

Гибридные конструкции трикальцийфосфат/гидрогель, предназначенные для регенерации костной ткани и функционализированные противоопухолевым препаратом

П. А. Каралкин, Н. С. Сергеева, И. К. Свиридова, В. А. Кирсанова,
С. А. Ахмедова, Я. Д. Шанский, Н. В. Леонтьев, Д. М. Зуев,
Е. С. Климашина, П. В. Евдокимов, В. И. Путляев

Разработаны гибридные материалы, предназначенные для регенерации костных дефектов и состоящие из резорбируемой керамической основы (трикальцийфосфат — ТКФ), покрытой слоем гидрофильного биodeградируемого полимера. Биосовместимость керамики оценивали в тестах *in vitro* с использованием культуры фибробластов кожи человека. Для повышения терапевтического потенциала создаваемые модельные конструкции насыщали противоопухолевым препаратом доксорубицином в составе покрытия из УФ-полимеризуемого гидрогеля на основе полиэтиленгликольдиакрилата/полиакриламида (ПЭГДА/АА). Кинетику высвобождения лекарственного средства изучали методами спектрофотометрии с использованием физиологического раствора. Исследуемые гибридные конструкции обладали низкой цитотоксичностью. Насыщение конструкций противоопухолевым препаратом приводило к его пролонгированному высвобождению. Продемонстрирована технологическая возможность создания osteoconductive имплантатов на основе фосфатов кальция, пригодных для локальной доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: гибридные биоматериалы, трикальцийфосфат, биodeградация, гидрогели, доксорубицин, локальная доставка лекарств.

DOI: 10.30791/1028-978X-2020-4-44-57

Введение

При регенеративных методах лечения используют конструкции тканевой инженерии (КТИ) для восстановления биологических функций кости. Создание КТИ для лечения костных дефектов особенно важно, если размер дефекта превосходит критический и для восстановления костной ткани собственных возможностей организма недостаточно [1]. Основу КТИ составляют биodeградируемые пористые матрицы (скаффолды), заселенные клетками, способными к формированию костной ткани. Задача адресной доставки лекарственных препара-

тов в костные дефекты в составе КТИ сформировалась в последние годы как междисциплинарная в результате конвергенции способов региональной химиотерапии и аддитивных технологий изготовления скаффолдов для реконструкции ткани в области костных дефектов различного, в том числе, онкологического генеза. Сама концепция применения подобных функционализированных конструкций обусловлена широкой распространенностью метастатического поражения костных тканей, частота которого составляет при раке молочной и предстательной желез — 65 – 75 %, при раке щитовидной железы — порядка 60 %, а при раке

легкого и раке почки — до 40 % случаев у пациентов с данными нозологиями [2]. Использование скаффолдов, наполненных противоопухолевыми препаратами, позволяет существенно снизить вероятность метастазирования остеосаркомы [3 – 5].

Основу таких КТИ составляет изготовленная методами 3D-печати макропористая кальцийфосфатная керамика, обладающая оптимальной архитектурой (с регулярными, связанными между собой макропорами) [6, 7] и содержащая цитостатический лекарственный препарат антрациклинового, платинового или таксанового ряда. Для обеспечения пролонгированной локальной химиотерапии сразу после оперативного вмешательства необходим дополнительный слой на поверхности КТИ, тормозящий выход препарата. В качестве подобного слоя часто выступают гидрофильные биосовместимые полимеры — гидрогели, способные к набуханию [8, 9]. Известны различные способы осуществления их сшивки в растворах полимеров для осуществления их гелирования [10, 11]. С реологической точки зрения гидрогели — вязко-упругие тела, способные к достаточно большому (не менее 10 %) обратимым деформациям; вязкий элемент помогает релаксировать напряжения, возникающие при деформации. Это важно для плотного прилегания КТИ к краям костного дефекта — принципиально-го требования для эффективной остеоинтеграции имплантата. В данной работе мы использовали полиакриламидные (ПАА) гидрогели, сшитые полиэтиленгликольдиакрилатом (ПЭГДА) в процессе фотополимеризации. Слой гидрогеля был нанесен на поверхность керамики из трикальцийфосфата, β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ТКФ). Керамика и/или слой гидрогеля были наполнены цитостатическим препаратом группы антрациклиновых антибиотиков, доксорубицином (гидрохлорид 8S-цис)-10-(3-амино-2,3,6-тридезоксо-альфа-L-лихсогексо-пиранозил)

окси-7,8,9,10-тетра-гидро-,8,11-тригидрокси-8-(гидроксилацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендиона).

Цель данной работы — отработка приемов изготовления КТИ, наполненных цитостатиком, на модельных конструкциях с плоской границей раздела ТКФ-керамика/гидрогель и исследование кинетики высвобождения лекарственного препарата из этих конструкций.

