

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

Бульгина Инна Николаевна

Кинетика высвобождения доксорубина из гибридных материалов с гидрогелевым компонентом

1.3.8 – «Физика конденсированного состояния»

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

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

Москва – 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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 доксорубина из материалов для костных имплантатов.

В соответствии с обозначенной целью поставлены следующие задачи:

- Разработка диффузионной модели, описывающей процесс высвобождения доксорубина 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 доксорубина 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 доксорубина 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 доксорубина. Получены результаты по сорбции и высвобождению доксорубина 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 доксорубина;

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 улучшенные 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 доксорубицина 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 результатов

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.

Публикации

Основное содержание работ изложено в 8 публикациях, включенных в библиографические базы данных цитирования ВАК, Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора

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 доксорубицина из разработанных компонентов и гибридной конструкции, обработке результатов и численном моделировании кинетики высвобождения, а также разработке модельных представлений об абсорбции и кинетике высвобождения доксорубицина 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы исследования, также поставлены его цель и задачи. Сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, также представлена степень достоверности и приведены конференции и публикации, являющиеся апробацией данной работы.

В первой главе приведен литературный обзор данных, в котором рассматриваются классификация носителей лекарственных средств и основные определения в области исследования; математические модели кинетики высвобождения лекарственных средств, зависимость определяемых параметров от строения и состава системы; возможность применения биокерамики, пористых полимерных матриц и гидрогелей в качестве носителей лекарственных средств; существующие гибридные конструкции, их преимущества и возможные применения.

Во второй главе описаны используемые в работе материалы, концепция предлагаемой гибридной конструкции, методики получения разработанных материалов и конструкций, методики исследования структуры, состава и свойств разработанных материалов и конструкций.

Для синтеза биоактивной керамики использовались следующие материалы:

- Нитрат кальция и яичная скорлупа в качестве источника кальция;
- Нитрат магния и оксид магния в качестве источника магния;
- TEOS и рисовая шелуха в качестве источника кремния;
- Глицин в качестве восстановителя для осуществления экзотермической реакции при синтезе диоксида;

- Азотная кислота в качестве катализатора процесса гидролиза TEOS.

Рассматриваются следующие методы синтеза биоактивной керамики: твердофазный, золь-гель горения, золь-гель горения с механоактивацией.

Для получения пористых полимерных матриц на основе сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ) и композиционного материала СВМПЭ/20%Диоксид были использованы:

- СВМПЭ марок GUR 4113 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.

Получение пористых полимерных матриц было проведено механоактивацией порошков СВМПЭ и диоксида; смешиванием СВМПЭ или механоактивированной смеси СВМПЭ/Диоксид с солью; термопрессованием полученных смесей и удалением порообразующего агента в дистиллированной воде.

Для оптимизации количества порообразующего агента была оценена массовая доля соли с размером 300 мкм в смеси для достижения связной пористости. Согласно модели системы СВМПЭ/соль объемная пористость зависит от массовой доли NaCl в соответствии со следующим уравнением:

$$\varphi = 0.008 * \omega^2 + 0.18 * \omega \quad (1)$$

где φ – объемная пористость (%);
 ω – массовая доля NaCl в смеси (%).

По результатам моделирования минимальное количество соли, обеспечивающее достижение связной пористости в СВМПЭ составляет 60 % масс., для термопрессования пористых полимерных матриц выбрано количество соли – 90 % масс., что соответствует объемной пористости порядка 80%.

Получение гидрогелей проводилось с помощью физической сшивки растворов на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы раствором хлорида кальция (система Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂), далее материалы названы 1AlgXСМС, что означает 1 % масс./об. альгината натрия и X (0; 0,5; 1; 2) % масс./об. натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы.

Предложена концепция гибридной конструкции, входящей в комплекс разрабатываемых биомедицинских материалов для восстановления костей. Иллюстрация концепции приведена на Рисунке 1.



Рисунок 1 – Иллюстрация концепции гибридной конструкции для восстановления костных дефектов

Согласно приведенной концепции получены экспериментальные образцы гибридной конструкции, доказывающие возможность создания образцов такого вида.

Разработанные компоненты были исследованы методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (СЭМ/ЭДС) и ИК-Фурье спектроскопии. Частицы биоактивной керамики, помимо этого, были изучены методами рентгенофазового анализа (РФА) и определения дзета-потенциала. Гидрогели исследовали на набухание. А пористые полимерные матрицы на основе СВМПЭ были исследованы на универсальной испытательной машине в соответствии со стандартом ASTM D695-15 и была оценена объемная пористость, основываясь на СЭМ микрофотографиях и гравиметрическим методом.

Предложена методика исследования кинетики набухания гидрогелей на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Согласно результатам которой оценивается степень набухания и степень восстановления.

Представлены методики исследования сорбции и кинетики высвобождения доксорубина (DOX) всеми видами разработанных материалов. Оценка содержания доксорубина проводилась методом спектрофотометрии с использованием мультимодального планшетного ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США). Проведен расчет содержания (DLC) и эффективности инкапсуляции (ЕЕ) доксорубина.

Получены тканевые сфероиды из клеток HF и MG-63 в планшетах для формирования сфероидов (Corning spheroid microplates). Исследована кинетика роста сфероидов и их жизнеспособность в зависимости от концентрации доксорубина. Также оценены жизнеспособность и распластывание в коллагене сфероидов при воздействии доксорубина, высвобождаемого из частиц диоксида.

В сотрудничестве с НИЦЭМ Гамалеи проведены исследования адсорбции и высвобождения костного морфогенетического белка 2 (BMP-2) из частиц биоактивной керамики – волластонита, форстерита и диоксида.

В третьей главе представлены результаты исследования микроструктуры и свойств разработанных биомедицинских материалов.

Из разработанных керамических материалов для дальнейших исследований был выбран диопсид, показавший лучшую способность к связыванию и высвобождению ВМР-2. В качестве основного метода синтеза диопсида выбран золь-гель метод горения с механоактивацией, позволивший достичь лучшей фазовой чистоты материала.

Диопсид, полученный золь-гель методом горения с механоактивацией был охарактеризован методами рентгенофазового анализа, ИК-Фурье спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии. В результате проведенных исследований доказано получение диопсида со средним размером агрегатов $6,7 \pm 5,3$ мкм. Результаты исследований приведены на Рисунке 2.

