогелями сферической геометрии.

Гидрогели сферической геометрии на основе 1Alg05СМС, полученные путем вливания гелеобразующего раствора в микроцентрифужную пробирку, были изучены с точки зрения изменения абсорбционных характеристик при абсорбции DOX из раствора. На Рисунке 51 проиллюстрирована модель ограничения абсорбционной ёмкости гидрогелевых систем при введении лекарственного препарата из раствора.

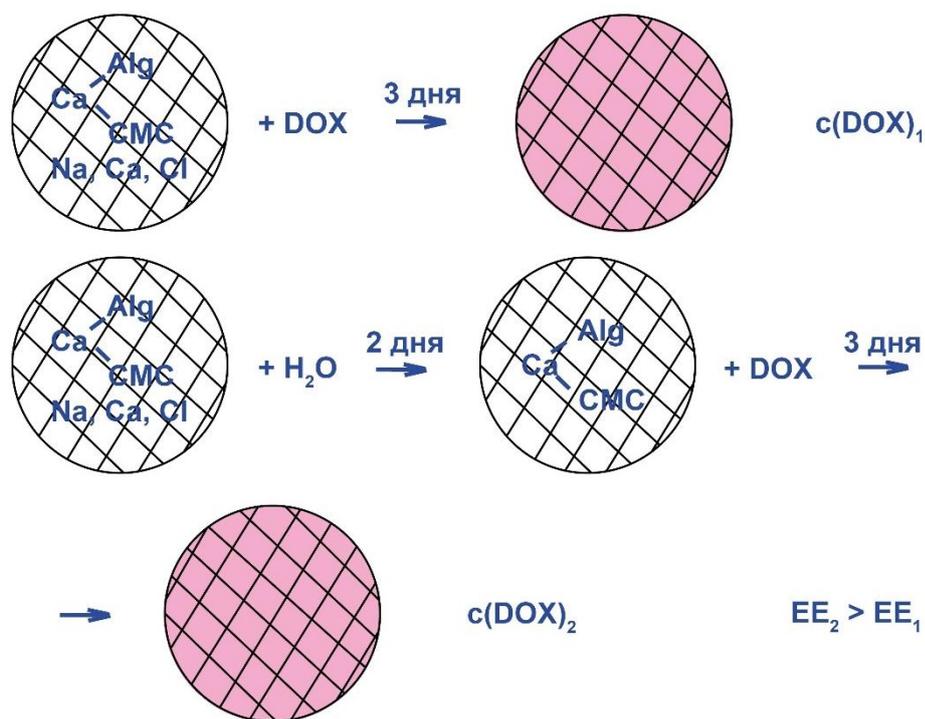


Рисунок 51 – Модель ограничения абсорбционной ёмкости гидрогелевых систем

В соответствии с моделью эффективность инкапсуляции может быть ограничена, а также создана неравномерная концентрация DOX в сферических гидрогелях при нарушении условий создания системы гидрогель/DOX.

Чтобы обеспечить равномерность распределения DOX по объёму образца был использован подход, который многие исследователи применяют после получения гидрогеля. Для этого полученные гидрогелевые образцы выдерживают в дистиллированной воде в течение двух дней, чтобы вывести ионы Ca, Na и Cl. После этого была осуществлена абсорбция гидрогелевыми системами DOX из раствора известной концентрации.

Продемонстрировано уменьшение абсорбционной ёмкости сферических гидрогелей на основе значений эффективности инкапсуляции. Гидрогели, полученные из растворов объёмом 50 и 100 мкл, были залиты 50 мкл DOX. В Таблице 16 показано как меняется абсорбционная ёмкость в зависимости от условий нагрузки DOX.

Таблица 16 - Результаты изучения абсорбции DOX гидрогелями сферической геометрии состава 1Alg05СМС

| Система | - | H ₂ O, 2 дня |
|-----------------------------------|------|-------------------------|
| 1Alg05СМС 50 мкл + 50 мкл DOX | 85,3 | 96,2 |
| 1Alg05СМС 100 мкл + 50 мкл DOX | 84,3 | 94,7 |

ЕЕ, %

Результатами исследования абсорбции, демонстрирующими снижение эффективности инкапсуляции на 10%, подтверждается модель ограничения абсорбционной ёмкости гидрогелевых систем.

6.5 Постоянство начальной концентрации в гидрогелевых системах

Ранее было показано, что в COMSOL начальная концентрация не определяет вид профиля кумулятивного высвобождения, однако согласно экспериментальным данным разная начальная концентрация влияет на долю высвобожденного вещества. Это может быть объяснено начальным распределением вещества в объеме, которое при численном моделировании считается равномерным.

Для математического моделирования кинетики высвобождения DOX из носителей на основе гидрогелей одним из положений является постоянство начальной концентрации вещества в системе, обусловленное равномерностью распределения препарата при нагрузке. На Рисунке 52 представлена иллюстрация эксперимента изучения равенства начальных концентраций.

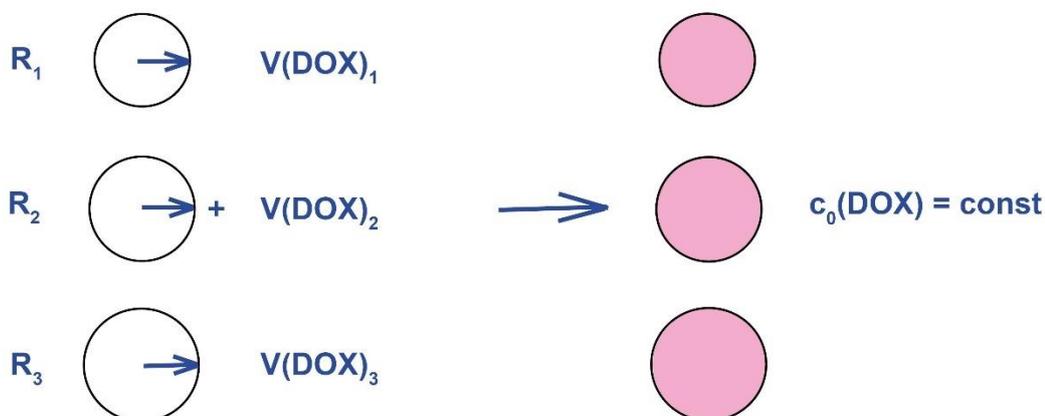


Рисунок 52 – Условия проверки равенства начальных концентраций в системах разного размера

Данный эксперимент был посвящен доказательству возможности создания гидрогелевых систем с одинаковой начальной концентрацией для подтверждения начальных условий, лежащих в основе модели гидрогеля сферической геометрии, а также доказательству размерной зависимости кумулятивного высвобождения из гидрогелей сферической геометрии.

В предыдущих разделах были продемонстрированы кривые кумулятивного высвобождения DOX из гидрогеля (объем гелеобразующего раствора 100 мкл), нагруженного 100 мкл DOX. В соответствии с этим соотношением, учитывая изменение объема при сшивке гидрогелей, были созданы три типа систем на основе 1Alg05CMC. В результате оценена эффективность инкапсуляции, доказывающая формирование гидрогелевых систем с одинаковой начальной концентрацией (Таблица 17).

Таблица 17 - Результаты изучения размерной зависимости абсорбции DOX гидрогелями сферической геометрии состава 1Alg05CMC

| Объем (мкл); | Средний радиус образцов (мм) | Объем DOX, мкл | ЕЕ, % |
|-------------------|------------------------------|----------------|-------|
| 50 мкл 1Alg05CMC | 1,74 | 50 | 96,2 |
| 150 мкл 1Alg05CMC | 2,59 | 150 | 95,0 |
| 300 мкл 1Alg05CMC | 3,15 | 300 | 93,2 |

При сравнении высвобождения DOX из образцов радиусом 2,59 (150 мкл) и 3,15 (300 мкл) мм в мкг получили следующую зависимость (Рисунок 53А).

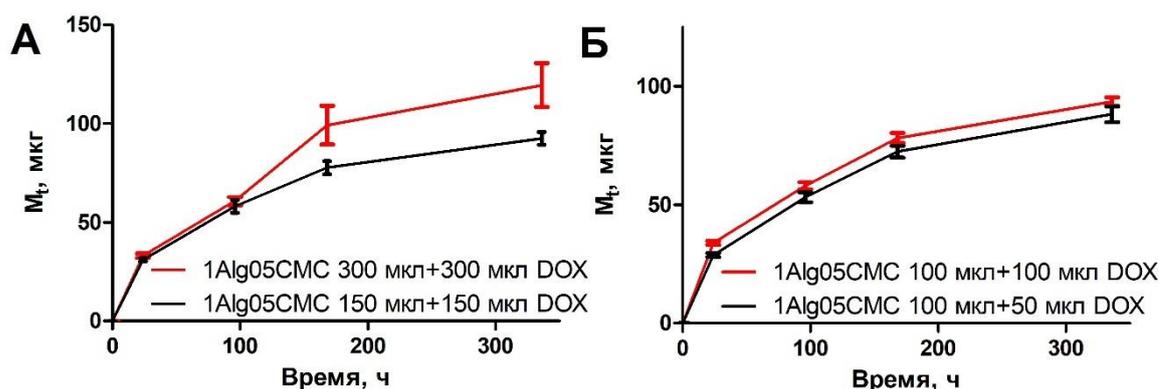


Рисунок 53 – Размерная (А) и концентрационная (Б) зависимость кумулятивного высвобождения DOX

Следовательно, на начальных этапах из этих образцов, учитывая стандартное отклонение, наблюдается небольшое отклонение в высвобождении вещества в сторону увеличения при увеличении размера, однако нет такой сильной зависимости как для образцов одного размера (1Alg05CMC 100 мкл + (50 и 100) мкл DOX, Рисунок 53Б). Это

также может быть обусловлено большей ошибкой измерений в связи с отклонением от идеальности образцов большего размера и непостоянством их радиуса.

Размерная зависимость кумулятивного высвобождения DOX из гидрогеля сферической геометрии была доказана с помощью сравнения экспериментальных данных и смоделированных численным решением уравнения диффузии. На Рисунке 54 представлены кривые кумулятивного высвобождения для гидрогелей сферической геометрии радиусом 1,75, 2,59 и 3,15 мм. Численное решение уравнения диффузии проведено при значении эффективного коэффициента диффузии $1,5 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$.

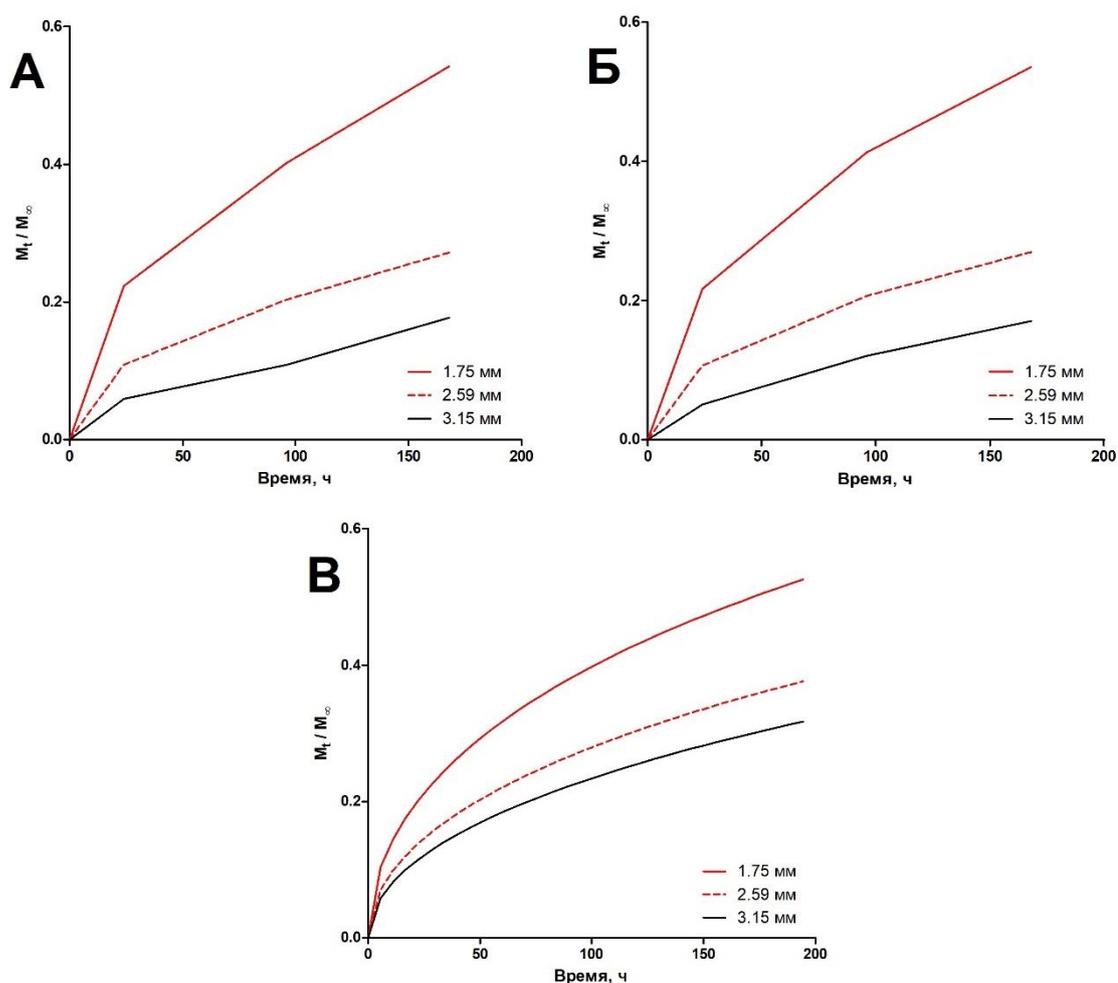


Рисунок 54 – Экспериментальные (А), Пеппас (Б) и смоделированные (В) с помощью численного решения уравнения диффузии кривые кумулятивного высвобождения DOX из гидрогелей состава 1Alg05CMC

Как видно из Рисунка 54 кривые кумулятивного высвобождения демонстрируют хорошую сходимость, а также доказывают зависимость M_t/M_∞ от R . Однако при увеличении радиуса наблюдалось увеличение расхождения экспериментальной и смоделированной кривых при постоянном эффективном коэффициенте диффузии.

Докажем, что модель работает лучше для образцов малого радиуса. Для этого сравнили экспериментальные кривые, смоделированные согласно модели Пеппаса, методом Ньютона и МКЭ. Экспериментальные данные для образцов разного размера были использованы для оценки соотношения D/R^2 с помощью численного решения уравнения диффузии, и затем, зная начальные радиусы, оценены эффективные коэффициенты диффузии DOX в гидрогелях состава 1Alg05CMC при увеличении радиуса с 1,75 до 2,59 и 3,15. Согласно Рисунку 55, смоделированные кривые хорошо сходятся с экспериментальными данными для образца радиусом 1,75 мм.