Материалы и методы исследования

Получение таблеток β -ТКФ

Керамику ТКФ получали в форме таблеток диаметром 6 мм и массой 100 – 105 мг путем пресования порошка β -ТКФ (х.ч.) в ацетоне в течение 1,5 мин при давлении 3 атм. Спекание проводили в муфельной печи при 1100 °С в течение 6 ч. По окончании спекания были проведены измерения следующих параметров керамических таблеток: массы, диаметра и высоты.

Осаждение карбонатгидроксиапатита (КГА) на таблетки β -ТКФ из раствора, имитирующего состав плазмы крови (SBF)

Осаждение КГА с целью получения биоактивных покрытий на поверхности таблеток β -ТКФ проводили в ходе термостатирования в 5×SBF в течение 7 суток при 37 °С. По прошествии семи дней таблетки отделяли от раствора, промывали раствором аммиака (pH = 10 – 11) и помещали в сушильный шкаф при 60 °С на 1 сутки.

Нанесение слоя гидрогеля

Органической составляющей используемого композиционного материала был гидрогель на ос-

Таблица 1

Состав полученных гидрогелей на основе АА и ПЭГДА

Table 1

The composition of the obtained hydrogels based on AA and PEGDA

| Свойства | № состава | | | | | |
|---|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Содержание ПЭГДА в геле, ω , масс. % | 0,625 | 1,00 | 2,00 | 5,00 | 1,00 | 35,00 |
| m_{AA} , г | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| $m_{\text{ПЭГДА}}$, г | 0,0125 | 0,02 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,7 |
| $m_{\text{фотонициатор}}$, г | 0,0201 | 0,0202 | 0,0205 | 0,0210 | 0,0220 | 0,0270 |
| $N_{\text{AA}}/N_{\text{ПЭГДА}}$ | 1576 | 985 | 394 | 197 | 98 | 28 |

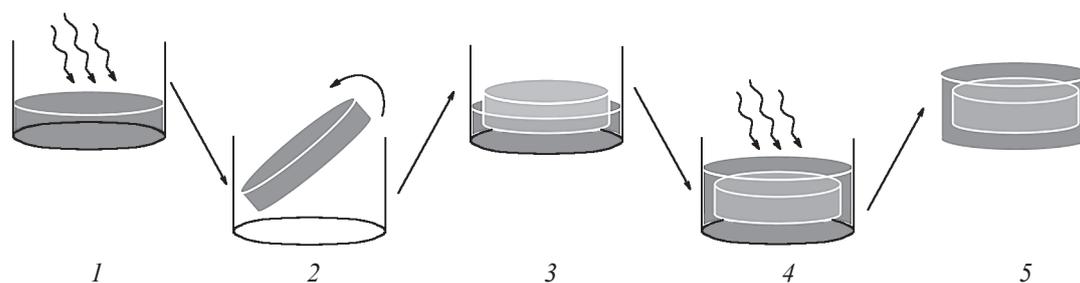


Рис. 1. Этапы покрытия таблеток ТКФ гидрогелями: 1 — внесение в лунку планшета 50 мкл раствора геля и начало его облучения, 2 — переворачивание частично заполимеризованного геля, 3 — внесение таблетки ТКФ, 4 — добавление 50 мкл геля и повторное облучение, 5 — извлечение покрытой гелем таблетки из лунки и помещение ее на предметное стекло, с последующим выдерживанием под источником УФ-излучения до завершения полимеризации.

Fig. 1. Stages of coating of TCP tablets with hydrogels: 1 — introducing 50 μ l of a gel solution into the well of a tablet and beginning to irradiate it; 2 — turning over a partially polymerized gel; 3 — adding TCP pellet; 4 — adding 50 μ l of gel and re-irradiation; 5 — removing a gel-coated tablet from the hole and placing it on a glass slide, followed by exposure under a UV source until polymerization is complete.

нове акриламида (АА) и полиэтиленгликолядиакрилата (ПЭГДА) с молярной массой 700 г/моль. Для этого 2 г порошка акриламида растворяли в 8 г физраствора (0,9 % водного раствора хлорида натрия) при перемешивании. Далее получали шесть гелей разного состава (табл.1) путем добавления соответствующего объема ПЭГДА (плотность 1,12 г/мл при 25 °С) к имеющемуся раствору.

Количество фотоинициатора АРi-180 (2-гидроксис-1-[3-(гидроксиэтил)фенил]-2-метил-1-пропанон), добавляемого к каждому конкретному составу геля, рассчитывали как 1 % от суммарной массы органической составляющей. Последовательность операций представлена на рис. 1. В некоторых экспериментах проводили высушивание гидрогелей на воздухе при комнатной температуре и в сублиматоре, с последующими циклами набухания в физрастворе.