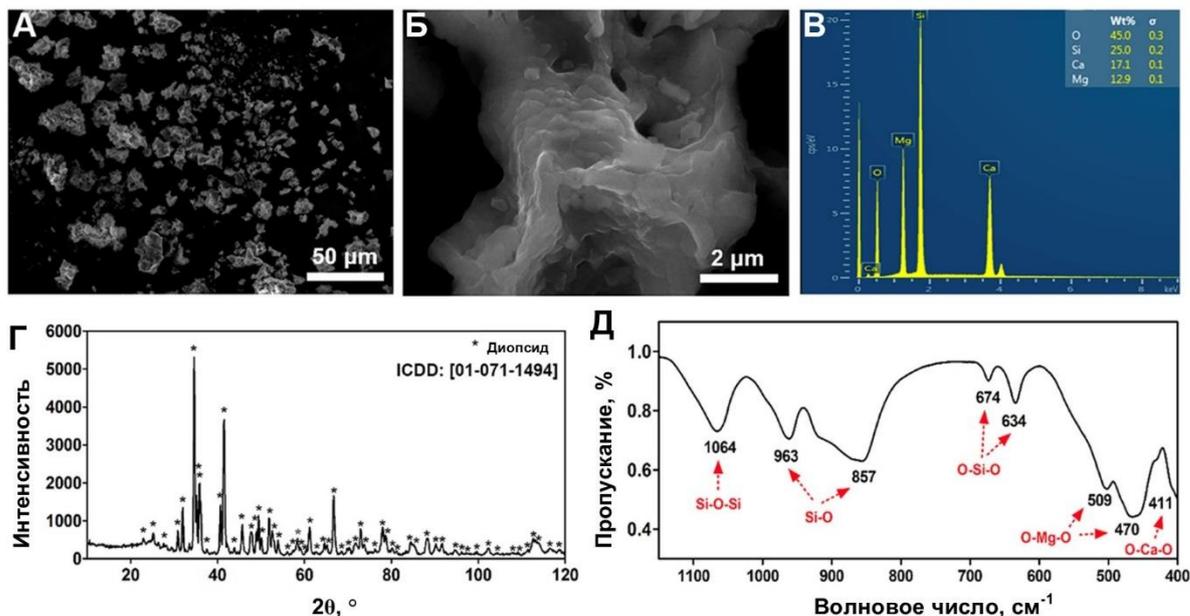


Рисунок 2 – Характеризация диопсида методом СЭМ/ЭДС (А, Б, В), РФА (Г), ИК-Фурье спектроскопии (Д)

Исследование пористых полимерных матриц на основе СВМПЭ (GUR) приведено на Рисунках 3 и 4. По СЭМ микрофотографиям выявляется зависимость размера пор от размера частиц порообразующего агента, для СВМПЭ и композиционного материала СВМПЭ/Диопсид средний размер пор составил 260 ± 120 мкм. Несмотря на агрегационную способность частиц диопсида можно судить о равномерном распределении наполнителя в полимерной матрице. В результате испытания высокопористых полимерных материалов на сжатие не было выявлено значительного влияния добавления 20 % масс. диопсида на свойства СВМПЭ.