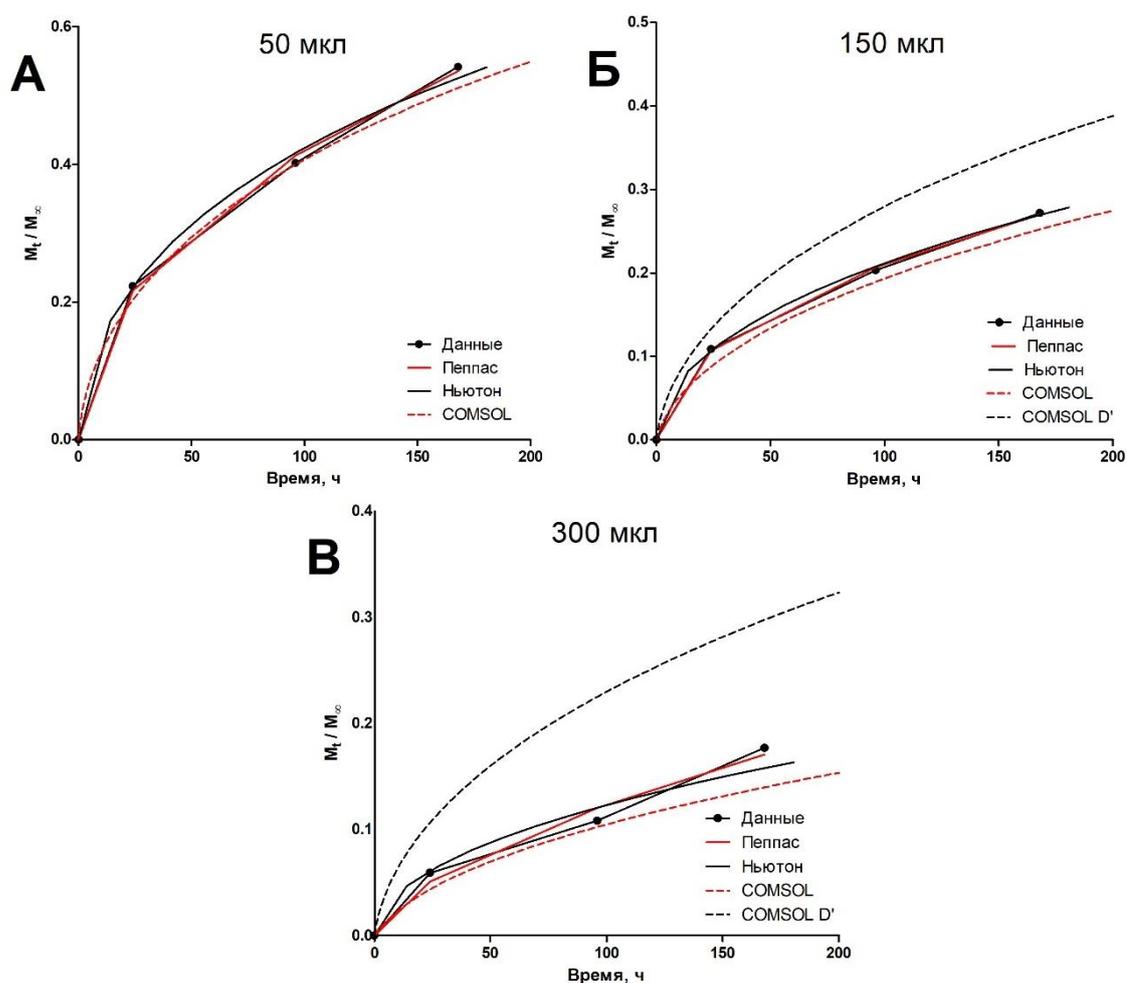


Рисунок 55 – Анализ кривых кумулятивного высвобождения для гидрогелей разного размера: 1,75 мм (А), 2,59 мм (Б), 3,15 мм (В)

Для гидрогеля радиусом 1,75 мм наблюдалась сходимость кривых кумулятивного высвобождения, что говорит о достоверности определяемого значения эффективного коэффициента диффузии, тогда как при увеличении радиуса за счет большего отклонения от идеальности сферической формы образцов происходит все большее отклонение кривых полученных численным моделированием МКЭ (Рисунок 55Б, В).

Таким образом, можно предположить, что на начальном этапе проведения эксперимента, например во время абсорбции DOX, происходит набухание образцов и соответственно увеличение радиуса. Что наряду с увеличением отклонения образцов от сферической геометрии приводит к расхождению экспериментальных и смоделированных методом конечных элементов данных.

На Рисунках 55Б и 55В кривые «Comsol D'» иллюстрируют кривые кумулятивного высвобождения из гидрогелей радиусом 2,59 и 3,15 мм соответственно, когда эффективный коэффициент диффузии равен коэффициенту, оцененному для образца радиусом 1,75 мм. Следовательно, можно сделать вывод, что дальнейшее уточнение коэффициента диффузии возможно при точном контроле радиуса образцов после нагрузки препаратом.

6.6 Модель диффузии из слоя

При изучении систем на основе 1Alg05СМС с различной концентрацией DOX было выявлено, что несмотря на то, что при увеличении размера образца кумулятивное высвобождение должно быть меньше, что подтверждается результатами численного моделирования и экспериментами по изучению образцов разного объема, кумулятивное высвобождение из образца большего радиуса превышало в этот момент времени высвобождение из меньшего образца. Последнее подтверждается результатами исследования высвобождения DOX из образцов, полученных из 50 и 100 мкл гелеобразующего раствора, нагруженных 50 мкл DOX. Профили кумулятивного высвобождения приведены на Рисунке 56.

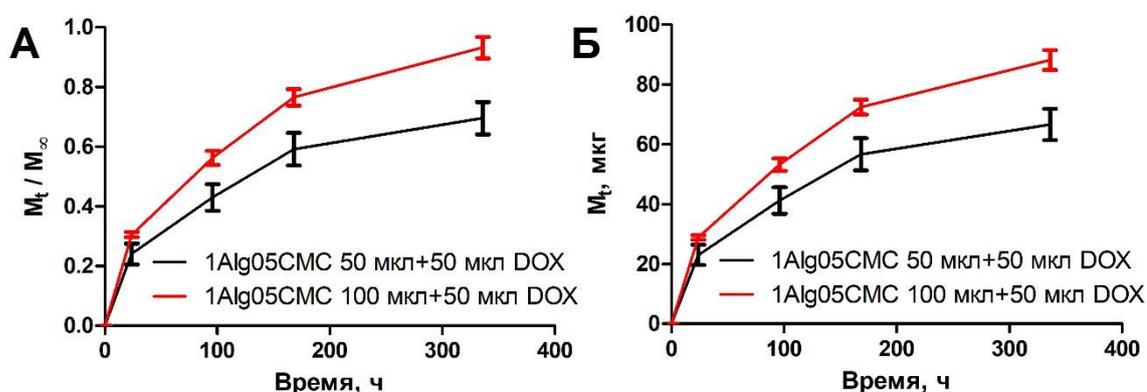


Рисунок 56 – Кривые кумулятивного высвобождения в зависимости от размера образцов, нагруженных одинаковым количеством DOX в долях от нагрузки (А) и в мкг (Б)

Как видно из графиков не только кумулятивное высвобождение больше для большего образца, но и высвободившееся количество DOX в мкг (Рисунок 56Б), в данном случае видно, что значения 50 мкл 1Alg05СМС также занижены по сравнению с предыдущими данными, при этом ранее наблюдали возрастание высвобождаемого DOX при дальнейшем увеличении образцов, что может быть вызвано как увеличением количества вещества с увеличением внешнего слоя, так и с уменьшением пути диффузии. Для того чтобы обосновать такое поведение систем предложена модель диффузии из слоя, иллюстрация модели приведена на Рисунке 57.

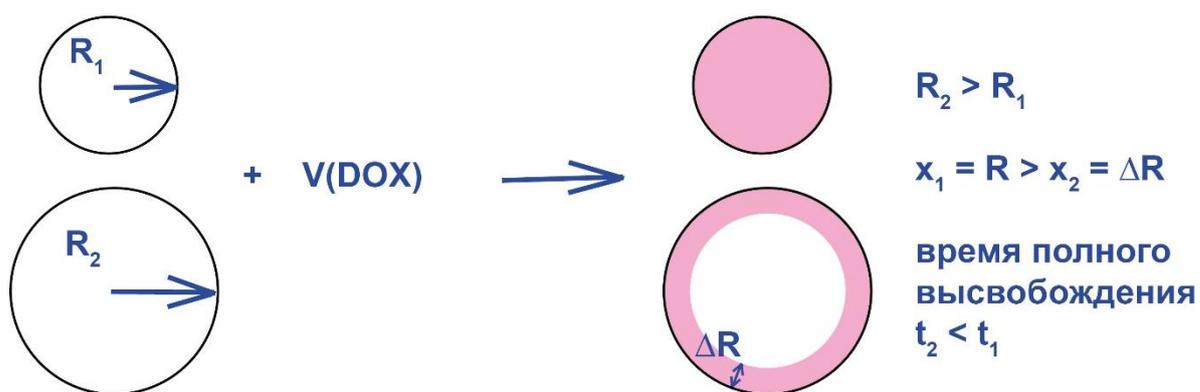


Рисунок 57 – Модель диффузии из слоя

В результате исследования кинетики высвобождения из обеих систем было выявлено, что высвобождается примерно одинаковое количество вещества, тогда как если бы в обеих системах вещество было распределено одинаковым образом, то получили бы, что из большего образца в процентном соотношении высвободилось меньше.

Но если количество вещества в большем образце недостаточно чтобы обеспечить схожий характер распределения препарата. Тогда зная, что время полного высвобождения из большего образца меньше, можно предположить, что при абсорбции препарат не достиг центра и итоговый путь, который надо пройти веществу для выхода на поверхность, меньше, чем в первом случае. То есть можно предположить, что во втором случае наблюдается диффузия из слоя, толщина которого меньше радиуса первого образца. Однако данная модель требует дальнейшего изучения, поскольку под вопрос ставится отсутствие диффузии в центр сферы, где так же, как и на границе концентрация равна 0.

6.7 Концентрационная зависимость кумулятивного высвобождения из гидрогелевых систем: модель ограниченного источника и модель эволюции системы

Ранее предположили, что при равном соотношении объемов гидрогеля и DOX можно получить системы с одной концентрацией DOX, при этом одним из положений, лежащих в основе модели гидрогеля сферической геометрии, является равномерность распределения вещества в гидрогеле.

Чтобы достичь равномерного распределения лекарства в гидрогеле нужно воспользоваться иным способом нагрузки. Так если в гелеобразующий раствор ввести препарат получим систему, в которой равномерно распределено вещество, однако применительно к гидрогелям на основе альгината натрия этот метод не столь эффективен, поскольку после введения препарата раствор необходимо поместить в сшивающий агент, следовательно во время сшивки начнется высвобождение вещества, а также невозможно будет удалить все лишние ионы. Такой подход хорошо работает, например на желатине, поскольку после введения в раствор желатина вещества его достаточно охладить до желирования, после чего при правильно подобранной концентрации возможно выдавливание его из шприца или даже желирование в формах. Таким образом будет либо нагруженное препаратом изделие или материал с лекарством будет инжесктирован в область дефекта, имея равномерное распределение препарата в объеме. На Рисунке 58 продемонстрировано создание систем с разной концентрацией DOX.

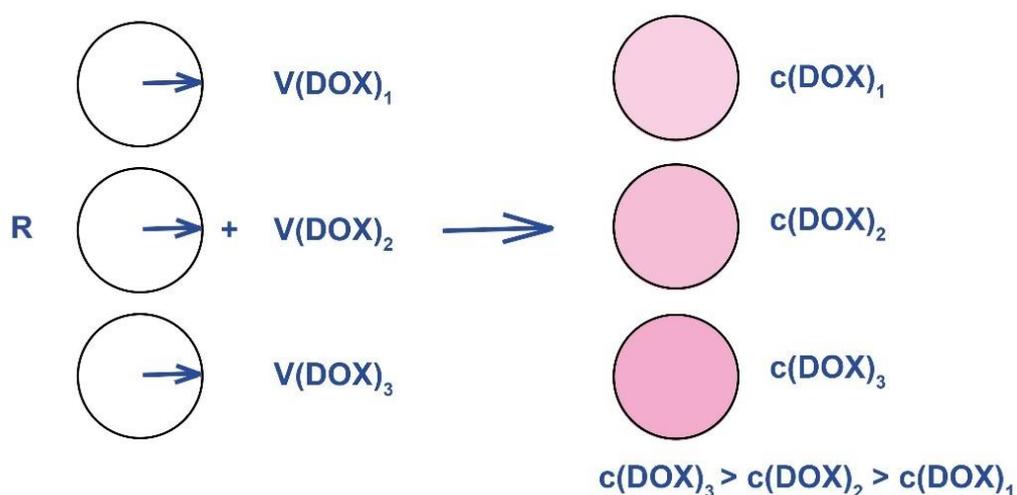


Рисунок 58 – Формирование систем с разного концентрацией препарата

Рассмотрим, как количество препарата влияет на профиль кумулятивного высвобождения (Рисунок 59). Образцы одного размера на основе 1Alg05СМС были

нагружены 50 и 100 мкл DOX, при этом видно, что скорость высвобождения была постоянной.

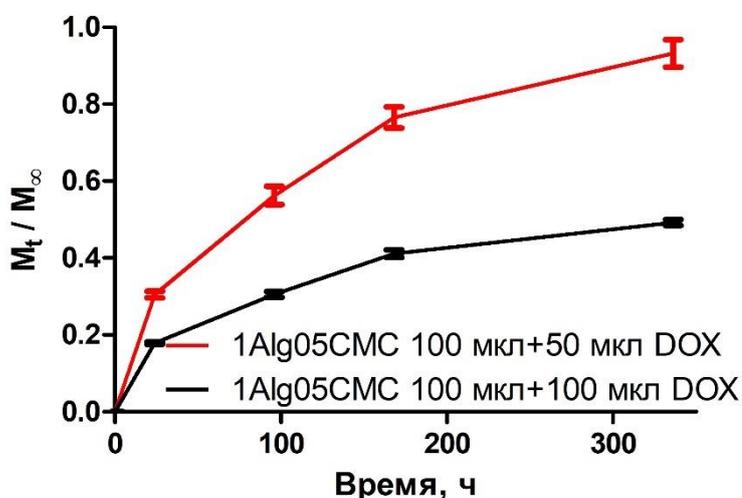


Рисунок 59 – Концентрационная зависимость кумулятивного высвобождения DOX (в долях) из гидрогеля состава 1Alg05CMC (100 мкл)

Модель ограниченного источника заключается в равенстве высвобождаемого количества вещества из образцов одного размера с разной концентрацией препарата вплоть до момента, когда в образце с меньшей концентрацией не возникает недостатка вещества. Также из этой модели следует, что изучаемой системе свойственно 100% высвобождение препарата.

Теперь рассмотрим, что происходит с образцами гидрогелей в процессе абсорбции и десорбции разного количества DOX. Хотя ранее приняли, что эти гидрогели не подвержены набуханию и механизм высвобождения исключительно диффузионный, незначительно они все же расширяются, однако это не влияет на высвобождение, поскольку происходит на этапе загрузки лекарственным средством и мало при малом радиусе образцов. На Рисунке 60 продемонстрированы процессы абсорбции и десорбции DOX на примере гидрогелевых шариков одного размера, нагруженных разным количеством DOX.

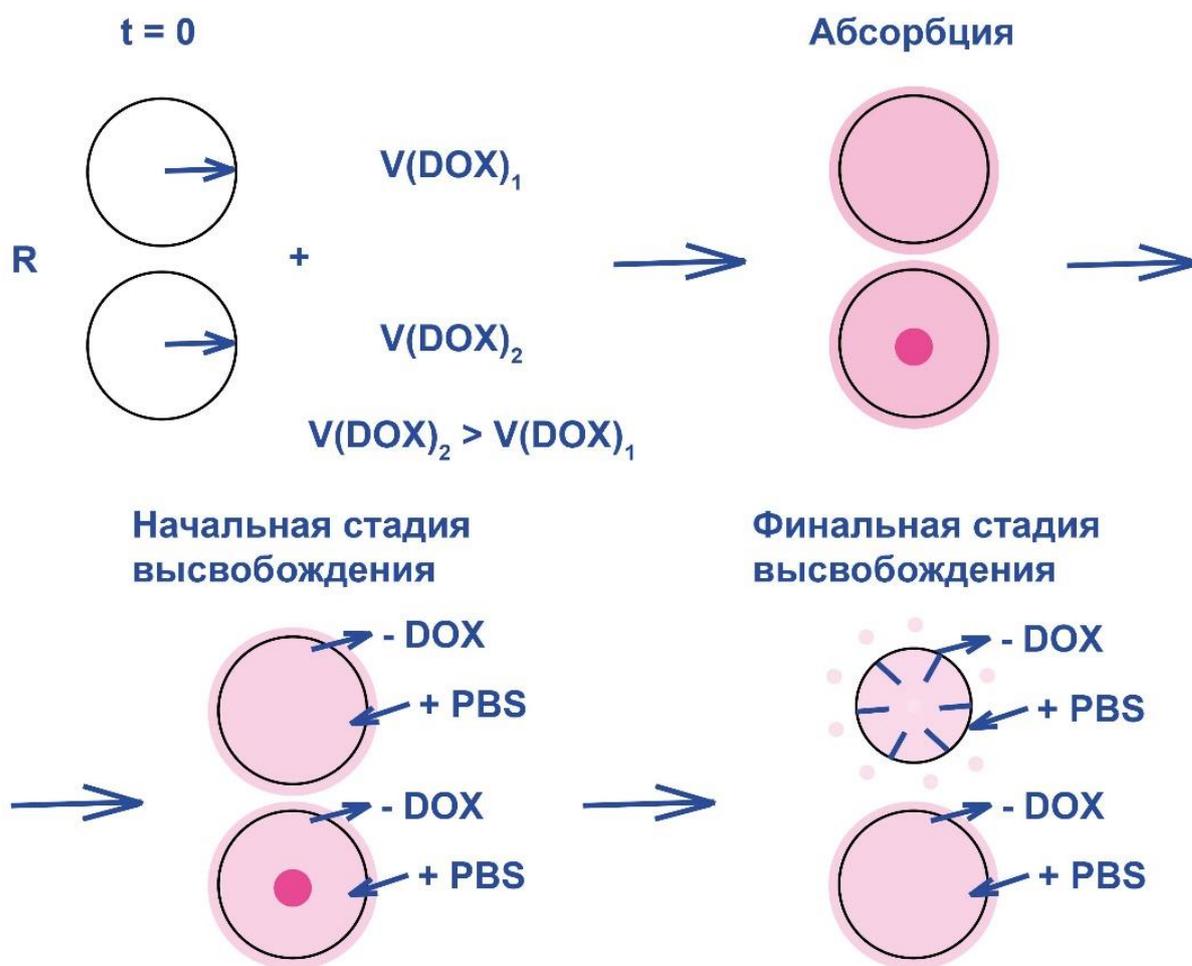


Рисунок 60 – Модель эволюции системы, состоящей из гидрогеля сферической геометрии на основе Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂, нагруженного DOX

Согласно модели эволюции системы при нагрузке образцов одного размера могут формироваться системы, как с начальным равномерным распределением вещества, так и условно равномерным, когда формируется ядро повышенной концентрации. Затем при помещении в PBS начинается выход препарата за пределы образца и проникновение внутрь PBS, постепенно вещество диффундирует и образец с меньшей концентрацией начинает растворяться и как следствие разрушаться, тогда как вторая система продолжает сохранять структурную целостность.