Рентгенофазовый анализ (РФА)

Качественный рентгенофазовый анализ осуществляли на дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом (Япония). Съёмку проводили в режиме на отражение (геометрия Брегга-Брентано) с использованием CuK_{α} -излучения в кварцевых кюветках без усредняющего вращения. Параметры съёмки: интервал углов $2\theta = 3 - 70^\circ$, шаг по $2\theta \sim 0,02^\circ$, скорость регистрации спектров — 5°/мин. Для коррекции спектра в качестве внутреннего стандарта использовали порошок кремния (ASTM). Качественный анализ полученных рентгенограмм проводили с помощью программы WinXPow при использовании базы данных ICDD PDF-2.

Растровая электронная микроскопия (РЭМ)

Микроструктуры образцов исследовали на растровом электронном микроскопе с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss, Германия), а также на электронном микроскопе FIB-системы NVision 40 (Carl Zeiss, Германия). Для исследования на образцы был нанесен слой углерода или хрома (напылительная установка Quorum Technologies, QT-150T ES, Великобритания). Ускоряющее напряжение электронной пушки составляло 3 – 10 кВ. Изображения получали во вторичных электронах при увеличениях до $\times 100000$ с помощью детектора типа SE2.

Исследование кинетики выхода препарата

Было использовано два вида условий эксперимента: а) статические условия при 25 °С, то есть конструкция, насыщенная гидрогелем, все время находилась в фиксированном объеме физраствора, б) динамические условия при 37 °С, после каждого измерения физраствор обновлялся.

а) Статические условия. Полученные ранее высушенные образцы помещали по одному в герметично изолированные стаканы, содержащие 8 мл физраствора. Измерение спектра поглощения вышедшего в раствор доксорубина осуществляли в нескольких временных точках: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 25, 50, 100 и 200 мин. Перед каждым измерением раствор в стакане перемешивали и с помощью автоматической пипетки переносили 3 мл в кварцевую кювету шириной 1 см. После измерения раствор доксорубина из кюветы той же пипеткой перено-

сили обратно в стакан и герметично запечатывали до следующего измерения. В некоторых экспериментах перед проведением спектрофотометрии проводили 6-кратное разбавление раствора.

б) Динамические условия. Использовали два способа введения препарата в конструкцию: 1) керамическую таблетку пропитывали слоем доксорубина, а затем на нее наносили слой гидрогеля; 2) на таблетку наносили слой гидрогеля и высушивали, а затем гидрогель набухал в растворе доксорубина (аналогично экспериментам в статических условиях). В качестве образца сравнения иногда выступала керамическая таблетка, пропитанная раствором доксорубина. Конструкции помещали в контейнеры с 3 мл физраствора при 37 °С, после измерения в контейнер заливали свежий физраствор.

в) Приготовление стандартных растворов. 0,12 г препарата доксорубина (TEVA) растворяли в 25 мл физраствора и перемешивали до полного растворения осадка. Затем в 9 мерных емкостей добавляли по 0,125, 0,2, 0,25, 0,375, 0,5, 1, 1,25, 2,5 и 5 мл полученного стандартного раствора, после чего физраствором доводили объем до 10 мл. Для осуществления анализа и построения калибровочной кривой растворы переносили в кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см и проводили спектрофотометрический анализ в диапазоне длин волн 300 – 800 нм (УФ- и видимая область спектра) на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35.

г) Спектрофотометрический анализ растворов. Процедура измерения частично описана выше. В другой серии экспериментов проведены аналогичные действия до временной точки 10 минут включительно. Начиная с 25-й минуты из стакана отбирали 500 мкл раствора доксорубина и переносили в чистую емкость, разбавляли 2500 мкл физраствора, после чего проводили спектрофотометрическое измерение. Вычисление концентрации вышедшего в раствор препарата осуществляли при длине волны максимума его поглощения.

Исследование цитотоксичности гибридных материалов

Оценку цитотоксичности получаемых гибридных конструкций, состоящих из ТКФ, покрытого слоем КГА и/или гидрогелем проводили в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5 – 2011 [12]. Исследование проводили на перевивной линии иммортализованных фибробластов кожи человека (ФЧ, штамм 1680h TERT, ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН). Для