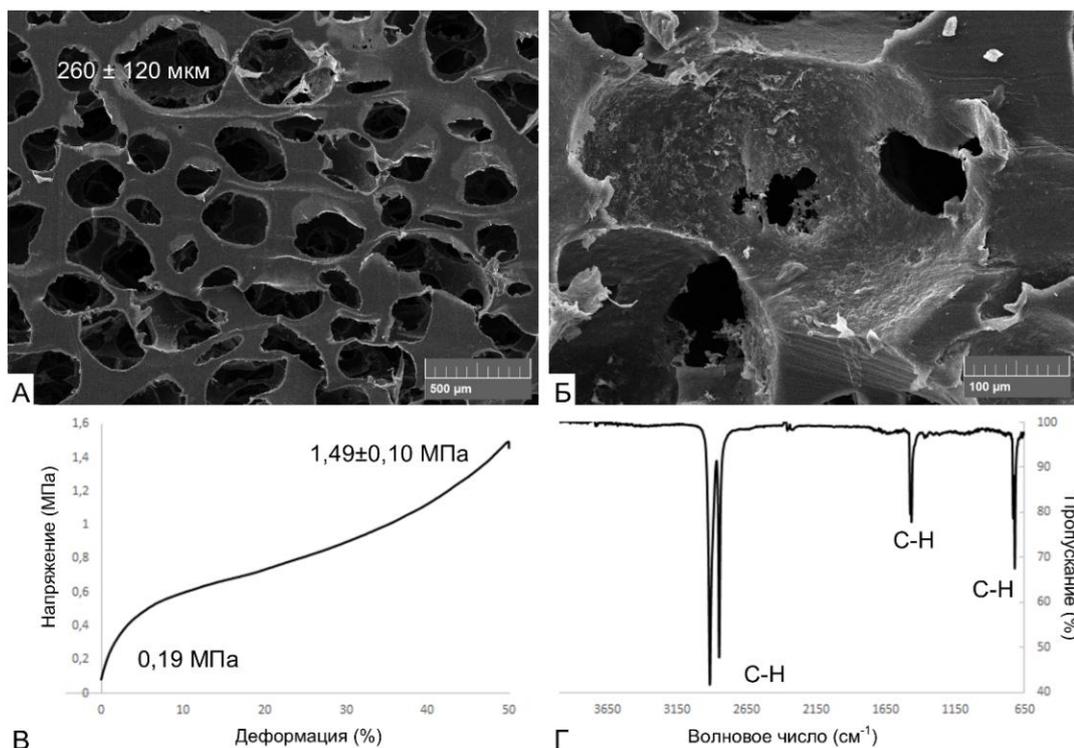


Рисунок 3 – Характеризация пористого СВМПЭ

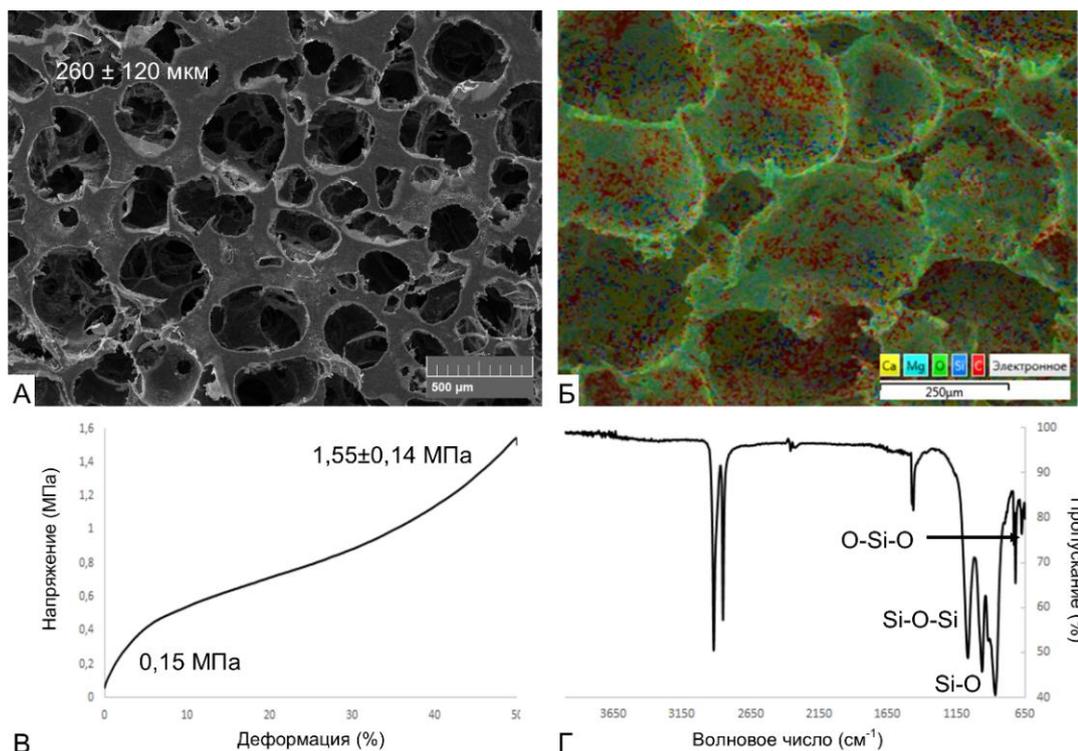


Рисунок 4 – Характеризация пористого СВМПЭ/Диоксид

Продemonстрированные ранее материалы являются пористыми, тогда как полимерные матрицы относятся к высокопористым материалам с размером пор 260 мкм, то диоксид является мезопористым. Последним из рассматриваемых материалов стали гидрогели на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, полученные физической сшивкой в присутствии ионов кальция. Исследована микроструктура гидрогелей и степень набухания, а также проведена ИК-Фурье спектроскопия (Рисунок 5).

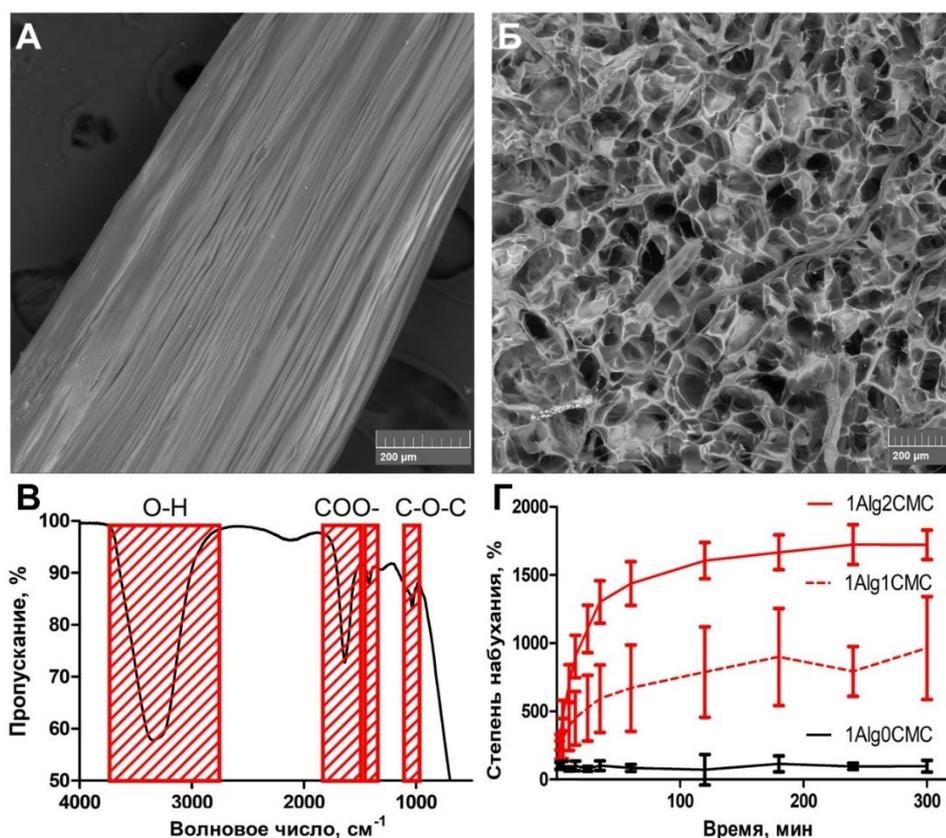


Рисунок 5 – Характеризация гидрогелевых материалов на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы: СЭМ изображения гидрогеля на основе альгината натрия (А) и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Б), ИК-Фурье спектроскопия композиционного гидрогеля (В) и оценка степени набухания (Г)

По результатам исследования набухания гидрогелевых материалов в различных средах оценены степень набухания и степень восстановления. Согласно приведенным микрофотографиям, гидрогель на основе альгината натрия имеет крайне плотную структуру, тогда как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы напротив демонстрирует пористую, что говорит о возможности введения Na-CMC в альгинат натрия с целью модификации его свойств.

Таким образом, в данной Главе исследованы различные по микроструктуре материалы как потенциальные носители лекарственных средств. Разработанная полимерная матрица по структурным характеристикам соответствует нативной трабекулярной кости. Введение в эти полимерные матрицы биоактивной керамики направлено на усиление процессов остеоинтеграции.

В четвертой главе представлены результаты изучения сорбции лекарственного препарата различными потенциальными носителями, выбрано модельное лекарственное средство, приведены кривые кумулятивного высвобождения.

Доксорубин использовался в качестве модельного лекарственного средства для изучения сорбции и кинетики высвобождения из компонентов гибридной конструкции. Помимо исследований на противоопухолевом препарате разрабатываемые материалы и конструкция исследуются как носители BMP-2. При изучении сорбции противоопухолевого препарата были оценены содержание препарата (drug loading content, DLC) и эффективность инкапсуляции (encapsulation efficiency, EE, %).

$$DLC = \frac{\text{масса добавленного } DOX - \text{масса несвязанного } DOX}{\text{масса носителя}} \quad (2)$$

$$EE = \frac{\text{масса добавленного DOX} - \text{масса несвязанного DOX}}{\text{масса добавленного DOX}} * 100\% \quad (3)$$

В результате нагрузки доксорубицином частиц диоксида эти параметры составили 3,3 % и 83,5 % соответственно. Кумулятивное высвобождение из частиц диоксида было исследовано в течение 28 дней. Большая часть доксорубицина (10,1 %) высвободилась в первые две недели и только 2,6 % в следующие две. Помимо кинетики высвобождения исследовано влияние доксорубицина, высвобожденного из диоксида, на сфероиды, полученные из клеток остеосаркомы MG-63 и фибробластов человека HF, а также распластывание клеток в 3Д условиях с целью исследования метастатического потенциала клеток MG-63. В результате предложен протокол *in vitro* оценки активности противоопухолевых препаратов в 3Д условиях культивирования, протестированный на частицах диоксида, нагруженных доксорубицином.

В исследовании адсорбционной емкости и высвобождения доксорубицина пористыми полимерными матрицами были исследованы материалы на основе СВМПЭ марок GUR и UTEC (Таблица 1).