Формирование ядра повышенной концентрации согласуется с представлениями о достижимости кинетики нулевого порядка в носителях на основе гидрогелевых материалов, согласно которым концентрация препарата должна возрастать от внешнего слоя к внутреннему, чтобы компенсировать увеличивающийся путь диффузии.

6.8 Влияние распределения доксорубина на его высвобождение из гидрогелевых материалов сферической геометрии

В предыдущих разделах было показано, что при равенстве начальной концентрации либо же размеров образца выделяется схожее количество вещества и следовательно кумулятивное высвобождение (%) будет разным. Однако если проводить моделирование методом МКЭ кумулятивное высвобождение (%) не зависит от начальной концентрации. Аналогичные выводы можно сделать по литературным данным, где при оценке коэффициента диффузии не учитывается концентрация вещества. Далее рассмотрено влияние начального распределения вещества на профиль кумулятивного высвобождения.

Высвобождение вещества проиллюстрировано на примере двух сферических образцов с разной начальной концентрацией, в которых вещество распределено равномерно, это положение лежит в основе предложенной модели гидрогеля сферической геометрии и положений, на которых основано моделирование МКЭ в COMSOL Multiphysics (Рисунок 61).

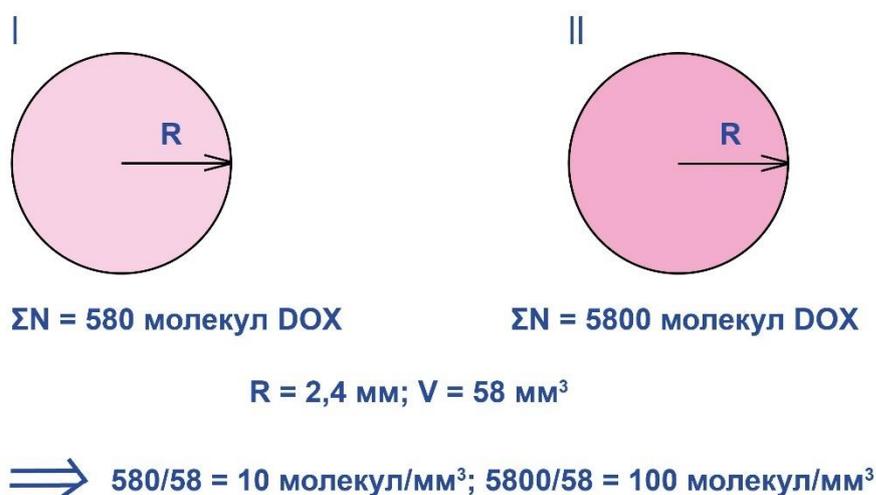


Рисунок 61 – Изучение влияния начального распределения на кумулятивное высвобождение DOX: равномерное распределение

Представим, что каждая сфера состоит из 6 слоев по 0,4 мм (обозначим это малое для модели изменение радиуса как ΔR), а вещество диффундирует из слоя в слой радиально от центра (Рисунок 62).

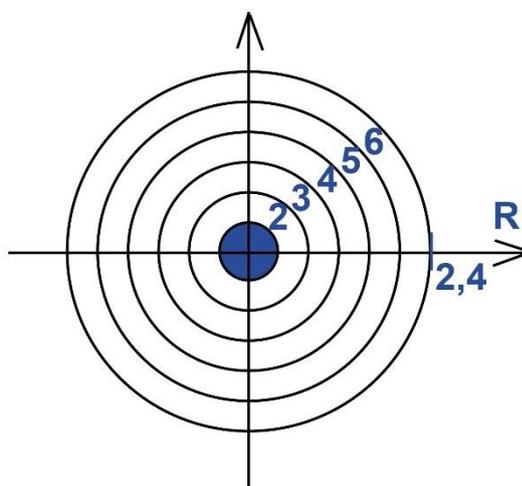


Рисунок 62 – Представление сферического образца в виде набора слоев

Затем оценили объем каждого из 6 слоев:

$$V_1 = \frac{4}{3} \pi \Delta R^3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 0,4^3 = 0,268 \text{ мм}^3$$

$$V_2 = \frac{4}{3} \pi (2\Delta R)^3 - V_1 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 0,8^3 - 0,268 = 2,144 - 0,268 = 1,876 \text{ мм}^3$$

$$V_3 = \frac{4}{3} \pi (3\Delta R)^3 - V_2 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 1,2^3 - 2,144 = 7,235 - 2,144 = 5,091 \text{ мм}^3$$

$$V_4 = \frac{4}{3} \pi (4\Delta R)^3 - V_3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 1,6^3 - 7,235 = 17,149 - 7,235 = 9,914 \text{ мм}^3$$

$$V_5 = \frac{4}{3} \pi (5\Delta R)^3 - V_4 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 2,0^3 - 17,149 = 33,493 - 17,149 = 16,344 \text{ мм}^3$$

$$V_6 = \frac{4}{3} \pi R^3 - V_5 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot 2,4^3 - 33,493 = 57,876 - 33,493 = 24,383 \text{ мм}^3$$

Зная объем каждого из слоев и количество молекул на 1 мм^3 было рассчитано количество молекул DOX в каждом слое, пример расчета количества молекул в первом слое для обеих систем приведен ниже:

$$I N_1 = 10 \cdot 0,268 = 2,68$$

$$II N_1 = 100 \cdot 0,268 = 26,8$$

Продолжим вычисления для каждого последующего слоя, зная количество молекул вещества в каждом слое и общее количество молекул вещества в образце, 580 и 5800 для систем I и II соответственно, в итоге было рассчитано кумулятивное высвобождение препарата, приняв что в каждую временную точку, которые необязательно следуют друг за другом через равные промежутки времени, из образца диффундируют все молекулы из

ближайшего к границе образца слоя. Таким образом получено, что для систем с разной начальной концентрацией, но одинаково равномерным распределением молекул, кумулятивное высвобождение не будет зависеть от концентрации (Таблица 18). Этот вывод соответствует математическому моделированию МКЭ в COMSOL Multiphysics.

Таблица 18 – Кумулятивное высвобождение в соответствии с моделью равномерного распределения

| Время | Количество вышедших молекул | | M_t/M_∞ |
|-------|-----------------------------|------|----------------|
| | I | II | |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 244 | 2438 | 0,421 |
| 2 | 407 | 4072 | 0,702 |
| 3 | 506 | 5066 | 0,873 |
| 4 | 557 | 5575 | 0,961 |
| 5 | 576 | 5763 | 0,995 |
| 6 | 580 | 5800 | 1 |

В данной работе исследовалась система другого вида, также основанная на равенстве концентраций. Рассмотрим, как происходит нагрузка препаратом путем абсорбции из раствора, когда сферический образец гидрогеля помещается в раствор с известной концентрацией DOX (Рисунок 63).

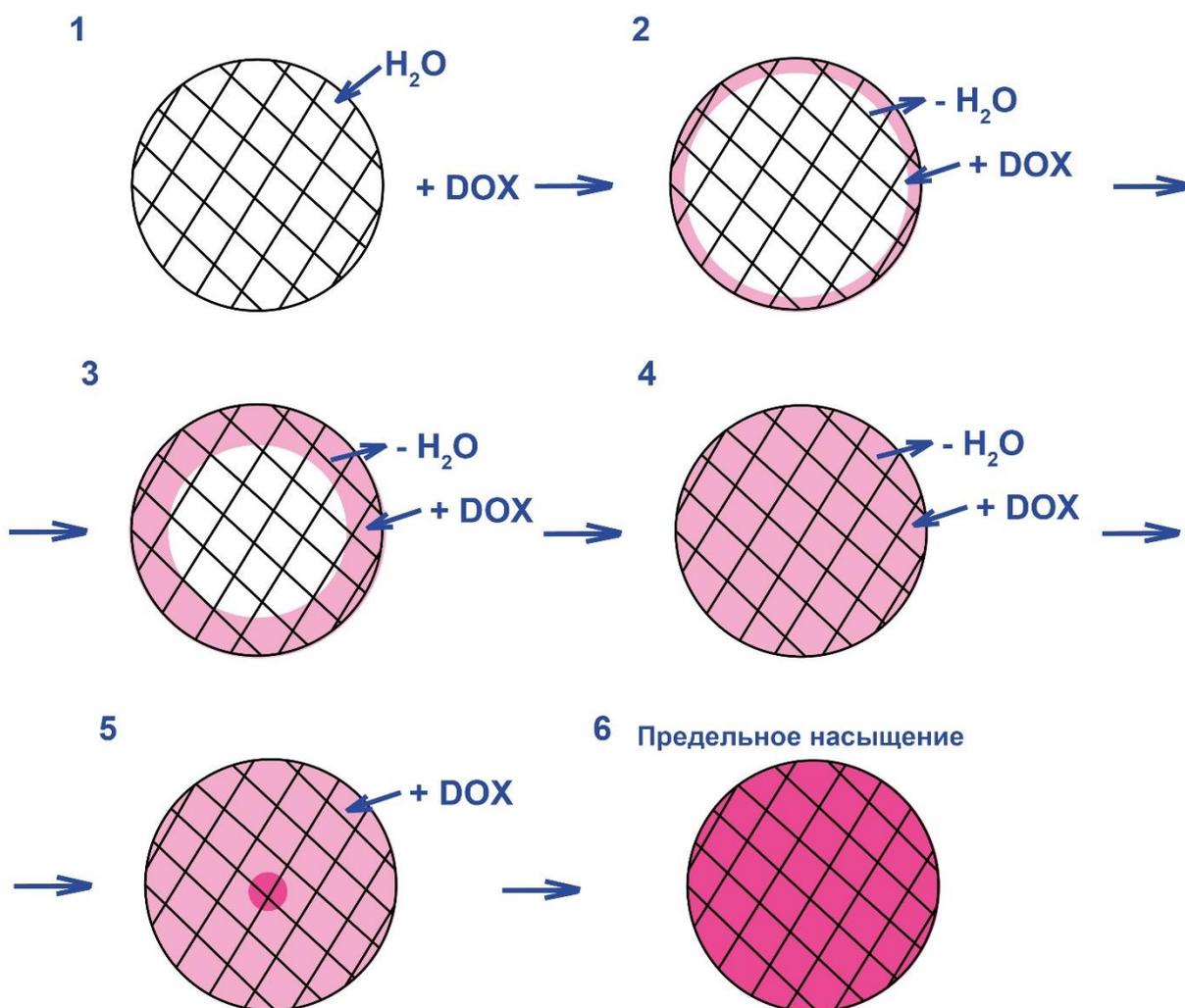
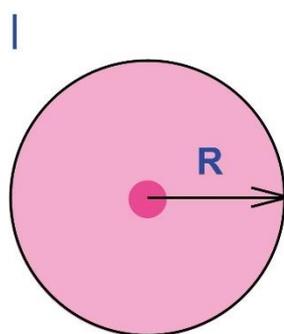


Рисунок 63 – Модель абсорбции DOX из раствора гидрогелем сферической геометрии

Первоначально заполненный водой гидрогель начинает поглощать DOX из раствора известной концентрации, при достижении центра начинает формироваться ядро повышенной концентрации, а в последствии достигается предельное насыщение гидрогелевого материала путем абсорбции DOX из раствора.

Таким образом изучаемая система соответствует картинке 5 в этой схеме, где внутри образца есть области с разной концентрацией. В соответствии с этой моделью представили, что есть два сферических образца с разной начальной концентрацией, в которых вещество распределено равномерно, но при этом в каждом слое одинаковое количество молекул, за исключением концентрированного ядра, радиус которого зависит от количества абсорбированного препарата (Рисунок 64). Концентрация во всех остальных слоях такая, что обеспечивает свободное перемещение молекул и их диффузию в радиальном направлении слой за слоем. Пусть количество вещества в обеих системах достаточно большое, чтобы источник не истощался, тогда в соответствии с экспериментальными данными из каждой системы будет выходить одинаковое

количество DOX за промежуток времени. Пусть обе системы имеют в каждом слое по X молекул, тогда как в первой системе в первом слое 2,25X молекул, во второй – 2,25X молекул в каждом из слоев 1 и 2. На основе этого рассчитано чему равно минимальное количество молекул DOX в каждом из слоев.

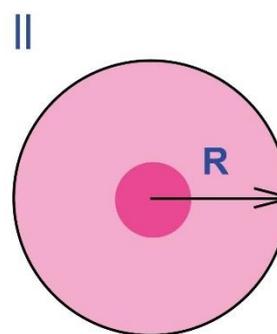


$$\Sigma N_1 = 580 \text{ молекул DOX}$$

$$5x + 2,25x = 580$$

$$7,25x = 580$$

$$x = 80$$



$$x = 80$$

$$4x + 4,5x = 8,5 \cdot 80 = 680$$

$$\Sigma N_2 = 680 \text{ молекул DOX}$$

Рисунок 64 – Изучение влияния начального распределения на кумулятивное высвобождение DOX: формирование ядра повышенной концентрации

То есть пока вещество диффундирует из слоев 3-6 для обеих систем высвобождение в мкг остается одинаковым. Когда вещество покидает 2 и 3 слой для систем I и II соответственно концентрированное ядро начинает диффундировать в ближайший слой, при этом вещество в первой системе закончится раньше. Следовательно, для оценки кумулятивного высвобождения и эффективного коэффициента диффузии в системах этого вида можно использовать носители с большим количеством препарата. В Таблице 19 приведены данные по кумулятивному высвобождению вещества если имеет место концентрационная зависимость, пусть в обоих случаях вещество выходит с одной скоростью все время исследования.

Таблица 19 – Кумулятивное высвобождение при наличии ядра повышенной концентрации в системах одного размера

| Время | Количество вышедших молекул | M_t/M_∞ | M_t/M_∞ |
|-------|--------------------------------|----------------|----------------|
| | | I | II |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 80 | 0,14 | 0,12 |
| 2 | 160 | 0,28 | 0,24 |
| 3 | 240 | 0,41 | 0,35 |
| 4 | 320 | 0,55 | 0,47 |

В соответствии с этими результатами прослеживается отличие значений кумулятивного высвобождения систем с разным количеством вещества. Причем это отклонение имеет ту же тенденцию, что в эксперименте, то есть при большем количестве вещества в системе кумулятивное высвобождение меньше.

Для большего соответствия модели необходимо учитывать объемы каждого слоя и пересчитывать количество молекул в каждом из них (Рисунок 65). За основу взяты те же системы, что и предыдущем расчете, но в первой системе более концентрированным является первый слой, а во второй слое 1-3.