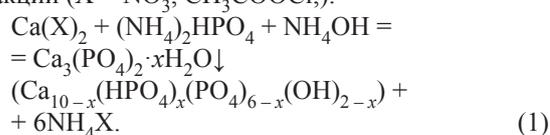
культивирования использовали питательную ростовую среду состава ДМЕМ, 10 % эмбриональной сыворотки телят (Gibco, США), 60 мг/мл L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина и 20 мМ раствора HEPES. Для приготовления вытяжек из изучаемых образцов в стеклянные флаконы помещали по 5 исследуемых образцов общей площадью поверхности 3,54 см², после чего к ним добавляли питательную среду в объеме 1,2 мл. Экстракцию проводили при 37 °С в термостате при постоянном перемешивании на горизонтальном орбитальном шейкере в течение 24 ч. Плотность клеток ФЧ в эксперименте составляла 5·10³ клеток в каждой лунке 96-луночного планшета в 200 мкл питательной среды. Через 3,5 ч после посева ФЧ из каждой лунки удаляли ростовую среду и добавляли вытяжки материалов в объеме 100,0 мкл. В качестве отрицательного или положительного контролей цитотоксичности использовали питательную среду или среду, содержащую 50 масс. % диметилсульфоксида (ДМСО), соответственно. Цитотоксичное действие вытяжек на ФЧ оценивали методом МТТ-теста после 24-ти часовой инкубации. Для расчета итоговых показателей выживаемости клеток процент жизнеспособных клеток в присутствии чистой питательной среды принимали за 100 %.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ полученных данных был выполнен с помощью программного обеспечения STATISTICA ver.10.0 (2011, StatSoft, Inc., США) и Microsoft Excel 365. Для большинства изучаемых параметров определяли среднее значение и стандартное отклонение полученных величин.

Результаты и обсуждение

Для синтеза порошков ТКФ и ТКФ/гидроксиапатита (ГА, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) с необходимой гранулометрией (d₅₀ на уровне 1 мкм) апробировано два метода: а) твердофазный синтез из CaCO₃ и Ca₂P₂O₇ (полученного термолитом брусита, осажденного из водных растворов) при 950 °С; б) осаждение гидратированного трикальцийфосфата Ca₃(PO₄)₂·xH₂O — аморфного фосфата кальция (АФК) или нестехиометрического ГА (нГА) Ca_{10-x}(HPO₄)_x(PO₄)_{6-x}(OH)_{2-x} с заданным x путем реакции (X = NO₃, CH₃COOCl):



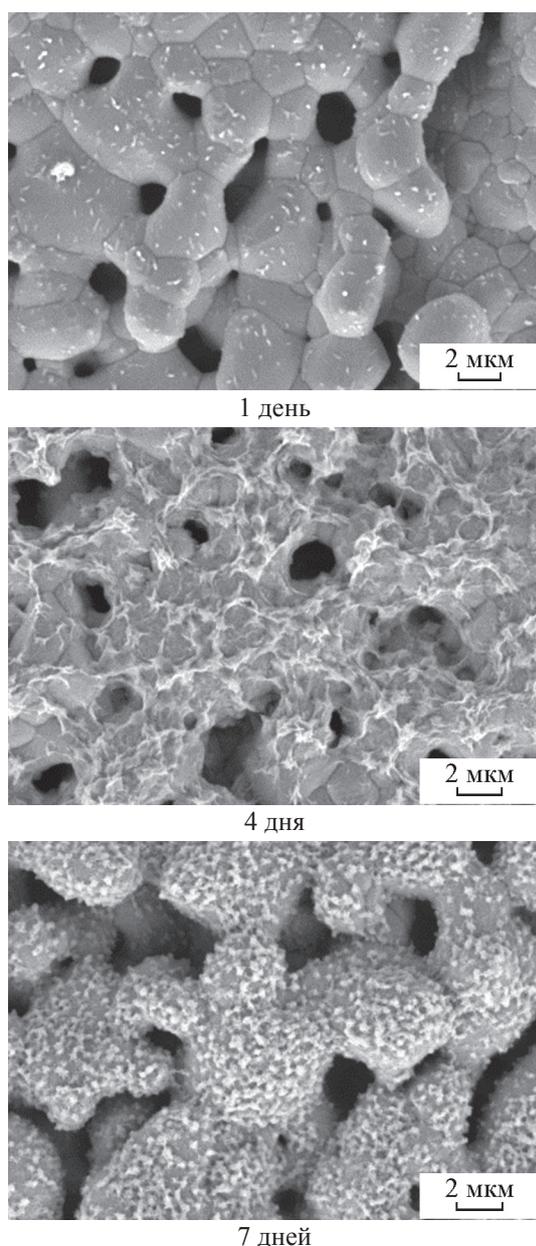


Рис. 2. Микроструктура керамики из ТКФ, выдержанной в растворе 5xSBF (время выдержки указано под снимками); заметно накопление кристаллов КГА на поверхности керамики.

Fig. 2. Microstructure of ceramics made of TCP aged in a 5xSBF solution (the exposure time is indicated below the pictures); noticeable accumulation of CHA crystals on the ceramic surface.