Таблица 1. Результаты исследования адсорбции доксорубицина материалами на основе СВМПЭ

| Состав | DLC | EE, % |
|------------------------|-------------|-------------|
| СВМПЭ (GUR) | 0,77 ± 0,24 | 11,5 ± 1,7 |
| СВМПЭ (UTEC) | 0,68 ± 0,21 | 11,3 ± 3,1 |
| СВМПЭ (GUR) / Диоксид | 3,62 ± 0,46 | 58,5 ± 17,8 |
| СВМПЭ (UTEC) / Диоксид | 4,55 ± 0,37 | 78,6 ± 3,2 |

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

Также было продемонстрировано влияние молекулярной массы СВМПЭ на эффективность инкапсуляции пористыми полимерными матрицами на основе СВМПЭ/Диоксид. Оба вида композиционных материалов подвергались термопрессованию в одних условиях, что в случае полимера с большей молекулярной массой может приводить к возникновению дополнительной пористости, приводящей к ухудшению механических свойств, но благотворно влияющей на сорбционные характеристики. На Рисунке 6 представлены графики кумулятивного высвобождения доксорубицина из пористых композиционных материалов.

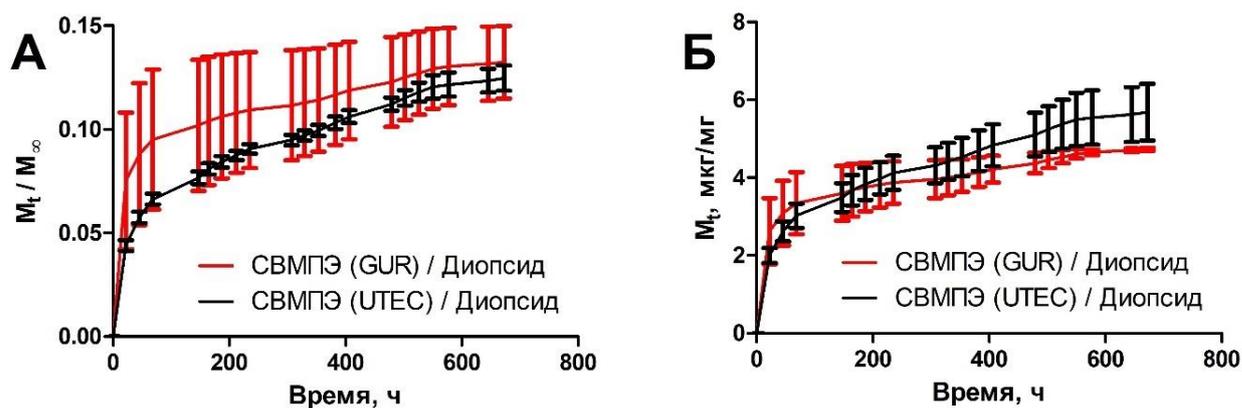


Рисунок 6 – Кумулятивное высвобождение доксорубина из пористых композиционных материалов состава СВМПЭ/20%Диопсид: в долях от нагруженного количества доксорубина (А) и в мкг доксорубина на 1 мг носителя (Б)

Согласно Рисунок 6А 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 доксорубина. Также лучшее связывание доксорубина с пористыми материалами на основе СВМПЭ (УТЕС) /Диопсид может быть вызвано выходом на поверхность большего количества диопсида при создании дополнительной пористости.

Изучены абсорбция и высвобождение доксорубина гидрогелями, в Таблице 2 приведены результаты оценки эффективности инкапсуляции в результате выдержки гидрогелей одного размера в растворах доксорубина разного объема.

Таблица 2. Результаты исследования абсорбции доксорубина гидрогелем состава 1Alg05СМС

| Объем раствора доксорубина, мкл | Исходное количество доксорубина, мкг | Абсорбированное гидрогелем количество доксорубина, 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 |

В пределах изучаемых концентраций эффективность инкапсуляции остается постоянной, что говорит о возможности нагрузки большего количества доксорубина в носитель данного типа. При исследовании высвобождения отмечается одинаковая скорость высвобождения, замедление высвобождения возникает при истощении источника согласно кривой высвобождения после нагрузки 100 мкг доксорубина (Рисунок 7А). При нагрузке из раствора с 200 мкг доксорубина было проведено изучение влияния времени абсорбции (Рисунок 7Б). За 7 недель отмечается практически полное высвобождение препарата, а также различие между эффективностью инкапсуляции и высвобождения при нагрузке гидрогелей доксорубином в течение 1 и 3 дней.

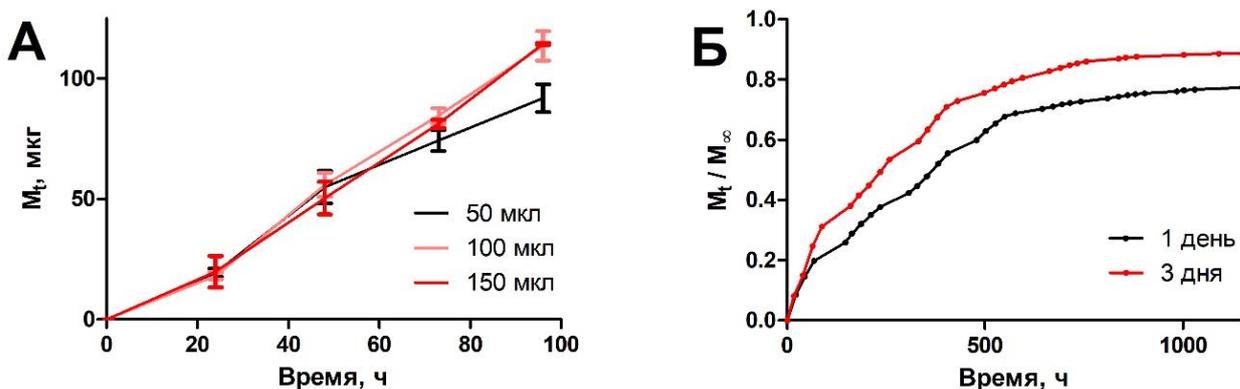


Рисунок 7 – Кривые кумулятивного высвобождения доксорубицина из гидрогеля

Оценены содержание и эффективность инкапсуляции доксорубицина для трех типов систем: керамика, пористая полимерная матрица, гидрогель. Доказана воспроизводимость полученных результатов, в том числе на частицах диоксида, что подтверждает стабильность разработанных систем и возможность их использования для изучения кинетики высвобождения и в качестве носителя доксорубицина. По результатам высвобождения доксорубицина наиболее эффективным носителем оказались гидрогелевые материалы, способные инкапсулировать препарат, защищая от среды, и обеспечивать полное высвобождение. Также была выявлена зависимость кумулятивного высвобождения от микроструктуры разработанных носителей, показано, что увеличение размера пор приводит к увеличению начального взрывного высвобождения доксорубицина.

В пятой главе представлены результаты моделирования кинетики высвобождения доксорубицина из разработанных носителей.