Рисунок 65 – Изучение влияния начального распределения на кумулятивное высвобождение DOX: формирование ядра повышенной концентрации с равномерным распределением вещества по объему

Если количество молекул вещества в слое увеличивается пропорционально увеличению объема, было рассчитано, сколько молекул находится в каждом слое. Допустим во втором слое первой системы 40 молекул DOX, тогда в первом слое будет, учитывая, что плотность заполнения слоя больше в 2,25 раз по сравнению с другими:

$$I: N_1 = \frac{0,268}{1,876} * 40 * 2,25 = 13$$

Для второй системы количество молекул в слоях 1-3 также будет увеличено с коэффициентом 2,25. Таким образом, получили, что для второй системы во втором и третьем слоях будет:

$$II: N_2 = 40 * 2,25 = 90$$

$$N_3 = \frac{5,091}{1,876} * 40 * 2,25 = 108 * 2,25 = 244$$

В остальных слоях количество молекул будет одинаковым:

$$N_4 = \frac{9,914}{5,091} * 108 = 211$$

$$N_5 = \frac{16,344}{9,914} * 211 = 348$$

$$N_6 = \frac{24,383}{16,344} * 348 = 512$$

Оценено изменение профиля кумулятивного высвобождения (Таблица 20).

Таблица 20 – Кумулятивное высвобождение при наличии ядра повышенной концентрации с равномерным распределением вещества по объему

| Время | Количество вышедших молекул | M_t/M_∞ | |
|-------|--------------------------------|----------------|------|
| | | I | II |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 512 | 0,42 | 0,36 |
| 2 | 860 | 0,70 | 0,61 |
| 3 | 1071 | 0,87 | 0,76 |

По оцененным количествам молекул построены графики кумулятивного высвобождения DOX при разном начальном распределении вещества (Рисунок 66).

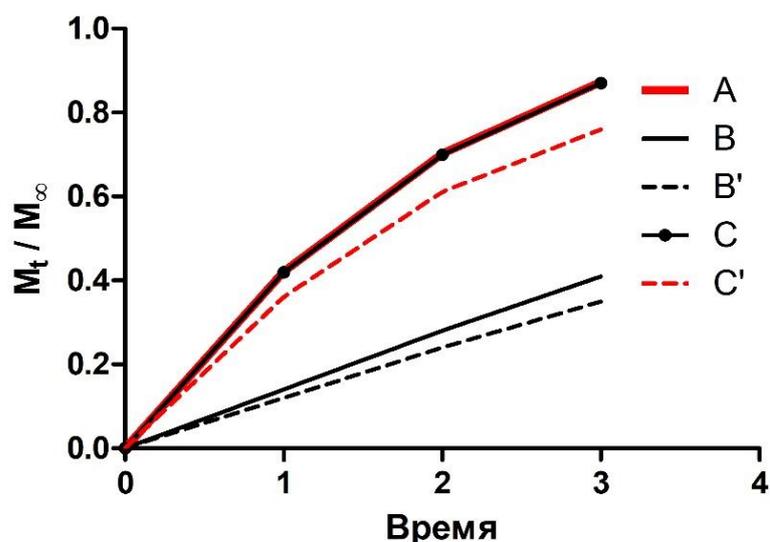


Рисунок 66 – Изменение профиля кумулятивного высвобождения при изменении начального распределения вещества в системе: А – равномерное распределение; В, В' – формирование ядра повышенной концентрации в системе I и II соответственно; С, С' – формирование ядра повышенной концентрации с равномерным распределением вещества по объему в системе I и II соответственно

Следовательно, при формировании ядра повышенной концентрации возможно стремление к кривой кумулятивного высвобождения с идеально равномерным начальным распределением вещества, это демонстрируется сходимостью кривых А, С и С'.

Таким образом доказано условно равномерное распределение вещества в изучаемой системе. Необходимо отметить, что формирование системы данного вида не является несоответствием модели гидрогеля сферической геометрии, поскольку имеет место однородность распределения другого вида, это лишь говорит о необходимости учитывать начальное распределение вещества при использовании методики.

6.9 Оценка эффективного коэффициента диффузии

В соответствии с разработанными модельными представлениями необходимо внести изменения в методику оценки эффективного коэффициента диффузии. Ранее были продемонстрированы большие расхождения в смоделированных и экспериментальных кривых для образцов большого радиуса. Примем, что, достигнув соответствия смоделированных и экспериментальных кривых мы получим эффективный коэффициент диффузии DOX в системе Na-Alg/Na-СМС/СaСl₂, а также сформулируем ограничения модели гидрогеля сферической геометрии.

Для численного моделирования МКЭ высвобождения DOX из гидрогеля состава 1Alg05CMC и совпадения результатов моделирования с экспериментальными данными учли, что при абсорбции DOX и дальнейшем добавлении PBS возможно значительное увеличение размеров образцов, и это увеличение тем более значимо чем больше первоначальный радиус образца. Например, на образцах малого радиуса, полученных сшивкой гелеобразующего раствора объемом 50 и 100 мкл, геометрическая форма которых наиболее близка к сферической, при абсорбции практически не наблюдалось увеличения размеров, что в результате привело к сходимости экспериментальных и смоделированных кривых кумулятивного высвобождения. Однако при увеличении начального размера образцов в ходе эксперимента наблюдалось сильное расширение образцов вплоть до двухкратного увеличения объема. На Рисунке 67 приведены экспериментальные кривые для образцов, полученных сшивкой гелеобразующего раствора объемом 150 и 300 мкл, средний радиус которых до нагрузки DOX составлял 2,59 и 3,15 мм, в сравнении с смоделированными МКЭ кривыми кумулятивного высвобождения DOX из гидрогеля состава 1Alg05CMC при значении эффективного коэффициента диффузии $1,7 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$ и новых радиусах в соответствии с начальным расширением образцов.

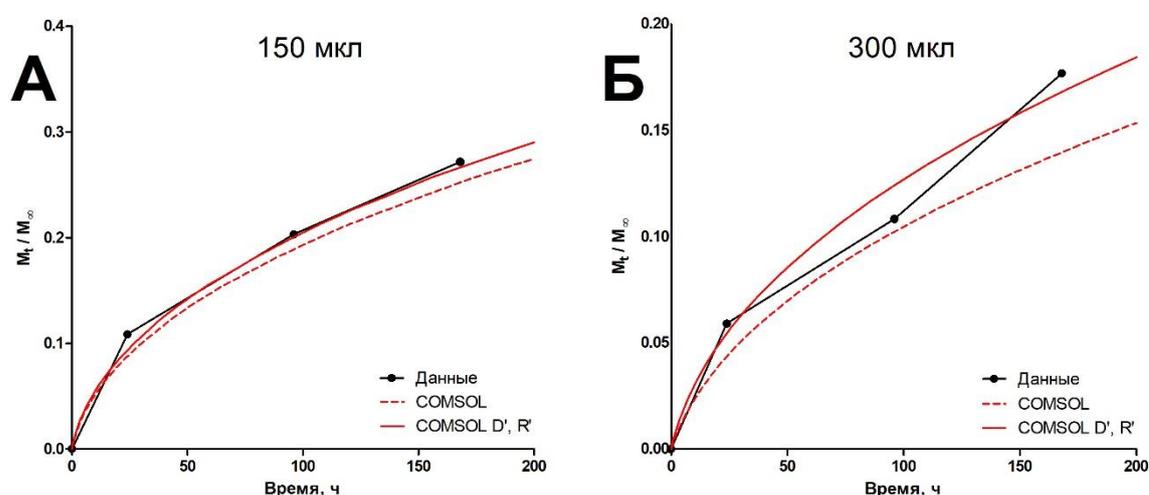


Рисунок 67 – Сравнение экспериментальных и смоделированных кривых для образцов большого радиуса при новых значениях коэффициента диффузии и радиуса образцов: образцы состава 1Alg05CMC с начальным объемом раствора 150 мкл (А) и 300 мкл (Б)

По сходимости кривых кумулятивного высвобождения после абсорбции DOX радиус образцов увеличился до 3,5 и 5,5 мм для образцов 150 мкл и 300 мкл соответственно. Таким образом эффективный коэффициент диффузии DOX в гидрогеле 1Alg05CMC составил $1,7 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$, подтверждая возможность использования разработанной методики для экспресс-оценки коэффициента диффузии в гидрогелях

сферической геометрии. Наиболее точно оценка может быть проведена при малых значениях радиуса и близости экспоненты диффузии к теоретическому значению, которое для сферических систем составляет 0,43.

6.10 Обобщенная модель высвобождения низкомолекулярных веществ из гидрогелей сферической геометрии

Разработанные в разделах 6.4–6.8 модельные представления были использованы для создания модели, описывающей абсорбцию и высвобождение доксорубина гидрогелевыми материалами. На Рисунке 68 проиллюстрирована обобщенная диффузионная модель абсорбции и высвобождения низкомолекулярных веществ из гидрогелей сферической геометрии на примере системы Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂. По сравнению с моделью гидрогеля сферической геометрии предложенная модель является макроскопической моделью внутреннего массопереноса в гетерофазной системе, где внутренний массоперенос является контролирующей стадией процесса высвобождения.

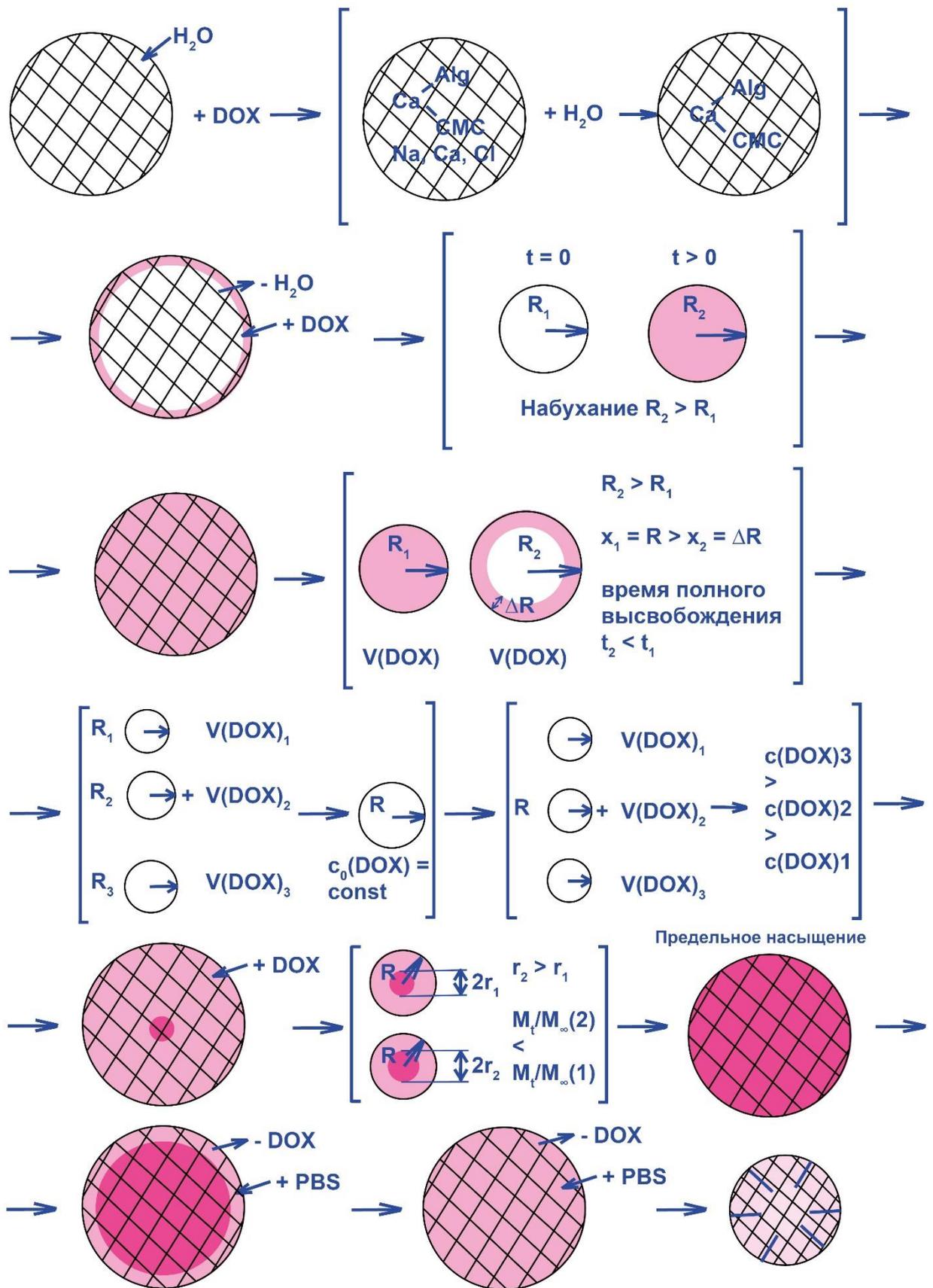


Рисунок 68 – Обобщенная модель абсорбции и высвобождения DOX гидрогелем сферической геометрии состава Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂

Согласно предложенной модели, после получения образцы гидрогелевых материалов содержат ионы натрия, кальция и хлора, которые необходимо удалить выдержкой в дистиллированной воде, что приводит к увеличению эффективности инкапсуляции в исследуемой системе на 10 %. Затем образцы заливают раствором доксорубина известной концентрации, при этом наблюдается увеличение объема образца вследствие набухания. Измерение нового радиуса образца позволяет с большей точностью оценивать эффективный коэффициент диффузии доксорубина в гидрогеле. При нагрузке образцов разного размера одним объемом доксорубина наблюдалось меньшее время полного высвобождения для образцов большого радиуса, на основе чего предложена модель диффузии из слоя. Также в основу модели легли экспериментальные данные, демонстрирующие получение образцов разного размера с одной концентрацией доксорубина при пропорциональном изменении объема препарата. На образцах одного размера продемонстрирована модель ограниченного источника, показывающая, что при разной начальной концентрации скорость высвобождения препарата остается постоянной до истощения источника. При образовании системы с равномерным распределением доксорубина начинает формироваться ядро повышенной концентрации и при разном размере ядра наблюдается различие профилей кумулятивного высвобождения. Возможность формирования ядра повышенной концентрацией объясняется моделированием профилей кумулятивного высвобождения в зависимости от начального распределения препарата в системе. В дальнейшем достигается состояние предельного насыщения путем абсорбции доксорубина из раствора и начинается процесс десорбции, механизм высвобождения в данной системе преимущественно диффузионный, что подтверждается значением экспоненты диффузии как константы, описывающей механизм высвобождения лекарственного средства. Последние стадии являются частью модели эволюции системы, согласно которой при высвобождении препарата из гидрогелевого материала начинается абсорбция PBS и постепенное замещение препарата, при этом PBS проникая в материал приводит к его постепенному растворению за счет разрушения физических сшивок и в итоге образец полностью разрушается.

6.11 Методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии в гидрогелях сферической геометрии

Основываясь на экспериментальных данных и результатах численного моделирования, разработана методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии низкомолекулярных веществ в гидрогелях сферической геометрии, а также

предложена методика моделирования высвобождения низкомолекулярных лекарственных средств из гидрогелей сложной геометрии.

Методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии в гидрогелях сферической геометрии основана на анализе кривых кумулятивного высвобождения низкомолекулярного вещества из образцов известного размера. Важным этапом оценки эффективного коэффициента диффузии является учет изменения радиуса образца при нагрузке препаратом. Размер молекул и как следствие молекулярная масса препарата должен быть мал по сравнению с размером элемента сетки гидрогеля для обеспечения свободного перемещения молекул в объеме образца. Численное решение уравнения диффузии позволяет найти соотношение D/R^2 по зависимости кумулятивного высвобождения, выраженного в долях от абсорбированного количества препарата, от времени. Таким образом можно получить набор D/R^2 и зная радиус образца оценить эффективный коэффициент диффузии.

Совпадение численного моделирования методом конечных элементов с экспериментальными данными говорит о возможности использования модуля «Diffusion of diluted species» для моделирования кинетики высвобождения низкомолекулярных веществ из гидрогелей сложной геометрии, для которых механизм высвобождения будет преимущественно диффузионный. Для этого можно использовать оцененный эффективный коэффициент диффузии и известную концентрацию вещества.

Для демонстрации сформулируем следующую исследовательскую задачу: смоделировать кривую кумулятивного высвобождения препарата из гидрогеля на основе коллагена в условиях *in situ* биопечати на раневую поверхность.

В соответствии с разработанной методикой и положениями, лежащими в основе модели, необходимо выбрать исходные данные. Уже известно, что материалом, которым будет заполняться дефект, является фибриллярный коллаген, предварительно нагруженный фибриногеном. Хотя это относительно большая молекула используем его для оценки влияния заполнения дефекта на достижение необходимого количества вещества. Для численного моделирования процесса диффузии действующего вещества необходимо знать его коэффициент диффузии в гидрогеле данного состава при известной начальной концентрации.