Следует отметить, что все три типа синтеза позволяют получать порошки для изготовления керамики ТКФ и ТКФ/ГА с данными характеристиками. Недостатками твердофазного синтеза являются

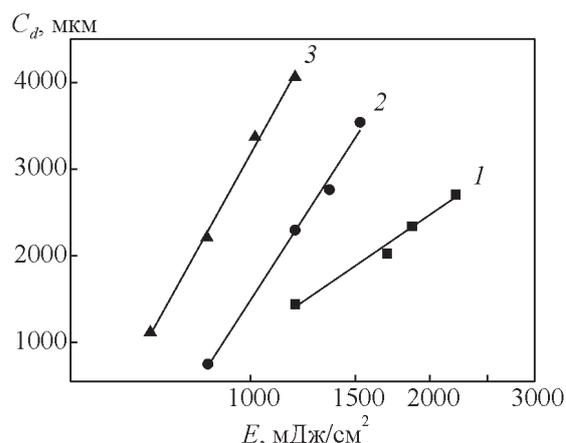


Рис. 3. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения при использовании разного содержания ПЭГДА: 1 — 0,625 %, 2 — 2,5 %, 3 — 5 %, для получения фотоотверждаемых ПАА-ПЭГДА-гидрогелей.

Fig. 3. Dependence of the polymerization depth on the radiation dose when using different PEGDA contents: 1 — 0.625 %, 2 — 2.5 %, 3 — 5 %, to obtain photocurable PAA-PEGDA hydrogels.

большой размер частиц и иногда фиксируемое по ИК-спектрам (колебания P_2O_7 -групп) нарушение стехиометрии исходной смеси. Синтез через АФК сложен, приводит к агрегированным порошкам с большим содержанием воды и с сильной усадкой при спекании. Таким образом, твердофазный синтез и осаждение нГА оказываются вполне приемлемыми для получения модельной (плоская геометрия) и макропористой керамики из ТКФ и ТКФ/ГА. Порошок ТКФ твердофазного синтеза после дезагрегации в шаровой планетарной мельнице в жидкой среде ацетона с добавлением ПАВ (Triton X-100) в течение 1 часа имеет распределение со средним размером частиц $\sim 2 \pm 0,5$ мкм. Из полученных порошков твердофазного синтеза была изготовлена керамика с 15 – 20 % пористостью (рис. 2; в некоторых экспериментах пористость доводили до 30 % за счет растравливания керамики лимонной кислотой) спеканием при 1100 °С в течение 6 ч. На основе керамики были изготовлены 2-х слойная (таблетка ТКФ с нанесенным слоем гидрогеля) и 3-х слойная (таблетка ТКФ со слоем КГА, осажденного из 5xSBF, на нем слой гидрогеля) КТИ.

На рис. 3 представлены зависимости глубины полимеризации фотоотверждаемых гидрогелей от облучаемой дозы при разном содержании ПЭГДА. При увеличении содержания ПЭГДА до 2,5 масс. % происходит незначительное уменьше-

Таблица 2

Данные критической энергии полимеризации и светочувствительности композиций с разным содержанием ПЭГДА для получения фотоотверждаемых ПАА-ПЭГДА-гидрогелей

Table 2

Data on the critical polymerization energy and photosensitivity of compositions with different PEGDA contents to produce photocurable PAA-PEGDA hydrogels.

| Содержание ПЭГДА, % | Критические энергии полимеризации, E_c , мДж/см ² | Светочувствительность, D_p , мкм |
|---------------------|--|------------------------------------|
| 0,625 | 756 | 2733 ± 519 |
| 2,5 | 726 | 4624 ± 273 |
| 5 | 555 | 5381 ± 248 |

Таблица 3

Результаты исследования цитотоксичности вытяжек из керамических дисков ТКФ, дополнительно покрытых слоем КГА и/или гидрогелем на основе ПЭГДА/АА

Table 3

The results of the study of acute cytotoxicity of extracts from ceramic disks of TCP, additionally coated with a layer of CHA and/or hydrogel based on PEGDA/AA

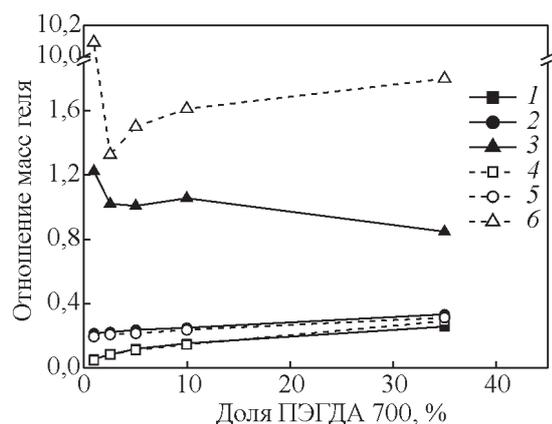
| № серии образцов | Состав | Популяция жизнеспособных клеток, ПЖК, % | Индекс цитотоксичности, % |
|------------------|---|---|---------------------------|
| 1 | Питательная среда (отрицательный контроль цитотоксичности) | 100 | 0 |
| 2 | ТКФ | 90,9 | 9,1 |
| 3 | ТКФ + слой КГА | 81,3 | 18,7 |
| 4 | ТКФ + 2,5 % ПЭГДА/АА | 81,6 | 18,4 |
| 5 | ТКФ + слой КГА + 2,5 % ПЭГДА/АА | 81,6 | 18,4 |
| 6 | ТКФ + 5 % ПЭГДА/АА | 79,8 | 20,2 |
| 7 | ТКФ + слой КГА + 5 % ПЭГДА/АА | 78,1 | 21,9 |
| 8 | Питательная среда с 50 % ДМСО – диметилсульфоксида (положительный контроль цитотоксичности) | 4,6 | 95,4 |