Для этого были использованы основные математические модели кинетики высвобождения, уравнения и определяемые константы приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Математические модели кинетики высвобождения

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

Экспериментальные и смоделированные в соответствии с моделью Пеппаса кривые кумулятивного высвобождения из диоксида, пористых полимерных матриц на основе СВМПЭ/Диоксид и гидрогелей состава 1AlG05CMC представлены на Рисунке 8.

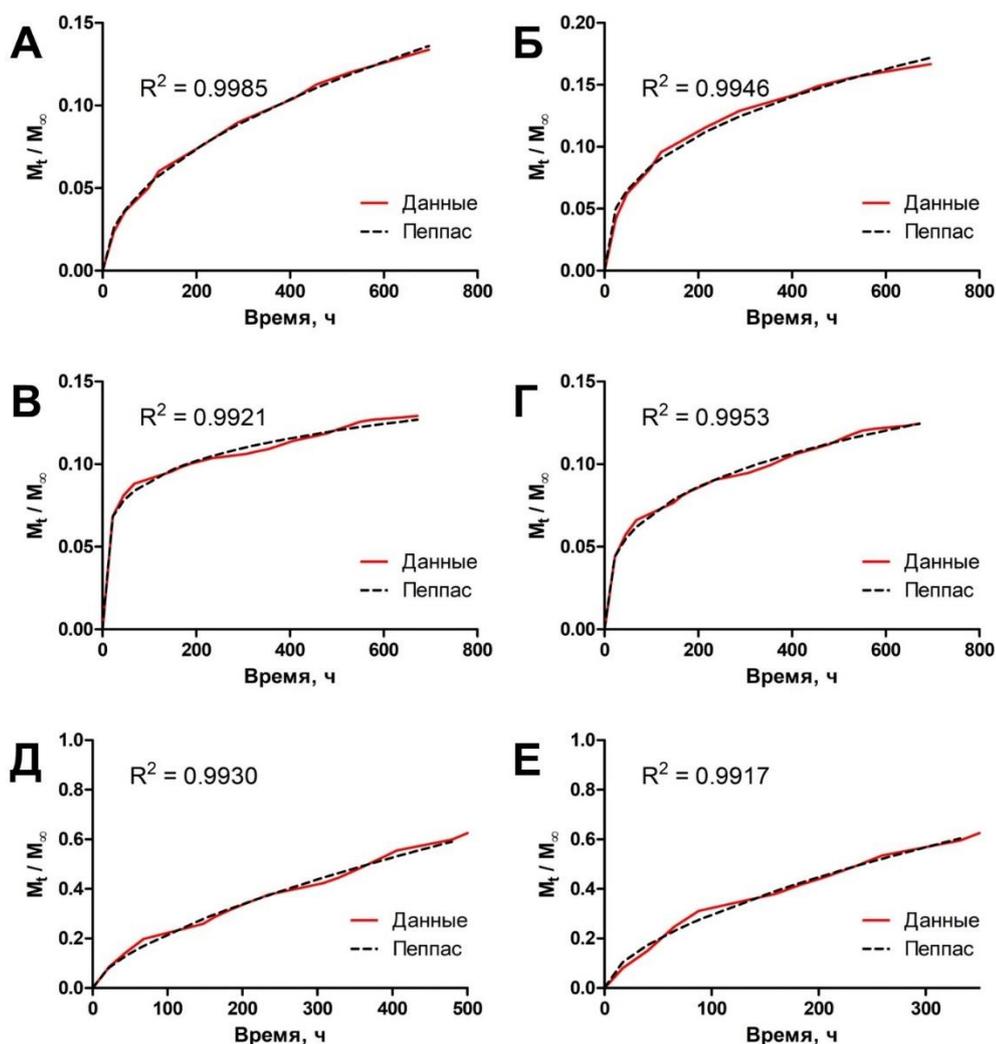


Рисунок 8 – Экспериментальные и смоделированные кривые кинетики высвобождения доксорубина из частиц диопсида при pH 7,4 (А) и 5,5 (Б), пористого композиционного материала СВМПЭ/Диопсид на основе СВМПЭ GUR (В) и УТЕС (Г), гидрогеля 1AlG05СМС, нагруженного доксорубином в течение 1 дня (Д) и 3 дней (Е)

На основе характеристики разработанных материалов и профилей кумулятивного высвобождения выявляется зависимость между микроструктурой материалов и видом кривой. При увеличении размера пор происходит увеличение начального взрывного высвобождения, обусловленного десорбцией из приповерхностных слоев.

При изучении высвобождения доксорубина из частиц диопсида было отмечено формирование системы, имеющей вид окосферических частиц, нагруженных доксорубином, который находится сразу в 2 состояниях: растворенном и нерастворенном. Эта система соответствует представлениям о монолитных дисперсиях. Зависимость кумулятивного высвобождения от времени для таких систем сферической геометрии описывается следующим уравнением:

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

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 оценим коэффициент диффузии доксорубина в PBS по уравнению Стокса-Эйнштейна.

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

где k – постоянная Больцмана, $1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К;
 T – абсолютная температура, К;
 η – вязкость PBS;
 r_{DOX} – радиус доксорубина.

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

Согласно статистическому анализу кинетики высвобождения 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. Оцененные статистическим анализом константы приведены в Таблице 3.

Таблица 3. 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 | $R^2 = 0,9985$ | $R^2 = 0,9946$ |

Проведено моделирование кинетики высвобождения доксорубина из пористых полимерных матриц на основе двух марок СВМПЭ. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Результаты моделирования кинетики высвобождения доксорубицина из пористых полимерных матриц

| 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.

Для гидрогелей лучшее соответствие по коэффициенту детерминации демонстрируют модели 1 порядка, Хигучи и Пеппаса. 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. Рассчитанные с использованием статистического анализа константы приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Результаты моделирования кинетики высвобождения доксорубицина 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 | $R^2 = 0,9930$ | $R^2 = 0,9917$ |

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 шивки. Следовательно,

при нагрузке гидрогелей доксорубицином возможно высвобождение по механизму смешанного типа: основным механизмом является диффузия, а побочным – релаксация полимерных цепочек вследствие набухания.

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.

В шестой главе представлена обобщенная диффузионная модель абсорбции и высвобождения доксорубицина гидрогелями сферической геометрии на примере системы Na-Alg/Na-СМС/CaCl₂.

Для моделирования кинетики высвобождения лекарственных препаратов из гидрогелей разработана модель для 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 9).