Из литературных данных выбрали, что при диффузии фибриногена в гидрогеле на основе 3,5 фибриллярного коллагена коэффициент диффузии равен $4,6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ [154].

Допустим коэффициент диффузии в данной системе не зависит от концентрации фибриногена. Тогда численным решением уравнения диффузии смоделируем профиль высвобождения фибриногена из сферического коллагенового гидрогеля радиусом 2 мм

(Рисунок 69А). При изменении радиуса образца до 5 мм кривая кумулятивного высвобождения изменится как показано на Рисунке 69Б.

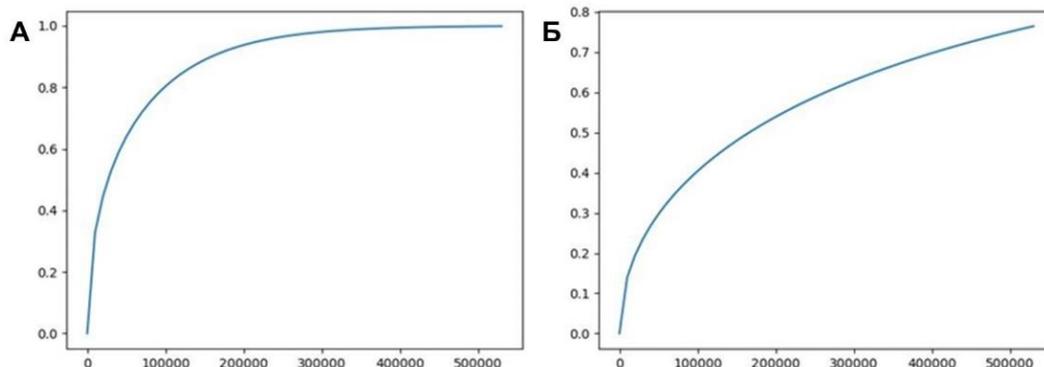


Рисунок 69 – Численное решение уравнения диффузии для гидрогелей радиусом 2 (А) и 5 (Б) мм ($D = 4,6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$)

Как видно из графика за время исследования – 150 часов, из гидрогеля диаметром 2 мм произошел полный выход фибриногена, однако при увеличении радиуса кумулятивное высвобождение составило лишь 80%.

Затем провели численное моделирование МКЭ для сфер разного диаметра (Рисунок 70), задав начальную концентрацию, например 25 моль/м³.

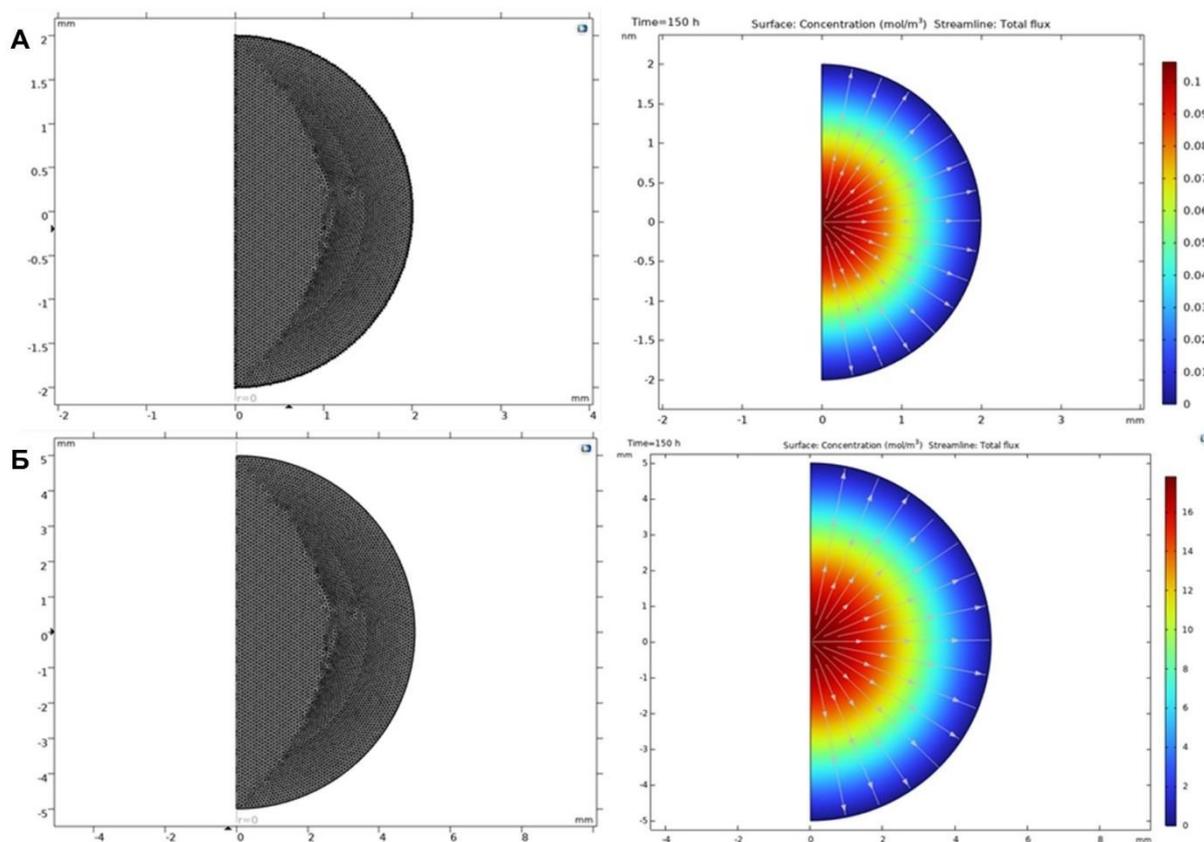


Рисунок 70 – Конечно-элементные численные модели образцов гидрогелей радиусом 2 мм (А) и 5 мм (Б)

Сравнили смоделированные кривые кумулятивного высвобождения для образцов двух размеров (Рисунок 71).

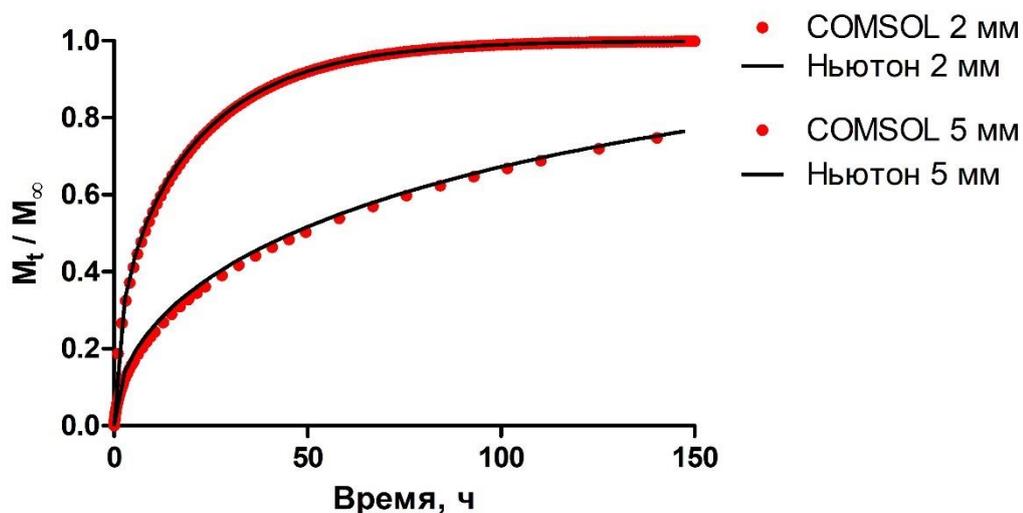


Рисунок 71 – Сравнение численного моделирования методом Ньютона и МКЭ для сферических образцов коллагена, нагруженного фибриногеном

Представим, что для осуществления *in situ* биопечати есть дефект кожи, который заполняют при помощи биопринтера по определенной траектории. Варианты заполнения представлены на Рисунке 72. Для того чтобы понять каким образом вещество будет высвобождаться в область дефекта численным моделированием МКЭ смоделировали кривую кумулятивного высвобождения.

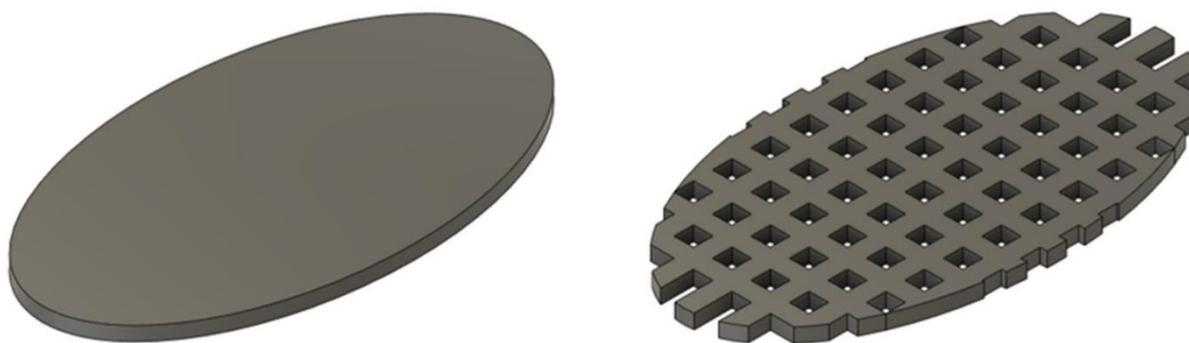


Рисунок 72 – Варианты заполнения дефекта гидрогелем

Перед моделированием приняли, что вещество равномерно распределено в гидрогеле, гидрогель находится в финальном виде и не требует никаких манипуляций после нанесения, после нанесения гидрогель со всех сторон помимо верхней поверхности соприкасается с физиологическими жидкостями, образующимися естественным путем при формировании раны, что обеспечивает выход препарата. При этом объем этой жидкости

считаем постоянным, не выходящим за пределы дефекта, это также поддерживается и при проведении операций для предотвращения высыхания гидрогелей путем закрытия раневой поверхности.

На Рисунке 73 представлены численные конечно-элементные модели вариантов заполнения дефекта.

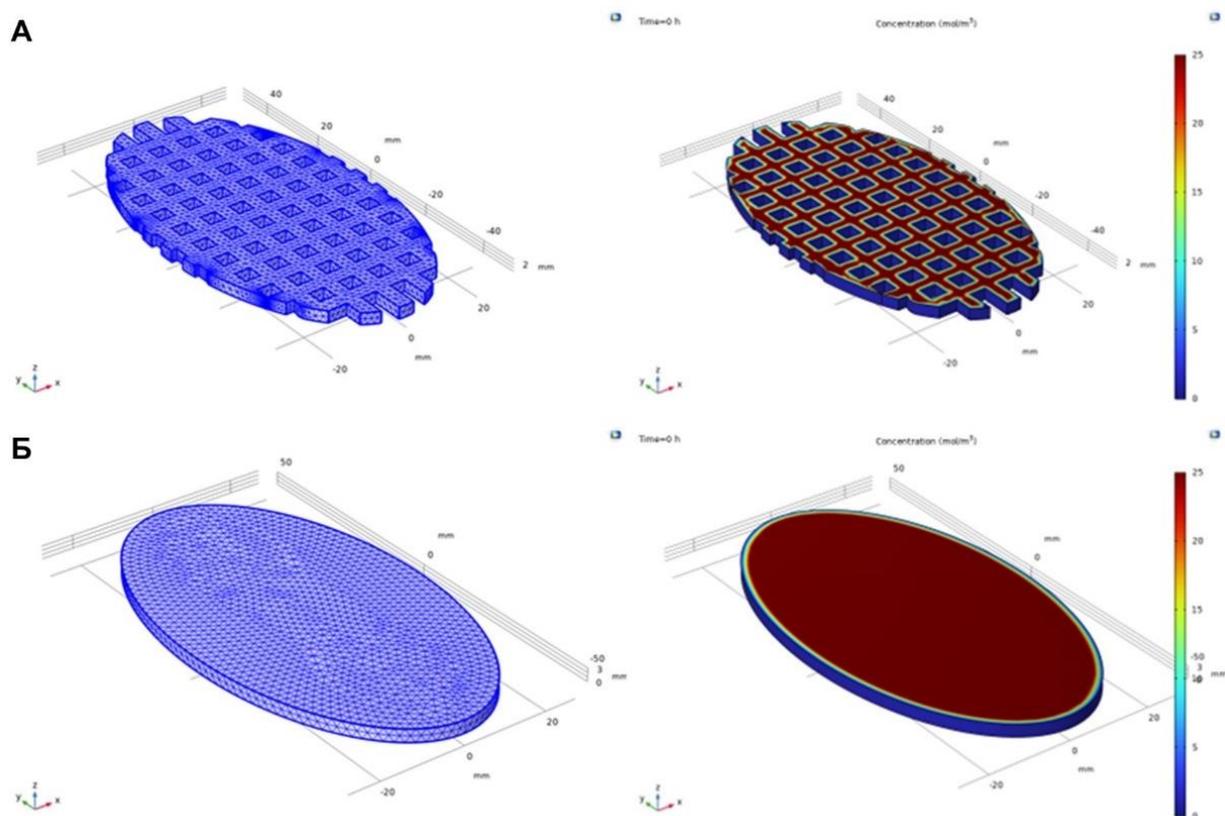


Рисунок 73 – Численные конечно-элементные модели высвобождения фибриногена из коллагенового гидрогеля при частичном (А) и сплошном (Б) заполнении

С использованием численных моделей было продемонстрировано как изменится кумулятивное высвобождение фибриногена при смене геометрии заполнения (Рисунок 74).

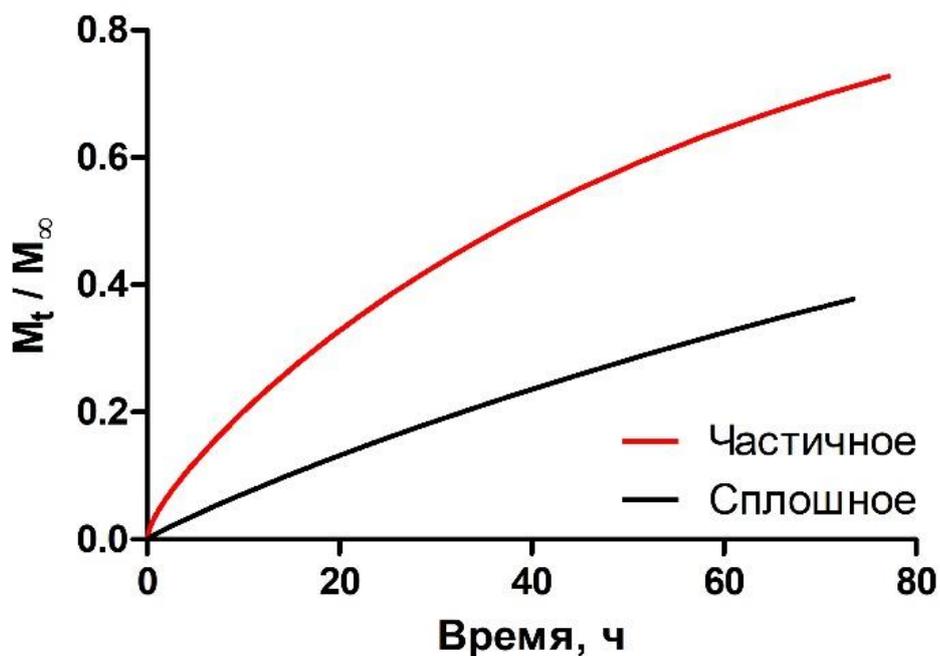


Рисунок 74 – Сравнение профилей кумулятивного высвобождения в зависимости от геометрии гидрогеля

Таким образом изменение заполнения дефекта может приводить к изменению профиля кумулятивного высвобождения, однако дозировка препарата может быть на одном уровне, что значит при одних сроках эксплуатации обеспечивается минимизация используемого количества геля и препарата.

Предложенная методика может быть полезна в исследовательских задачах, поскольку гидрогели демонстрируют хорошую сходимость экспериментальных данных, необходимо изготовить минимальное количество образцов, нагруженных препаратами разных концентраций. Если при высвобождении экспонента диффузии находится в значениях близких для диффузионного механизма, данные могут быть использованы для оценки эффективного коэффициента диффузии. В зависимости от наличия концентрационной зависимости кумулятивного высвобождения определяется необходимость учета этой зависимости при моделировании.

А моделирование высвобождения препаратов из конструкций сложной геометрии позволяет использовать минимальную эффективную концентрацию действующего вещества.