ние критической энергии полимеризации (табл. 2), в то же время использование 5 % ПЭГДА позволяет увеличить реакционную способность композиции для получения ПАА-ПЭГДА-гидрогеля. Для увеличения реакционной способности, то есть возможности нанесения тонких слоев ПАА-ПЭГДА-гидрогелевого покрытия, необходимо либо увеличивать концентрацию ПЭГДА, что будет приводить к повреждению нанесенного слоя из-за увеличения хрупкости гелей, либо к увеличению количества фотоинициатора, что, в свою очередь, способно снижать биосовместимость используемых покрытий.

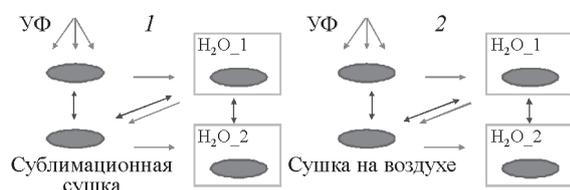
Тем не менее, в наших экспериментах результаты оценки биосовместимости (табл. 3) позволили сделать вывод об отсутствии выраженной цитотоксичности у использованных составов керамических материалов и гидрогелевых покрытий.

Процент жизнеспособных фибробластов кожи человека после 24 ч культивирования в присутствии вытяжек из гибридных материалов различных составов составляла, в среднем, не менее 80 %.

На процессы сушки-набухания гидрогелей наиболее сильное влияние оказывает сублимационная сушка набухшего в воде геля (усиление последующего набухания) (рис. 4). Выделяются два состава с 0,625 и 35 % ПЭГДА с необратимой сушкой-набуханием, то есть слабо и очень сильно сшитые гели. Микроструктура гелей после сублимационной сушки (рис. 5) характеризуется различной степенью структурированности. Наиболее структурированы сильно-сшитые гели, однако в области средних концентраций сшивающего агента (например, 5 % ПЭГДА) гель выглядит неожиданно плотным; в то же время при низких концентрациях сшивающего агента (0,625 – 2,5 %)



a



b

Рис. 4. a — Относительное изменение массы гидрогелей после различной последовательности операций: 1 — после сублимационной сушки / в воде до сушки, 2 — после сублимационной сушки / после УФ, 3 — в воде после сублимационной сушки / в воде после УФ, 4 — после сушки на воздухе / в воде после сушки на воздухе, 5 — после сушки на воздухе / после УФ, 6 — в воде после сушки на воздухе / в воде после УФ; b — схема последовательностей операций УФ-полимеризации, сушки (на воздухе или сублимационной), гидратации и регидратации.

Fig. 4. a — The relative change in the mass of hydrogels after different sequence of operations: 1 — after freeze-drying / in water before drying, 2 — after freeze-drying / after UV, 3 — in water after freeze-drying / in water after UV, 4 — after drying in air / in water after drying in air, 5 — after drying in air / after UV, 6 — in water after drying in air / in water after UV. UV polymerization, drying (in air or sublimation), hydration and rehydration; b — a sequence diagram of the operations of UV polymerization, drying (in air or sublimation), hydration and rehydration.

присутствуют как плотные, так и сетчатые участки, то есть гели менее однородны. Гели с содержанием ПЭГДА более 5 % были достаточно хрупкие, по этой причине часто происходило отслаивание геля от таблетки ТКФ или разрушение гелевого слоя. В то же время гели с содержанием ПЭГДА менее

1 % при длительном набухании в физрастворе или среде ДМЕМ при 37 °С необратимо деградировали уже после 1 суток. С учетом поведения при набухании, прочности и адгезии гелевого слоя для дальнейших исследований были выбраны гидрогели АА/ПЭГДА с содержанием ПЭГДА 2,5 и 5 %. Значение LC_{50} для фотоинициатора АРi-180 составляет 8,7 ммоль/л или 1,6898 г/л [13], поэтому для *in vitro* применений крайне нежелательно использование гидрогелей с содержанием фотоинициатора, выше данной концентрации. Для полученных составов содержание АРi-180 не превышало 0,38 г/л (1 % относительно содержания АА), из чего можно сделать вывод об относительной безопасности их применения в тканевой инженерии.