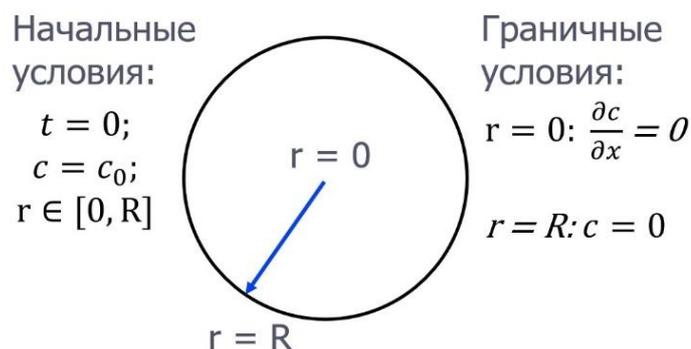


Рисунок 9 – Граничные условия модели гидрогеля сферической геометрии

Поскольку высвобождение доксорубицина из гидрогелей происходит преимущественно по диффузионному механизму, было проведено численное моделирование кинетики высвобождения с использованием решения уравнения диффузии для сферической системы. Для этого предложен алгоритм, основанный на методе Ньютона, итерационном методе оптимизации, позволяющий при известных размерах образца и экспериментальных данных кумулятивного высвобождения оценить коэффициент диффузии низкомолекулярного вещества в гидрогеле.

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

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 того чтобы смоделировать высвобождение препарата из гидрогелей сложной геометрии, было проведено численное моделирование методом конечных элементов (МКЭ) в COMSOL Multiphysics. Используя модель гидрогеля сферической геометрии (Рисунок 9), построена численная конечно-элементная модель.

В результате моделирования получены 3 смоделированные кривые, соответствующие модели Пеппаса, численному решению уравнения диффузии и численному моделированию МКЭ с использованием коэффициента диффузии, определенного по предложенной методике (Рисунок 10). Эти кривые имеют хорошую сходимость для образцов 1Alg05CMC радиусом 1,75 мм (Рисунок 10А), для которых эффективный коэффициент диффузии доксорубина составил $1,7 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$.

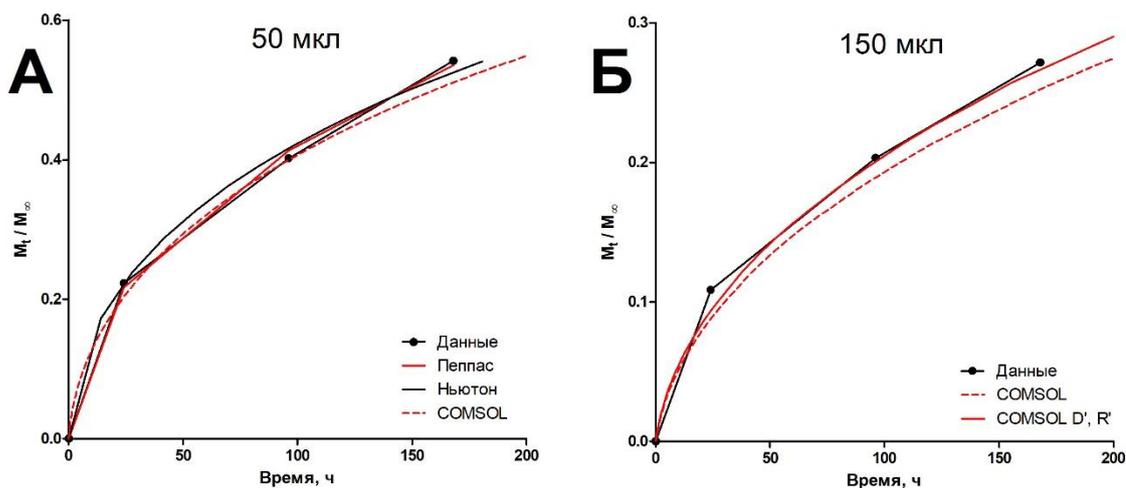


Рисунок 10 – Сравнение экспериментальных данных кумулятивного высвобождения доксорубина из сферических образцов гидрогелей с смоделированными данными

При этом для больших радиусов наблюдалось расхождение теоретических и экспериментальных данных, тем самым подтверждая отклонение геометрии от идеальности и увеличение размеров образцов в процессе абсорбции (Рисунок 10Б). Приняв оцененный коэффициент диффузии для образцов малого радиуса за эффективный коэффициент диффузии доксорубина в гидрогеле состава 1Alg05CMC, провели численное моделирование кинетики высвобождения доксорубина из образцов большего радиуса, изменяя радиус образцов до достижения хорошей сходимости кривых кумулятивного высвобождения (Рисунок 10Б; COMSOL D', R'). При равенстве соотношения D/R^2 , оцененному по численному решению уравнения диффузии получили те же кривые, что и при исходных значениях коэффициента диффузии и радиуса.

Для оптимизации абсорбции и высвобождения доксорубина из гидрогелевых систем сферической геометрии были предложены модели ограничения абсорбционной ёмкости гидрогелевых систем, постоянства начальной концентрации и ограниченного источника. На Рисунке 11 представлена обобщенная диффузионная модель, описывающая абсорбцию и высвобождение доксорубина из гидрогелей сферической геометрии.