6.12 Выводы по Главе 6

Развиты модельные представления об абсорбции и высвобождении доксорубина из гидрогелей сферической геометрии состава Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂, в соответствии с которыми предложена обобщенная диффузионная модель абсорбции и высвобождения доксорубина, использованная для разработки методики экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии низкомолекулярных соединений в гидрогелях сферической геометрии и моделирования высвобождения низкомолекулярных соединений из гидрогелей сложной геометрии. В результате оценки эффективный коэффициент диффузии DOX в гидрогеле состава 1Alg05СМС составил $1,7 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$.

Преимуществами предложенной методики являются:

- 1) Простота подготовки образцов;
- 2) Простота сборки системы для изучения эффективного коэффициента диффузии;
- 3) Возможность моделирования высвобождения препарата из образцов любой геометрии;
- 4) Минимальное количество входных данных для образцов одного состава: радиус образцов, кинетика высвобождения.

Глава 7. Изучение кинетики высвобождения доксорубина из гибридной конструкции

Гибридные имплантируемые изделия могут обладать существенно улучшенными свойствами по сравнению с индивидуальными компонентами. В соответствии с предложенной концепцией гибридной конструкции для восстановления костных дефектов были изготовлены образцы гибридных конструкций на основе пористого СВМПЭ и СВМПЭ/Диоксид, заполненных гидрогелем состава Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂.

Для изготовления экспериментальных образцов гибридных конструкций пористые полимерные матрицы на основе СВМПЭ были нарезаны на блоки такого же размера и массы, как и для исследования адсорбции и кинетики высвобождения DOX пористыми полимерными матрицами. Затем пористые матрицы погружали в гелеобразующий раствор и подвергали центрифугированию на высоких оборотах с целью эффективного заполнения пор раствором на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. После чего пропитанные полимерные матрицы погружали в раствор сшивающего агента – хлорида кальция. Гибридные конструкции с полностью сшитым гидрогелевым компонентом выдерживали в дистиллированной воде, а затем заливали раствором доксорубина. В данной Главе была исследована зависимость высвобождения доксорубина из гибридной конструкции от свойств составляющих ее компонентов, применительно к разработанной конструкции механизм высвобождения DOX диффузионный.

7.1 Исследование сорбции доксорубина гибридной конструкцией

Экспериментальные образцы гибридных конструкций были исследованы на предмет сорбции DOX в соответствии с методикой разработанной для гидрогелевого компонента. На Рисунке 75 представлена схема, описывающая изучаемую систему.

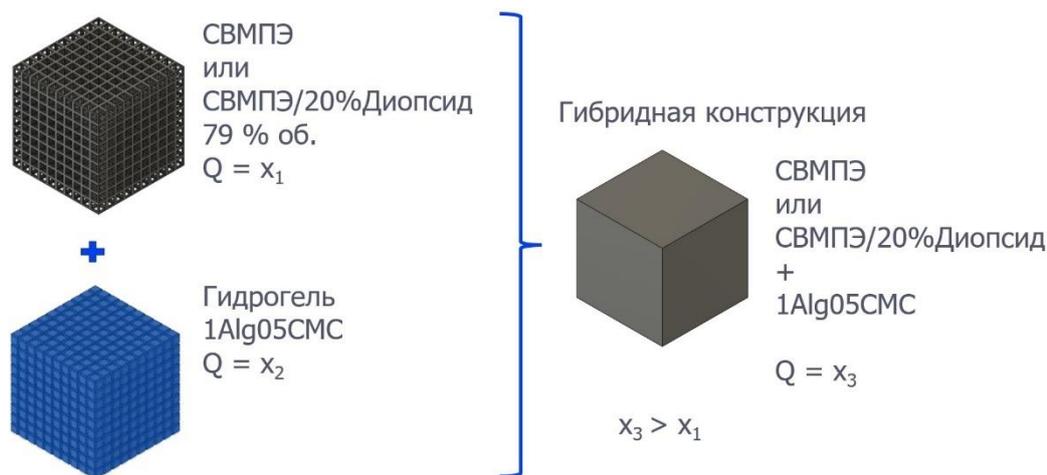


Рисунок 75 – Строение и свойства гибридной конструкции на основе пористой полимерной матрицы и гидрогеля

В соответствии со схемой пористый СВМПЭ и СВМПЭ/Диопсид способны адсорбировать количество DOX x_1 , а гидрогель – x_2 . Предполагается, что разработанная конструкция сможет обеспечить сорбцию количества DOX, превышающую сорбционную ёмкость пористых полимерных матриц.

В Таблице 21 приведены результаты оценки эффективности инкапсуляции доксорубина компонентами гибридной конструкции и вариантами гибридной конструкции.

Таблица 21 – Сравнение эффективности инкапсуляции DOX компонентами гибридной конструкции и вариантами гибридной конструкции

| Состав | ЕЕ, % |
|-------------------------|----------------|
| СВМПЭ | $11,3 \pm 3,1$ |
| СВМПЭ/Диопсид | $78,6 \pm 3,2$ |
| 1Alg05СМС | $93,2 \pm 1,5$ |
| СВМПЭ/1Alg05СМС | $89,9 \pm 0,5$ |
| СВМПЭ/Диопсид/1Alg05СМС | $94,3 \pm 0,2$ |

В соответствии с этими данными сорбционная ёмкость СВМПЭ при введении в поры гидрогеля увеличилась в 8 раз, а пористого композиционного материала СВМПЭ/Диопсид в 1,2 раза. Гидрогель имеет большой потенциал к абсорбции доксорубина, но его количество в порах пористой полимерной матрицы меньше, что ограничивает его сорбционные характеристики.

Согласно полученным данным эффективность инкапсуляции увеличилась при введении гидрогеля, что соответствует предложенной концепции. А нагрузка препарата в гибриде увеличилась в 5,9 раз по сравнению с гидрогелем и в 1,3 раза по сравнению с пористым СВМПЭ(УТЕС)/Диопсид. Разработанный гибридный носитель лекарственных

средств по сути является системой, где гидрогель помещен в пористый биоинертный полимер. Рассматривая начальные этапы высвобождения лекарства модель будет применима и к биорезорбируемым полимерам. Предельное время высвобождения лекарства можно принять как одно из ограничений изучаемой системы.

7.2 Экспериментальное изучение кинетики высвобождения доксорубина из гибридной конструкции

Была исследована кинетика высвобождения DOX из нагруженных DOX гибридов на основе СВМПЭ и СВМПЭ/Диоксид. Нагруженные DOX гибридные конструкции были исследованы в PBS в течение месяца. На Рисунке 76 представлены кривые кумулятивного высвобождения. Из этих данных следует, что наибольшее влияние на кумулятивное высвобождение оказывает состав полимерной матрицы.

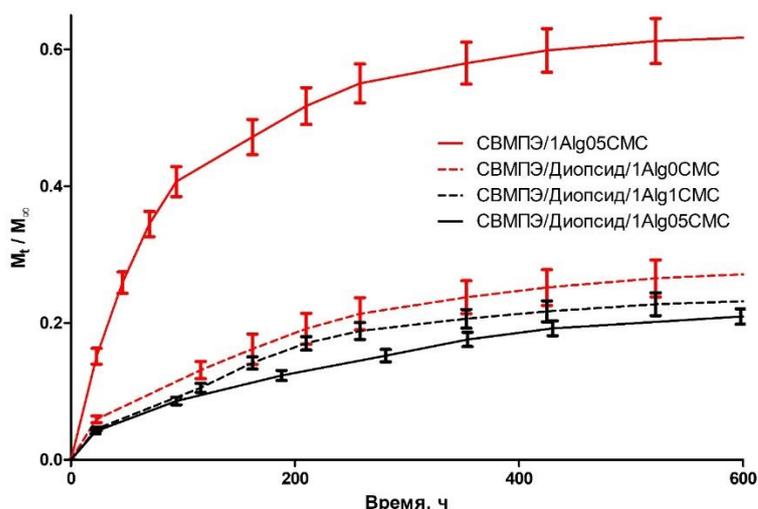


Рисунок 76 – Экспериментальные кривые кумулятивного высвобождения DOX из гибридных конструкций разного состава

При этом состав гидрогеля не оказал влияния на высвобождение DOX, хотя гидрогели, нагруженные DOX, демонстрировали сильную зависимость высвобождения от содержания Na-СМС. Возможные причины этого станут одним из положений модели высвобождения DOX из гибридной конструкции.

Влияние состава полимерной основы гибрида на сорбцию имеет ту же зависимость, как и при сравнении кинетики высвобождения DOX из пористых полимерных матриц. На Рисунке 77 приведены кривые кумулятивного высвобождения доксорубина,

выраженные в единицах массы, из гибридных конструкций в сравнении с пористыми полимерными матрицами.

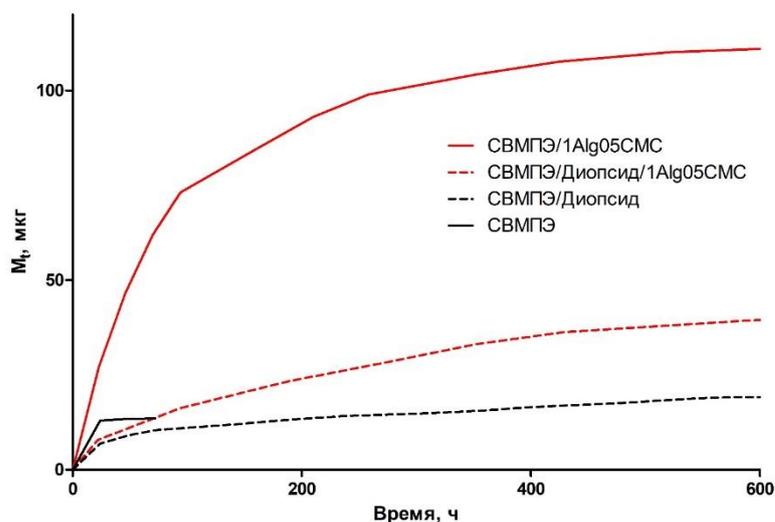


Рисунок 77 – Экспериментальные кривые кумулятивного высвобождения DOX из гибридов разного состава

Судя по кривым кумулятивного высвобождения DOX, выраженного в мкг, можно сделать вывод о наличии взрывного высвобождения на начальном этапе, которое обусловлено пористой полимерной матрицей. Это следует из схожих значений высвобождаемого DOX между СВМПЭ и гибридом на основе СВМПЭ и аналогично для СВМПЭ/Диопсид.

7.3 Модель высвобождения доксорубина из гибридной конструкции

Разработанная мультикомпонентная система может быть описана с точки зрения объемных долей компонентов (7.1, 7.2):

$$\phi_p + \phi_w + \phi_{DOX} + \phi_{СВМПЭ} = 1 \quad (7.1)$$

$$\phi_p + \phi_w + \phi_{DOX} = \phi, \quad (7.2)$$

где ϕ – объемная пористость СВМПЭ или СВМПЭ/Диопсид;

ϕ_p – объемная доля полимерной составляющей гидрогеля;

ϕ_w – объемная доля воды;

ϕ_{DOX} – объемная доля DOX;

$\phi_{СВМПЭ}$ – объемная доля СВМПЭ или СВМПЭ/Диопсид в гибриде.

На основе полученных экспериментальных данных предложена модель диффузионно-контролируемого высвобождения доксорубина из гибридной конструкции (Рисунок 78).

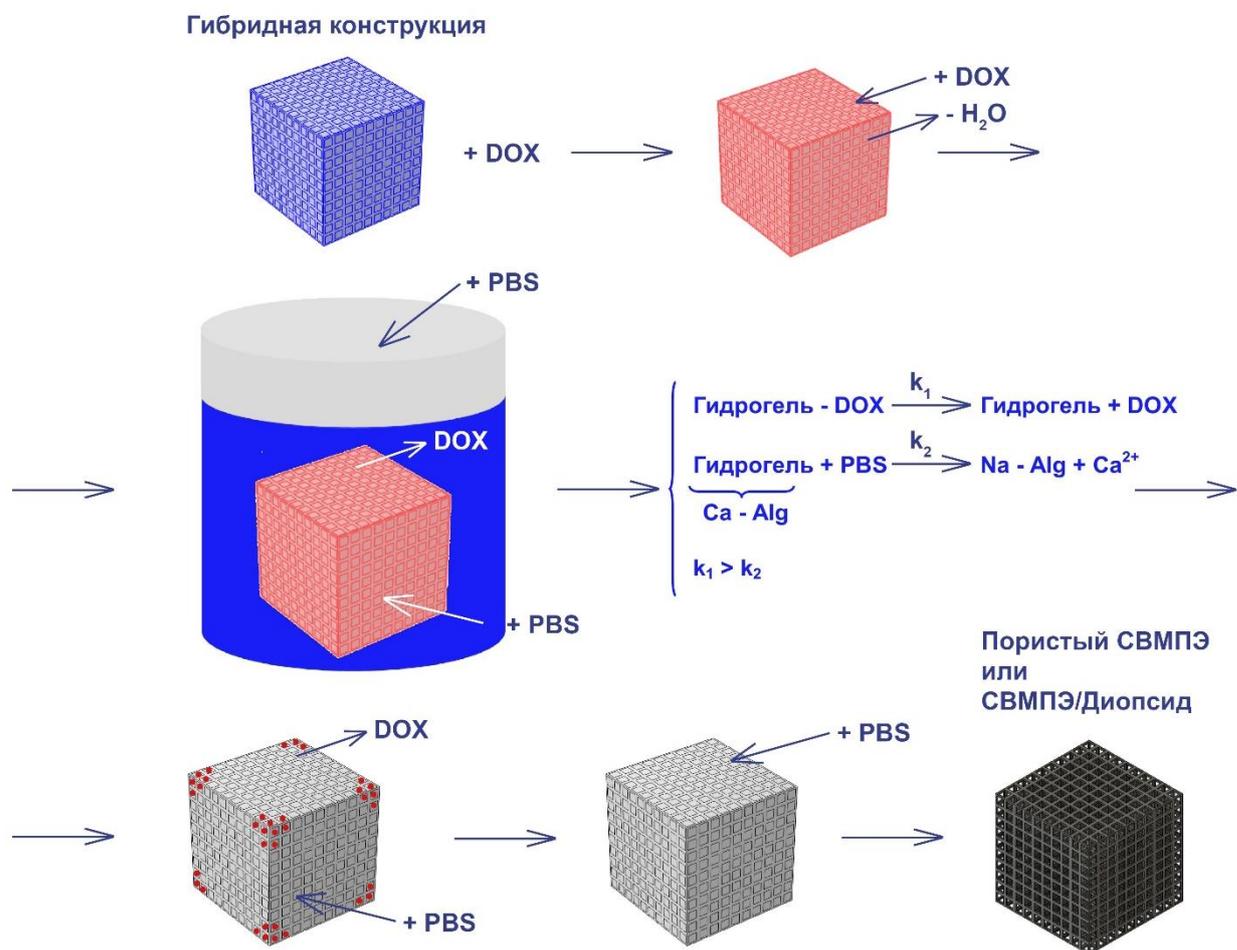


Рисунок 78 – Модель диффузионно-контролируемого высвобождения доксорубина из гибридной конструкции

Согласно предложенной модели, высвобождение DOX из рассматриваемых гибридных конструкций регулируется диффузией. В начале аналогично абсорбции DOX гидрогелями происходит нагрузка препаратом гибридной конструкции, при этом из нее выходит вода, затем образец помещается в PBS, где из конструкции выходят молекулы DOX, а входит PBS. Однако учитывая исчезновение зависимости абсорбции от состава гидрогеля можно предположить, что скорость процесса высвобождения DOX превышает скорость абсорбции PBS, в связи с чем наблюдается сохранение гидрогеля внутри пористого полимера, после выхода DOX ускоряется проникновение PBS в гибриды и соответствующее разрушение гидрогелевого компонента. По окончании этих процессов ожидается, что на месте имплантации останется изделие в виде СВМПЭ или СВМПЭ/Диоксид.

7.4 Преимущества гибридной конструкции перед индивидуальными компонентами

На основе концепции гибридной конструкции для восстановления костных дефектов предложена модель высвобождения лекарственного препарата на примере доксорубицина. Несмотря на наличие зависимости кумулятивного высвобождения от содержания Na-СМС в гидрогеле, состав гидрогеля не оказал влияния на высвобождение доксорубицина из гибридной конструкции. Однако состав полимерной основы гибрида имеет ту же зависимость, как и при сравнении кинетики высвобождения из пористых полимерных матриц.