Красная окраска доксорубина, при наполнении им КТИ, имеет как положительную сторону (использование спектроскопических методов для анализа), так и отрицательную (максимум поглощения около 480 нм попадает в полосу поглощения фотоинициатора). На основании полученных спектров поглощения была определена длина волны, при которой регистрируемая оптическая плотность гидрохлорида доксорубина максимальна — 480 нм. После этого была построена градуировочная зависимость для определения концентрации доксорубина при данной длине волны. Начиная со значения 2,5 оптической плотности, на кривых поглощения начинают появляться шумы (рис. 6a), обусловленные в первую очередь недостаточной чувствительностью прибора (спектрофотометр Perkin Elmer Lambda 35) для регистрации малой интенсивности излучения, прошедшего через сильно поглощающий раствор. Чтобы избежать крупных систематических отрицательных ошибок, было принято решение также построить градуировочную функцию при длине волны поглощения 400 нм. Полученные при длине волны 480 нм данные аппроксимируются к прямой, описываемой уравнением

$$y = (15,9 \pm 1,1) \cdot c + (0,30 \pm 0,09),$$

$$(P = 0,95, n = 8, r = 0,98043),$$

где c — концентрация гидрохлорида доксорубина, мг/мл, P — доверительная вероятность, n — число точек, r — коэффициент корреляции. Для длины волны 400 нм соответствующая зависимость имеет вид

$$y = (4,8 \pm 0,1) \cdot c + (0,06 \pm 0,01),$$

$$(P = 0,95, n = 8, r = 0,99781).$$

При обеих длинах волн, чем ниже было содержание ПЭГДА в геле и меньше плотность шивки, тем большее количество доксорубина переходило во внешний раствор. По прошествии 100 мин