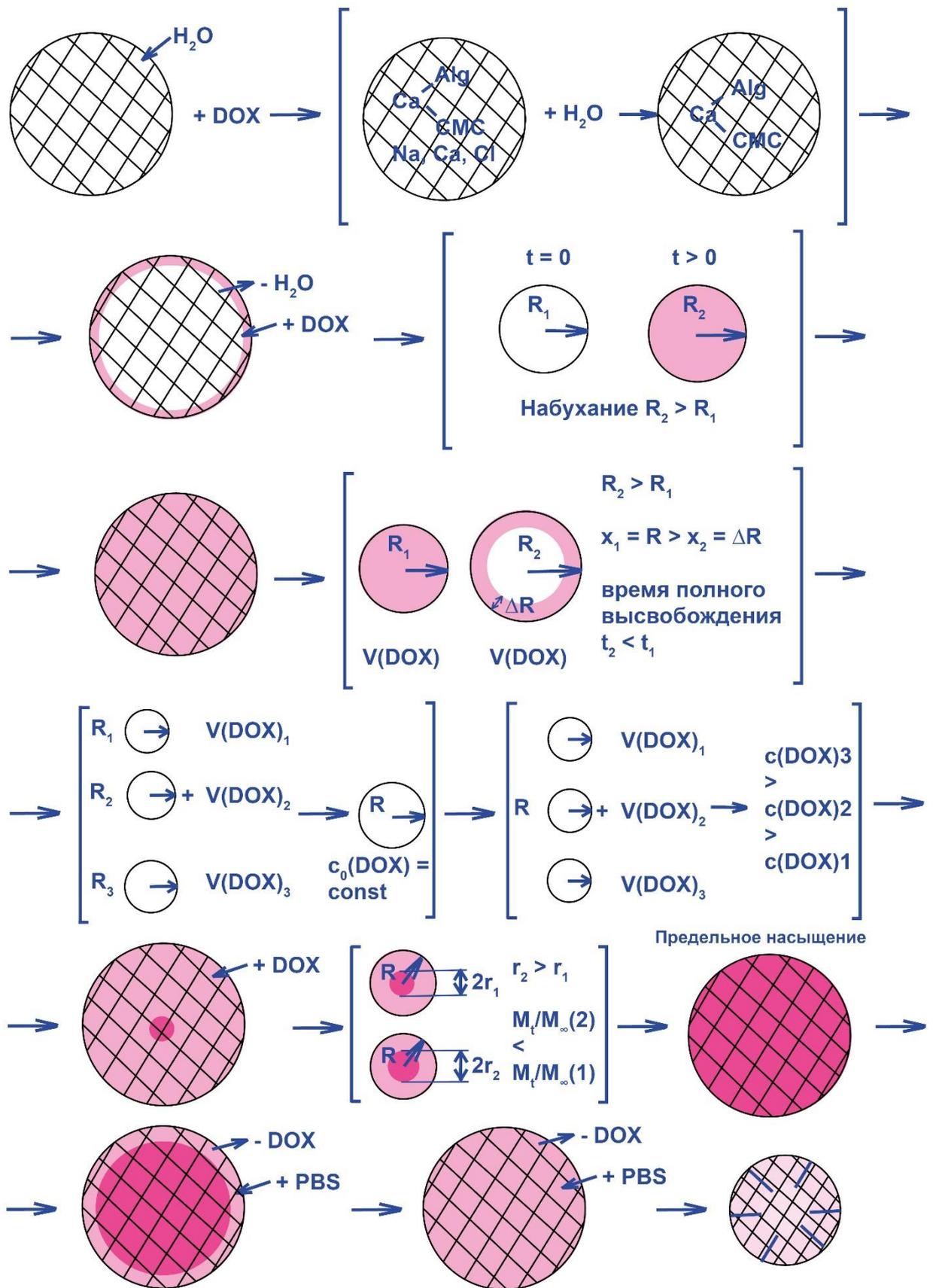


Рисунок 11 – Обобщенная модель абсорбции и высвобождения доксорубина из гидрогелей сферической геометрии состава Na-Alg/Na-CMC/CaCl₂

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 доксорубицина известной концентрации, при этом наблюдается увеличение объема образца вследствие набухания. Измерение нового радиуса образца позволяет с большей точностью оценивать коэффициент диффузии доксорубицина в гидрогеле. При нагрузке образцов разного размера одним объемом доксорубицина 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 доксорубицина 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 доксорубицина начинает формироваться ядро повышенной концентрации и при разном размере ядра наблюдается различие профилей кумулятивного высвобождения. В дальнейшем достигается состояние предельного насыщения путем абсорбции доксорубицина из раствора и начинается процесс десорбции, механизм высвобождения в данной системе преимущественно диффузионный. 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.

На основе полученных результатов сделан вывод о возможности использования пакета численного моделирования COMSOL Multiphysics для численного моделирования методом конечных элементов высвобождения низкомолекулярных веществ из гидрогелей сложной геометрии на основе экспериментальных результатов кинетики высвобождения вещества из сферических гидрогелей малого диаметра и экспресс-оценки эффективного коэффициента диффузии с учетом условий абсорбции лекарственного средства в соответствии с разработанными моделями.

В седьмой главе представлены экспериментальные результаты сорбции и кинетики высвобождения доксорубицина из разработанной гибридной конструкции, а также модель высвобождения доксорубицина из гибридных конструкций такого типа.

В Таблице 6 приведены результаты исследования сорбции доксорубицина компонентами гибридной конструкции и вариантами гибридной конструкции.

Таблица 6. Сравнение эффективности инкапсуляции доксорубицина компонентами гибридной конструкции и вариантами гибридной конструкции

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

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

На Рисунке 12 представлены кривые кумулятивного высвобождения доксорубина из гибридных конструкций в сравнении с пористыми полимерными матрицами.

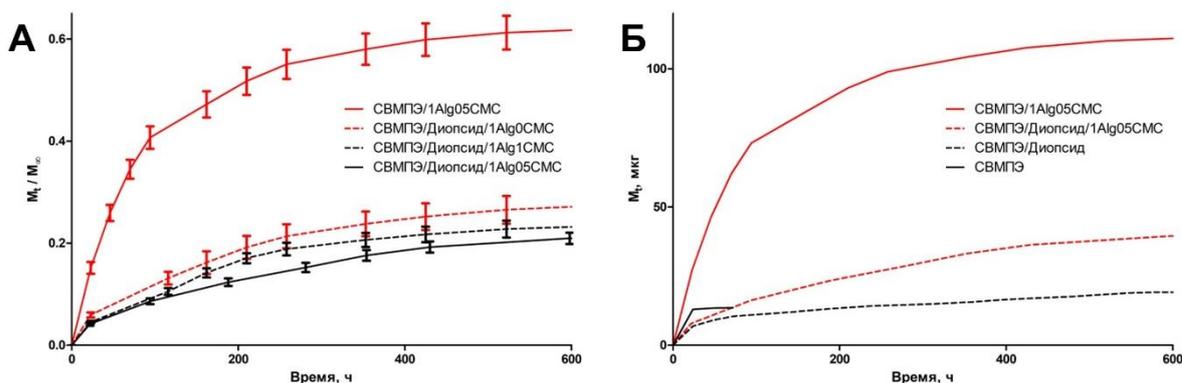


Рисунок 12 – Экспериментальные кривые кумулятивного высвобождения доксорубина из гибридных конструкций и пористых полимерных матриц

При этом состав гидрогеля не оказал влияния на высвобождение доксорубина (Рисунок 12А), хотя гидрогели, нагруженные доксорубином, демонстрировали сильную зависимость высвобождения от содержания Na-СМС. Возможные причины этого стали одним из положений модели высвобождения доксорубина из гибридной конструкции.

Состав полимерной основы гибрида имеет ту же зависимость, как и при сравнении кинетики высвобождения из пористых полимерных матриц. Судя по кривым кумулятивного высвобождения доксорубина, выраженного в мкг (Рисунок 12Б), можно сделать вывод о наличии взрывного высвобождения на начальном этапе. Это следует из схожих значений высвобождаемого доксорубина между СВМПЭ и гибридом на основе СВМПЭ и аналогично для СВМПЭ/Диопсид.

На основе полученных данных предложена модель диффузионно-контролируемого высвобождения доксорубина из гибридной конструкции (Рисунок 13).