Преимуществами гибридной конструкции перед индивидуальными компонентами являются: введение гидрогеля привело к увеличению сорбционной ёмкости пористых полимерных матриц на основе СВМПЭ и СВМПЭ/Диопсид, эффективной инкапсуляции доксорубицина, увеличению кумулятивного высвобождения доксорубицина из полимерных матриц; при этом полимерная матрица защищала гидрогель от разрушения препятствуя свободному движению среды и механическому разрушению, позволяла контролировать высвобождение путем использования различных наполнителей, также затрудненное перемещение жидкости позволило не учитывать набухание гидрогелей, приводя к отсутствию различия в кумулятивном высвобождении по сравнению с гидрогелями как самостоятельными носителями доксорубицина.

Выводы

1. Предложена обобщенная диффузионная модель высвобождения доксорубина из гидрогеля сферической геометрии, процессы массопереноса в которой описываются моделями ограничения абсорбционной ёмкости и концентрационной зависимости высвобождения, на примере гидрогеля на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы;

2. Проведено численное моделирование высвобождения доксорубина из гидрогеля сферической геометрии, результаты моделирования хорошо согласуются с численным решением уравнения диффузии и экспериментальными данными. В результате предложена методика экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии низкомолекулярных соединений в гидрогелях сферической геометрии, механизмом высвобождения лекарств из которых является диффузия. Также предложена методика моделирования кинетики высвобождения низкомолекулярного лекарственного средства из гидрогелей сложной геометрии;

3. Изучены сорбция и кинетика высвобождения доксорубина из всех компонентов и гибридной конструкции, по этим результатам оценены содержание и эффективность инкапсуляции доксорубина, константы высвобождения. Полученные результаты согласуются с результатами по адсорбции и высвобождению белка ВМР-2 из диоксида и пористых полимерных матриц и помогают в выборе эффективных носителей для применения в биомедицинской инженерии;

4. Разработан комплекс материалов (диоксид, пористые материалы на основе СВМПЭ/Диоксид, гидрогели Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂, гибридная конструкция) для создания функционализированных препаратами имплантируемых изделий для восстановления костных дефектов;

5. Предложена концепция гибридной конструкции для восстановления костных дефектов. Разработана методика для получения экспериментальных образцов гибридных конструкций. На основе экспериментальных данных предложена модель высвобождения препарата из гибридной конструкции – носителя доксорубина.

Список литературы

1. Repanas A., Andriopoulou S., Glasmacher B. The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2016. – V. 31. – P. 137-146.
2. Langer R. New methods of drug delivery // *Science*. – 1990. – V. 249. – №. 4976. – P. 1527-1533.
3. Hami Z. A brief review on advantages of nano-based drug delivery systems // *Annals of Military and Health Sciences Research*. – 2021. – V. 19. – №. 1.
4. Talevi, A., Bellera, C.L. Drug Absorption. In: *The ADME Encyclopedia*. Springer, Cham. – 2021. – P. 1-7
5. Liu G. et al. A review on drug delivery system for tumor therapy // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – V. 12. – P. 735446.
6. Saha R. N. et al. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy // *Molecular membrane biology*. – 2010. – V. 27. – №. 7. – P. 215-231.
7. Yu X. et al. Design of nanoparticle-based carriers for targeted drug delivery // *Journal of nanomaterials*. – 2016. – V. 2016.
8. Zhuang J., Yu Y., Lu R. Mesoporous silica nanoparticles as carrier to overcome bacterial drug resistant barriers // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2023. – V. 631. – P. 122529.
9. Chandrakala V., Aruna V., Angajala G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: Current challenges and perspectives in drug delivery systems // *Emergent Materials*. – 2022. – V. 5. – №. 6. – P. 1593-1615.
10. Kapoor D. et al. Metallic nanoparticles in cancer: Types, green synthesis, applications, tumor microenvironment and toxicity considerations // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2023. – P. 105307.
11. Betancourt S. N. M. et al. Metallic nanoparticles-based drug delivery for pancreatic cancer // *Recent Advances in Nanocarriers for Pancreatic Cancer Therapy*. – Academic Press, 2024. – P. 213-237.
12. Liu Z. et al. Chitosan-based drug delivery systems: Current strategic design and potential application in human hard tissue repair // *European polymer journal*. – 2022. – V. 166. – P. 110979.
13. Guimarães D., Cavaco-Paulo A., Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications // *International journal of pharmaceutics*. – 2021. – V. 601. – P. 120571.

14. Rommasi F., Esfandiari N. Liposomal nanomedicine: applications for drug delivery in cancer therapy // *Nanoscale Research Letters*. – 2021. – V. 16. – №. 1. – P. 95.
15. Wang J. et al. Dendrimer-based drug delivery systems: History, challenges, and latest developments // *Journal of Biological Engineering*. – 2022. – V. 16. – №. 1. – P. 18.
16. Pan J. et al. Dendrimers for drug delivery purposes // *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*. – Elsevier, 2020. – P. 201-242.
17. Rajani C. et al. Cancer-targeted chemotherapy: Emerging role of the folate anchored dendrimer as drug delivery nanocarrier // *Pharmaceutical applications of dendrimers*. – Elsevier, 2020. – P. 151-198.
18. Chinnappan M. et al. Exosomes as drug delivery vehicle and contributor of resistance to anticancer drugs // *Cancer letters*. – 2020. – V. 486. – P. 18-28.
19. Liang Y. et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery // *Theranostics*. – 2021. – V. 11. – №. 7. – P. 3183.
20. Sun Y. et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes for drug delivery // *Stem cell research & therapy*. – 2021. – V. 12. – P. 1-15.
21. Stielow M. et al. The Bioavailability of Drugs—The Current State of Knowledge // *Molecules*. – 2023. – V. 28. – №. 24. – P. 8038.
22. Tu L. et al. Ultrasound-controlled drug release and drug activation for cancer therapy // *Exploration*. – 2021. – V. 1. – №. 3. – P. 20210023.
23. Kasiński A. et al. Smart hydrogels—synthetic stimuli-responsive antitumor drug release systems // *International journal of nanomedicine*. – 2020. – P. 4541-4572.
24. Stevenson C. L., Santini Jr J. T., Langer R. Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – V. 64. – №. 14. – P. 1590-1602.
25. Chappel E. Implantable drug delivery devices // *Drug Delivery Devices and Therapeutic Systems*. – Academic Press, 2021. – P. 129-156.
26. Mohapatra S. K., Dash A. K. Special Dosage Forms and Drug Delivery Systems // *Pharmaceutics*. – Academic Press, 2024. – P. 393-436.
27. Intravaia J. T. et al. Smart orthopedic biomaterials and implants // *Current Opinion in Biomedical Engineering*. – 2023. – V. 25. – P. 100439.
28. Spennato P. et al. Hydroxyapatite ceramic implants for cranioplasty in children: a retrospective evaluation of clinical outcome and osteointegration // *Child's Nervous System*. – 2020. – V. 36. – P. 551-558.
29. Manzoor F. et al. 3D printed strontium and zinc doped hydroxyapatite loaded PEEK for craniomaxillofacial implants // *Polymers*. – 2022. – V. 14. – №. 7. – P. 1376.

30. Avila J. D. et al. Hydroxyapatite reinforced Ti6Al4V composites for load-bearing implants // *Acta biomaterialia*. – 2021. – V. 123. – P. 379-392.
31. Adamski R., Siuta D. Mechanical, structural, and biological properties of chitosan/hydroxyapatite/silica composites for bone tissue engineering // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – №. 7. – P. 1976.
32. George S. M. et al. Multifunctional hydroxyapatite composites for orthopedic applications: a review // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2022. – V. 8. – №. 8. – P. 3162-3186.
33. Chamrad J., Marcián P., Cizek J. Beneficial osseointegration effect of hydroxyapatite coating on cranial implant–FEM investigation // *Plos one*. – 2021. – V. 16. – №. 7. – P. e0254837.
34. Baheti W. et al. Graphene/hydroxyapatite coating deposit on titanium alloys for implant application // *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. – 2023. – V. 21. – P. 22808000221148104.
35. Vorndran E. et al. Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier // *Acta biomaterialia*. – 2013. – V. 9. – №. 12. – P. 9558-9567.
36. Scialla S. et al. Trends in managing cardiac and orthopaedic device-associated infections by using therapeutic biomaterials // *Polymers*. – 2021. – V. 13. – №. 10. – P. 1556.
37. Young B. C. et al. Microbial Persistence, Replacement and Local Antimicrobial Therapy in Recurrent Bone and Joint Infection // *Antibiotics*. – 2023. – V. 12. – №. 4. – P. 708.
38. King D., McGinty S. Assessing the potential of mathematical modelling in designing drug-releasing orthopaedic implants // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – V. 239. – P. 49-61.
39. Korelidou A. et al. 3D-printed reservoir-type implants containing poly (lactic acid)/poly (caprolactone) porous membranes for sustained drug delivery // *Biomaterials Advances*. – 2022. – V. 139. – P. 213024.
40. Chen X. et al. Antibacterial coatings on orthopedic implants // *Materials Today Bio*. – 2023. – V. 19. – P. 100586.
41. Joshi M. U. et al. Current state of art smart coatings for orthopedic implants: A comprehensive review // *Smart Materials in Medicine*. – 2023.
42. Djošić M. et al. Hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol)/chitosan coating with gentamicin for orthopedic implants // *Materials Chemistry and Physics*. – 2023. – V. 303. – P. 127766.

43. Kumeria T. et al. Real-time and in situ drug release monitoring from nanoporous implants under dynamic flow conditions by reflectometric interference spectroscopy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2013. – V. 5. – №. 12. – P. 5436-5442.
44. He W. et al. Drug delivery to macrophages: a review of targeting drugs and drug carriers to macrophages for inflammatory diseases // *Advanced drug delivery reviews*. – 2020. – V. 165. – P. 15-40.
45. Huo S. et al. Bone infection site targeting nanoparticle-antibiotics delivery vehicle to enhance treatment efficacy of orthopedic implant related infection // *Bioactive Materials*. – 2022. – V. 16. – P. 134-148.
46. Sumathra M. et al. In vivo assessment of a hydroxyapatite/ κ -carrageenan–maleic anhydride–casein/doxorubicin composite-coated titanium bone implant // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2020. – V. 6. – №. 3. – P. 1650-1662.
47. Chen L. et al. Growth factor and its polymer scaffold-based delivery system for cartilage tissue engineering // *International journal of nanomedicine*. – 2020. – P. 6097-6111.
48. Rodríguez-Merchán E. C., Davidson D. J., Liddle A. D. Recent strategies to combat infections from biofilm-forming bacteria on orthopaedic implants // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 19. – P. 10243.
49. Wall V. et al. Controlling antibiotic release from polymethylmethacrylate bone cement // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – №. 1. – P. 26.
50. Luo S. et al. A dual PMMA/calcium sulfate carrier of vancomycin is more effective than PMMA-vancomycin at inhibiting *Staphylococcus aureus* growth in vitro // *FEBS Open Bio*. – 2020. – V. 10. – №. 4. – P. 552-560.
51. Pahlevanzadeh F. et al. Mechanical property, antibacterial activity and cytocompatibility of a PMMA-based bone cement loaded with clindamycin for orthopaedic surgeries // *Materials Technology*. – 2021. – V. 36. – №. 9. – P. 564-573.
52. Magill E. et al. Solid implantable devices for sustained drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2023. – P. 114950.
53. Yang W. W., Pierstorff E. Reservoir-based polymer drug delivery systems // *Journal of laboratory automation*. – 2012. – V. 17. – №. 1. – P. 50-58.
54. Naser Y. A. et al. Hydrogel-forming microarray patches with solid dispersion reservoirs for transdermal long-acting microdepot delivery of a hydrophobic drug // *Journal of Controlled Release*. – 2023. – V. 356. – P. 416-433.
55. Borandeh S. et al. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing // *Advanced drug delivery reviews*. – 2021. – V. 173. – P. 349-373.

56. Farokhi M. et al. Functionalized silk fibroin nanofibers as drug carriers: Advantages and challenges // *Journal of Controlled Release*. – 2020. – V. 321. – P. 324-347.
57. Xie Y., Hillmyer M. A. Nanostructured polymer monoliths for biomedical delivery applications // *ACS Applied Bio Materials*. – 2020. – V. 3. – №. 5. – P. 3236-3247.
58. Pudło W. et al. Hierarchical silica monolithic tablets as novel carriers for drug delivery // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2019. – V. 141. – P. 12-20.
59. Hua D. et al. Concentration gradients in material sciences: methods to design and biomedical applications // *Advanced Functional Materials*. – 2021. – V. 31. – №. 15. – P. 2009005.
60. Roussenova M. et al. Free volume, molecular mobility and polymer structure: Towards the rational design of multi-functional materials // *Acta Physica Polonica A*. – 2014. – V. 125. – №. 3. – P. 801-805.
61. Vrentas J. S., Vrentas C. M., Duda J. L. Comparison of free-volume theories // *Polymer journal*. – 1993. – V. 25. – №. 1. – P. 99-101.
62. Papadopoulou V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms // *International journal of pharmaceutics*. – 2006. – V. 309. – №. 1-2. – P. 44-50.
63. Thomas D. et al. Theoretical and experimental studies on theophylline release from hydrophilic alginate nanoparticles // *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – V. 5. – P. 1-7.
64. Mathematical models of drug release. In: Elsevier eBooks. – 2015. – P. 63–86.
65. Ritger P. L., Peppas N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs // *Journal of controlled release*. – 1987. – V. 5. – №. 1. – P. 23-36.
66. Boso D. P. et al. Drug delivery: Experiments, mathematical modelling and machine learning // *Computers in biology and medicine*. – 2020. – V. 123. – P. 103820.
67. Paarakh M. P. et al. Release kinetics—concepts and applications // *Int. J. Pharm. Res. Technol*. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 12-20.
68. Elmas A. et al. Mathematical modelling of drug release // *Research on Engineering Structures and Materials*. – 2020. – V. 6. – №. 4.
69. Fu Y., Kao W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems // *Expert opinion on drug delivery*. – 2010. – V. 7. – №. 4. – P. 429-444.

70. Main mechanisms to control the drug release. In: Elsevier eBooks. – 2015. – P. 37–62.
71. Herdiana Y. et al. Drug release study of the chitosan-based nanoparticles // *Heliyon*. – 2022. – V. 8. – №. 1.
72. Sethi S. et al. Cross-linked xanthan gum–starch hydrogels as promising materials for controlled drug delivery // *Cellulose*. – 2020. – V. 27. – P. 4565-4589.
73. Yuan X. et al. Preparation of carboxymethylchitosan and alginate blend membrane for diffusion-controlled release of diclofenac diethylamine // *Journal of Materials Science & Technology*. – 2021. – V. 63. – P. 210-215.
74. Suh M. S. et al. Effect of implant formation on drug release kinetics of in situ forming implants // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – V. 592. – P. 120105.
75. Geraili A., Mequanint K. Systematic studies on surface erosion of photocrosslinked polyanhydride tablets and data correlation with release kinetic models // *Polymers*. – 2020. – V. 12. – №. 5. – P. 1105.
76. AKTAŞ N. et al. Developing poly (Agar-co-Glycerol-co-Thyme Oil) based organo-hydrogels for the controlled drug release applications. – 2021.
77. Wang Z., Shmeis R. A. Dissolution controlled drug delivery systems // *Design of controlled release drug delivery systems*. United States: McGraw-Hill. – 2006. – P. 139-72.
78. Adepu S., Ramakrishna S. Controlled drug delivery systems: current status and future directions // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – №. 19. – P. 5905.
79. Ogueri K. S., Shamblin S. L. Osmotic-controlled release oral tablets: Technology and functional insights // *Trends in Biotechnology*. – 2022. – V. 40. – №. 5. – P. 606-619.
80. Siepmann J., Siepmann F. Modeling of diffusion controlled drug delivery // *Journal of controlled release*. – 2012. – V. 161. – №. 2. – P. 351-362.
81. Ali A. et al. A pH-responsive, biocompatible, and non-toxic citric acid cross-linked polysaccharide-based hydrogel from *Salvia spinosa* L. offering zero-order drug release // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2022. – V. 69. – P. 103144.
82. Liu L. et al. Carboxylated cellulose-based composite aerogel with double filling structure for sustained drug release // *Industrial Crops and Products*. – 2024. – V. 210. – P. 118126.
83. Cerea M. et al. Oral hydrophilic matrices having non uniform drug distribution for zero-order release: A literature review // *Journal of controlled release*. – 2020. – V. 325. – P. 72-83.
84. Charoenying T. et al. Development of a novel tablet-shaped floating 3D-printed device with adjustable floating time as floating drug delivery systems provided zero-order

release kinetics // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2023. – V. 84. – P. 104506.