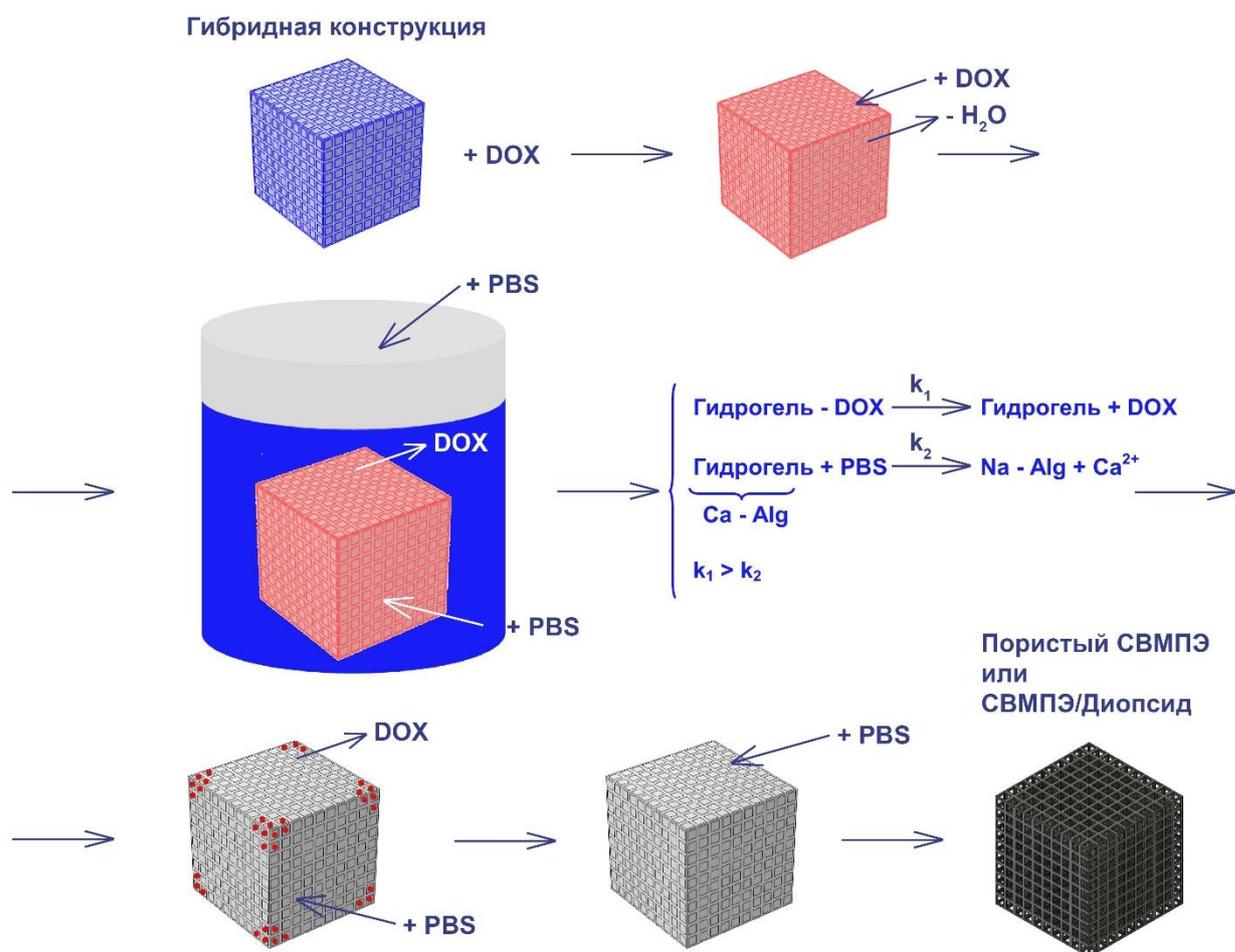


Рисунок 13 – Модель высвобождения доксорубицина из гибридной конструкции

Также были сформулированы преимущества гибридной конструкции перед индивидуальными компонентами. Так введение гидрогеля привело к увеличению сорбционной емкости пористых СВМПЭ и СВМПЭ/Диоксид, 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 доксорубицина 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 доксорубицина 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 BMP-2 из диопсида и пористых полимерных матриц и помогают в выборе эффективных носителей для применения в биомедицинской инженерии;

4. Разработан комплекс материалов (диопсид, пористые материалы на основе СВМПЭ/Диопсид, 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.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., **Bulygina, I.**, Senatov, F., Kaloshkin, S., & Swamiappan, S. (2020). Designing of porous PMMA/diopside bone cement for non-load bearing applications. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 8(3), 862-872.

2. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., **Bulygina, I.**, Chatterjee, A., Abraham, J., Senatov, F., ... & Swamiappan, S. (2020). Impact of forsterite addition on mechanical and biological properties of composites. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 8(4), 1051-1065.

3. **Bulygina, I.**, Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Kaloshkin, S., Scholz, R., ... & Kiselevskiy, M. (2020). Biomimetic scaffold fabricated with a mammalian trabecular bone template. *Polymer Degradation and Stability*, 172, 109076.

4. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., **Bulygina, I.**, Senatov, F., Kaloshkin, S., Anisimova, N., ... & Swamiappan, S. (2021). Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111456.

5. Bystrov, P., Novruzov, K., Potapnev, M., Kosmacheva, S., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Myshelova, P., **Bulygina, I.**, Senatov, F. (2022). Efficiency of accelerated electron beam sterilization of a hydrogel for 3D cultivation of mesenchymal multipotent cells. *Russian Journal of Biotherapy*, 21(3), 72-81.

6. Choudhary, R., **Bulygina, I.**, Lvov, V., Zimina, A., Zhirnov, S., Kolesnikov, E., ... & Senatov, F. (2022). Mechanical, structural, and biological characteristics of polylactide/wollastonite 3D printed scaffolds. *Polymers*, 14(19), 3932.

7. Karyagina, A., Orlova, P., Poponova, M., **Bulygina, I.**, Choudhary, R., Zhulina, A., ... & Gromov, A. (2022). 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)*, 87(11), 1277-1291.

8. Kudinova, A., Grishin, A., Grunina, T., Poponova, M., **Bulygina, I.**, Gromova, M., ... & Karyagina, A. (2023). Antibacterial and Anti-Biofilm Properties of Diopside Powder Loaded with Lysostaphin. *Pathogens*, 12(2), 177.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Vijayakumar, N., **Bulygina, I.**, Lvov, V., Choudhary, R., Venkatraman, S. K., Senatov, F., ... & Swamiappan, S. (2022). Effect of Formulation on the Release Kinetics of the Antibiotics from Biocompatible Ceramics. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 36.

2. Pang, R., Jiang, Z., Xu, C., Shi, W., Zhang, X., Wan, X., Bahat, D., Li, H., Senatov, F., **Bulygina, I.**, Wang, H., Zhang, H., Li, Z. (2023). Is Patient-Specific Instrumentation Accurate and Necessary for Open-Wedge High Tibial Osteotomy? A Meta-Analysis. *Orthopaedic Surgery*, 15(2), 413-422.

3. Zimina, A., Nikitin, A., Lvov, V., **Bulygina, I.**, Kovaleva, P., Vodopyanov, S., ... & Senatov, F. (2024). Impact of CoFe₂O₄ Magnetic Nanoparticles on the Physical and Mechanical Properties and Shape Memory Effect of Polylactide. *Journal of Composites Science*, 8(2), 48.

4. **Бulygina, 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 C1; Начало действия: 2019.10.07.