85. Mir A. et al. Synthesis and characterization of pH-responsive conducting polymer/Na-alginate/gelatin based composite hydrogels for sustained release of amoxicillin drug // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – V. 252. – P. 126015.

86. Rehman Q. et al. Role of kinetic models in drug stability // *Drug Stability and Chemical Kinetics*. – 2020. – P. 155-165.

87. Talevi A., Ruiz M.E. Higuchi model. In: Springer eBooks. – 2021. – P. 1–5.

88. Trucillo P. Drug carriers: A review on the most used mathematical models for drug release // *Processes*. – 2022. – V. 10. – №. 6. – P. 1094.

89. Siepmann J., Peppas N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – V. 64. – P. 163-174.

90. Maderuelo C., Zarzuelo A., Lanao J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices // *Journal of controlled release*. – 2011. – V. 154. – №. 1. – P. 2-19.

91. Parmar A., Sharma S. Engineering design and mechanistic mathematical models: standpoint on cutting edge drug delivery // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2018. – V. 100. – P. 15-35.

92. Zhou Y., Wu C., Chang J. Bioceramics to regulate stem cells and their microenvironment for tissue regeneration // *Materials Today*. – 2019. – V. 24. – P. 41-56.

93. Davaie S., Hooshmand T., Ansarifard S. Different types of bioceramics as dental pulp capping materials: A systematic review // *Ceramics International*. – 2021. – V. 47. – №. 15. – P. 20781-20792.

94. Vallet-Regí M. et al. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability // *Progress in Solid State Chemistry*. – 2008. – V. 36. – №. 3. – P. 163-191.

95. Zhao C. et al. Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review // *Bioactive materials*. – 2022. – V. 18. – P. 383-398.

96. Mashak A., Bazraee S., Mobedi H. Advances in drug delivery and biomedical applications of hydroxyapatite-based systems: a review // *Bulletin of Materials Science*. – 2022. – V. 45. – №. 4. – P. 183.

97. Huang S. M. et al. Advances of hydroxyapatite Hybrid organic composite used as drug or protein carriers for biomedical applications: A review // *Polymers*. – 2022. – V. 14. – №. 5. – P. 976.

98. Kumar R., Mohanty S. Hydroxyapatite: a versatile bioceramic for tissue engineering application // *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. – 2022. – V. 32. – №. 12. – P. 4461-4477.
99. Oliveira T. M. et al. Calcium phosphate-based bioceramics in the treatment of osteosarcoma: drug delivery composites and magnetic hyperthermia agents // *Frontiers in Medical Technology*. – 2021. – V. 3. – P. 700266.
100. DileepKumar V. G. et al. A review on the synthesis and properties of hydroxyapatite for biomedical applications // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2022. – V. 33. – №. 2. – P. 229-261.
101. Lara-Ochoa S., Ortega-Lara W., Guerrero-Beltrán C. E. Hydroxyapatite nanoparticles in drug delivery: physicochemistry and applications // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. – №. 10. – P. 1642.
102. Guo L. et al. The role of natural polymers in bone tissue engineering // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – V. 338. – P. 571-582.
103. Kovylin R. S., Aleynik D. Y., Fedushkin I. L. Modern porous polymer implants: synthesis, properties, and application // *Polymer Science, Series C*. – 2021. – V. 63. – P. 29-46.
104. Mohammadi H. et al. How does scaffold porosity conduct bone tissue regeneration? // *Advanced Engineering Materials*. – 2021. – V. 23. – №. 10. – P. 2100463.
105. Sharma V. et al. Six decades of UHMWPE in reconstructive surgery // *International Materials Reviews*. – 2023. – V. 68. – №. 1. – P. 46-81.
106. Spece H., Yarbrough R. V., Kurtz S. M. In Vivo Performance of Vitamin E Stabilized Polyethylene Implants for Total Hip Arthroplasty: A Review // *The Journal of Arthroplasty*. – 2023. – V. 38. – №. 5. – P. 970-979.
107. Senra M. R., Marques M. F. V. Synthetic polymeric materials for bone replacement // *Journal of Composites Science*. – 2020. – V. 4. – №. 4. – P. 191.
108. Idumah C. I. Progress in polymer nanocomposites for bone regeneration and engineering // *Polymers and Polymer Composites*. – 2021. – V. 29. – №. 5. – P. 509-527.
109. Senatov F. et al. Osseointegration evaluation of UHMWPE and PEEK-based scaffolds with BMP-2 using model of critical-size cranial defect in mice and push-out test // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2021. – V. 119. – P. 104477.
110. Senatov F. et al. Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – V. 111. – P. 110750.

111. Zhou Z. et al. Polymer-based porous microcarriers as cell delivery systems for applications in bone and cartilage tissue engineering // *International Materials Reviews*. – 2021. – V. 66. – №. 2. – P. 77-113.
112. Venugopal J., Ramakrishna S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2005. – V. 125. – P. 147-157.
113. Sun M. H. et al. Applications of hierarchically structured porous materials from energy storage and conversion, catalysis, photocatalysis, adsorption, separation, and sensing to biomedicine // *Chemical society reviews*. – 2016. – V. 45. – №. 12. – P. 3479-3563.
114. Mansour F. R. et al. Porogens and porogen selection in the preparation of porous polymer monoliths // *Journal of separation science*. – 2020. – V. 43. – №. 1. – P. 56-69.
115. Shiohara A., Prieto-Simon B., Voelcker N. H. Porous polymeric membranes: Fabrication techniques and biomedical applications // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2021. – V. 9. – №. 9. – P. 2129-2154.
116. Pattnaik A. et al. Designing of gradient scaffolds and their applications in tissue regeneration // *Biomaterials*. – 2023. – V. 296. – P. 122078.
117. Kesharwani P. et al. Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2021. – V. 66. – P. 102914.
118. Webber M. J., Pashuck E. T. (Macro) molecular self-assembly for hydrogel drug delivery // *Advanced drug delivery reviews*. – 2021. – V. 172. – P. 275-295.
119. Lin C. C., Metters A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling // *Advanced drug delivery reviews*. – 2006. – V. 58. – №. 12-13. – P. 1379-1408.
120. Teixeira M. O. et al. Pullulan hydrogels as drug release platforms in biomedicine // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2023. – V. 89. – P. 105066.
121. Ye J. et al. Advances in hydrogels based on dynamic covalent bonding and prospects for its biomedical application // *European Polymer Journal*. – 2020. – V. 139. – P. 110024.
122. Li J., Mooney D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery // *Nature Reviews Materials*. – 2016. – V. 1. – №. 12. – P. 1-17.
123. Andrade del Olmo J, Sáez Martínez V, Pérez González R, María Alonso J. Sustained Drug Release from Biopolymer-Based Hydrogels and Hydrogel Coatings [Internet]. Hydrogels - From Tradition to Innovative Platforms with Multiple Applications. IntechOpen; 2023. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103946>.

124. Aswathy S. H., Narendrakumar U., Manjubala I. Commercial hydrogels for biomedical applications // *Heliyon*. – 2020. – V. 6. – №. 4.
125. Thang N. H., Chien T. B., Cuong D. X. Polymer-based hydrogels applied in drug delivery: An overview // *Gels*. – 2023. – V. 9. – №. 7. – P. 523.
126. Young M. E., Carroad P. A., Bell R. L. Estimation of diffusion coefficients of proteins // *Biotechnology and bioengineering*. – 1980. – V. 22. – №. 5. – P. 947-955.
127. Ganji F., Vasheghani F. S., Vasheghani F. E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. – 2010. – P. 375-398.
128. Xu Y. et al. Mathematical modeling and finite element simulation of slow release of drugs using hydrogels as carriers with various drug concentration distributions // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – V. 102. – №. 5. – P. 1532-1543.
129. Rezk A. I. et al. Drug release and kinetic models of anticancer drug (BTZ) from a pH-responsive alginate polydopamine hydrogel: Towards cancer chemotherapy // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – V. 141. – P. 388-400.
130. Owh C. et al. Bottom-up design of hydrogels for programmable drug release // *Biomaterials Advances*. – 2022. – V. 141. – P. 213100.
131. Chyzy A., Tomczykowa M., Plonska-Brzezinska M. E. Hydrogels as potential nano-, micro- and macro-scale systems for controlled drug delivery // *Materials*. – 2020. – V. 13. – №. 1. – P. 188.
132. Chatterjee S. et al. Advances in chemistry and composition of soft materials for drug releasing contact lenses // *RSC advances*. – 2020. – V. 10. – №. 60. – P. 36751-36777.
133. Bansal M. et al. Conducting polymer hydrogels for electrically responsive drug delivery // *Journal of controlled release*. – 2020. – V. 328. – P. 192-209.
134. Vázquez-González M., Willner I. Stimuli-responsive biomolecule-based hydrogels and their applications // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – V. 59. – №. 36. – P. 15342-15377.
135. Moorcroft S. C. T. et al. Nanoparticle-loaded hydrogel for the light-activated release and photothermal enhancement of antimicrobial peptides // *ACS applied materials & interfaces*. – 2020. – V. 12. – №. 22. – P. 24544-24554.
136. Kan Y. et al. Collagen-based Composite and Hybrid Bone Implant Materials: Structure and Property Characterization // *Lecture Notes in Engineering and Computer Science: Proceedings of the World Congress on Engineering*. – 2019. – P. 356-364.
137. Arcos D., Vallet-Regí M. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – V. 8. – №. 9. – P. 1781-1800.

138. Khatun H. et al. Current advancements of hybrid coating on Mg alloys for medical applications // *Results in Engineering*. – 2023. – P. 101162.
139. Bulygina I. et al. Biomimetic scaffold fabricated with a mammalian trabecular bone template // *Polymer degradation and stability*. – 2020. – V. 172. – P. 109076.
140. Булыгина, И. Н., Сенатов, Ф. С., Калошкин, С. Д., Максимкин, А. В., Анисимова, Н. Ю., и Киселевский, М. В. (2019). Способ получения трехмерных изделий сложной формы со структурой нативной трабекулярной кости на основе высоковязкого полимера; RU 2 708 589 С1; Начало действия: 2019.10.07.
141. Choudhary R. et al. Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk // *Materials Science and Engineering: C*. – 2021. – V. 118. – P. 111456.
142. Choudhary R. et al. Impact of forsterite addition on mechanical and biological properties of composites // *Journal of Asian Ceramic Societies*. – 2020. – V. 8. – №. 4. – P. 1051-1065.
143. Diba M. et al. Magnesium-containing bioactive polycrystalline silicate-based ceramics and glass-ceramics for biomedical applications // *Current opinion in solid state and materials science*. – 2014. – V. 18. – №. 3. – P. 147-167.
144. Choudhary R. et al. Mechanical, structural, and biological characteristics of polylactide/wollastonite 3D printed scaffolds // *Polymers*. – 2022. – V. 14. – №. 19. – P. 3932.
145. Karyagina A. et al. Hybrid implants based on calcium-magnesium silicate ceramics diopside as a carrier of recombinant BMP-2 and demineralized bone matrix as a scaffold: dynamics of reparative osteogenesis in a mouse craniotomy model // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – V. 87. – №. 11. – P. 1277-1291.
146. Choudhary R. et al. Designing of porous PMMA/diopside bone cement for non-load bearing applications // *Journal of Asian Ceramic Societies*. – 2020. – V. 8. – №. 3. – P. 862-872.
147. Быстров П. А. и др. Эффективность стерилизации пучком ускоренных электронов гидрогеля для 3D-культивирования мезенхимальных мультипотентных клеток // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2022. – V. 21. – №. 3. – P. 72-81.
148. Wu C., Chang J. Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2007. – V. 83. – №. 1. – P. 153-160.

149. Kudinova A. et al. Antibacterial and anti-biofilm properties of diopside powder loaded with lysostaphin // *Pathogens*. – 2023. – V. 12. – №. 2. – P. 177.
150. Koudan E. V. et al. The scalable standardized biofabrication of tissue spheroids from different cell types using nonadhesive technology // *3D Printing and Additive Manufacturing*. – 2017. – Т. 4. – №. 1. – С. 53-60.
151. Brown P. H., Balbo A., Schuck P. Characterizing protein-protein interactions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation // *Current protocols in immunology*. – 2008. – V. 81. – №. 1. – P. 18.15. 1-18.15. 39.
152. Дудкин И. В. и др. Оценка величины коэффициента диффузии молекул доксорубицина в водном растворе в объеме пористого носителя // *Известия высших учебных заведений. Физика*. – 2019. – V. 62. – № 12. – P. 146-150.
153. Mircioiu C. et al. Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems // *Pharmaceutics*. – 2019. – V. 11. – №. 3. – P. 140.
154. Osidak E. O. et al. Collagen—A biomaterial for delivery of growth factors and tissue regeneration // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2014. – V. 84. – P. 368-378.

Приложение 1

```
1 import numpy as np
2 import matplotlib.pyplot as plt
3
4 square_size = 1
5 N = 55
6 dot_size = 1500
7
8 points = np.random.uniform(-1, 1, size=(N, 2))
9 distances = (points[:, 0]**2 + points[:, 1]**2)**0.5
10
11 plt.scatter(points[:,0], points[:,1],
12             cmap='coolwarm', s=dot_size)
13
14 plt.gca().set_aspect('equal')
15 plt.title('Monte Carlo')
16 plt.show()
```

Приложение 2

Протокол *in vitro* оценки активности противоопухолевых препаратов на примере высвобождения DOX из частиц диоксида с использованием сфероидов в качестве 3Д клеточной модели включает следующие этапы:

1. Формирование сфероидов и оценка кинетики их роста для выбора оптимальной начальной плотности клеток и времени культивирования;
2. Оценка активности лекарственного средства на сфероидов;
3. Оценка эффективности инкапсуляции и кинетики высвобождения лекарственного средства из носителя;
4. Оценка достаточного количества носителя для обеспечения эффективной концентрации лекарственного средства;
5. Оценка влияния высвобождаемого из носителя лекарственного средства на жизнеспособность и распластывание сфероидов.

Приложение 3

```
1 import numpy as np
2 from functools import partial
3 import matplotlib.pyplot as plt
4
5
6 def eq(d_over_rsqr, m_ratio, t):
7     return m_ratio - (1 - 6 * np.array(
8         [np.exp(-(n*np.pi)**2 * t * d_over_rsqr)/n**2 for n in range(1, 10000)]
9     ).sum() / np.pi**2)
10
11
12 class OptimumGetter:
13     def __init__(self, step=1e-1, mode='sub', accuracy=1e-10, iter_stop=1e5):
14         self.mode = mode
15         self.step = step
16         self.accuracy = accuracy
17         self.iterations = 0
18         self.iter_stop = iter_stop
19         self.switcher = {
20             'add': 'sub',
21             'sub': 'add'
22         }
23
24     def optimize(self, eq, start_point):
25
26         x_prev = start_point
27         f_prev = eq(x_prev)
28         while 1:
29             if self.mode == 'sub':
30                 x_curr = x_prev - self.step
31                 f_curr = eq(x_curr)
32             else:
33                 x_curr = x_prev + self.step
34                 f_curr = eq(x_curr)
35
36             if f_curr * f_prev < 0:
37                 self.step /= 2
38                 self._switch_mode()
39
40             self.iterations += 1
41             if self.iterations >= self.iter_stop:
42                 break
43
44             print(f'Current f:{f_curr}; curr x: {x_curr}')
45
46             if abs(f_curr) <= self.accuracy:
47                 break
48
49             x_prev = x_curr
50             f_prev = f_curr
51
52         return x_curr, f_curr
53
54     def _switch_mode(self):
55         self.mode = self.switcher[self.mode]
56
57
58 eq_part = partial(eq, m_ratio=0.170725866, t=604800)
59
60 optimizer = OptimumGetter(mode='sub', step=0.1)
61
62 print(optimizer.optimize(eq_part, 1))
63
64 def ratio(d_over_rsqr, t):
65     return (1 - 6 * np.array(
66         [np.exp(-(n*np.pi)**2 * t * d_over_rsqr)/n**2 for n in range(1, 10000)]
67     ).sum() / np.pi**2)
68
69 t = [i for i in range(0, 720000, 20000)]
70 m_ratio = [ratio(1.52E-08, t_i) for t_i in t]
71
72 print(t, m_ratio)
73
74 plt.plot(t, m_ratio)
75
76 plt.show()
```

Приложение 4