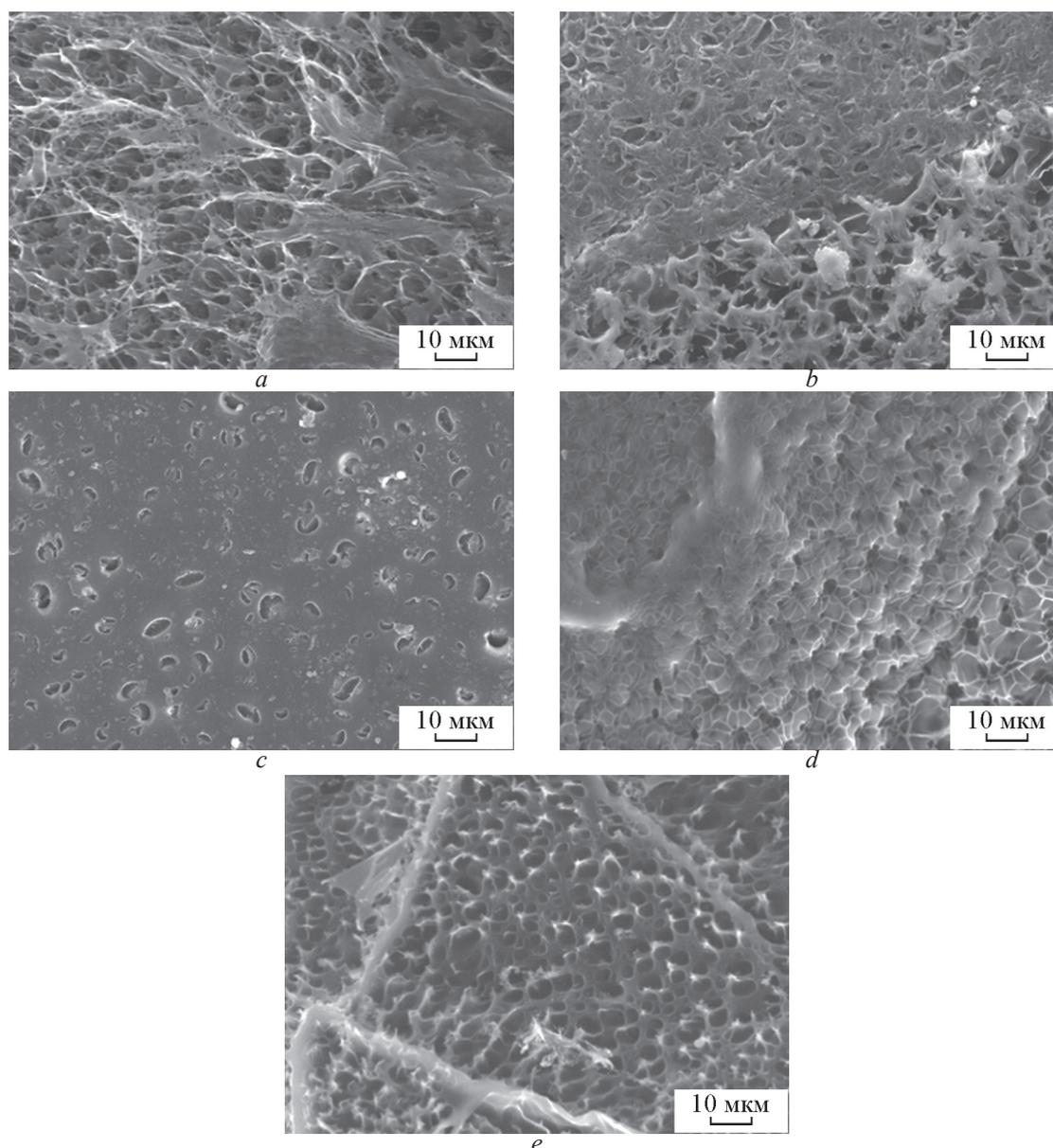


Рис. 5. Микроструктура гелей после сублимационной сушки с разным содержанием ПЭГДА: *a* — 1 %, *b* — 2,5 %, *c* — 5 %, *d* — 10 %, *e* — 35 %.

Fig. 5. The microstructure of the gels after freeze-drying with different PEGDA contents: *a* — 1 %, *b* — 2.5 %, *c* — 5 %, *d* — 10 %, *e* — 35 %.

с момента помещения образцов в физраствор кинетическая кривая (особенно для слабосшитых гелей) выходила практически на плато. Скорость диффузии препарата из геля во внешний раствор уменьшалась, что можно объяснить приближением раствора к состоянию насыщения. Таким образом, меньшему содержанию ПЭГДА в составе геля соответствовало быстрое выделение препарата из образцов (как видно из рис. 6*b*, 6*c*, эта тенденция

прослеживается при фотометрии на обеих длинах волн). Такое, на первый взгляд, неожиданное поведение может оказаться последствием нехимического насыщения образцов доксорубицином, то есть внедрения препарата в гидрогель в процессе его физического набухания. Неплотно переплетенная молекулярная сетка, присущая менее сшитым гидрогелям, впитывала больший объем раствора лекарства, обеспечивая закономерное уменьше-

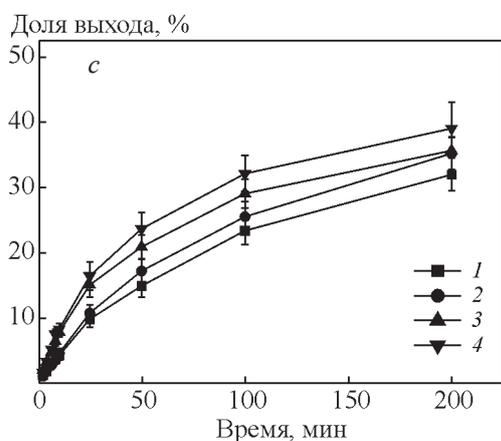
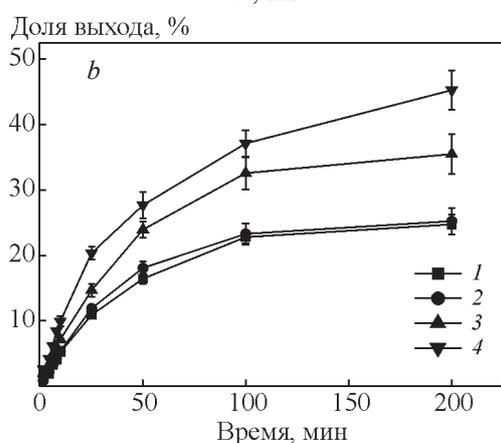
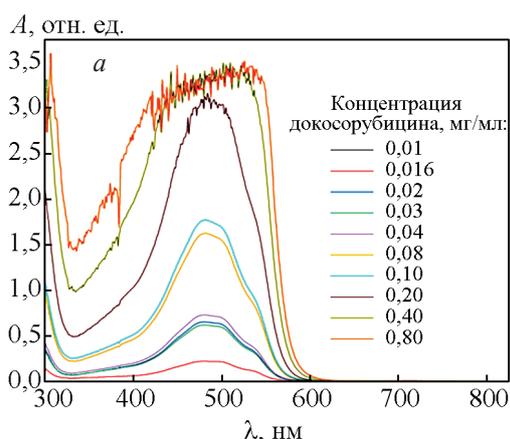


Рис. 6. *a* — оптические спектры растворов доксорубина; *b*, *c* — кинетические кривые выхода доксорубина (метод введения препарата в конструкцию: высушенный гель набухал в растворе доксорубина) при 25 °С; содержание ПЭГДА см. в табл.1, полученные при: *b* — 400 нм, *c* — 480 нм. 1–4 — образцы 1–4.

Fig. 6. *a* — UV/Vis spectra of doxorubicin solutions; *b*, *c* — kinetic yield curves of doxorubicin (method of injecting the drug into the construct: the dried gel swelled in a solution of doxorubicin) at 25 °C; PEGDA content, see table 1, obtained at: *b* — 400 nm; *c* — 480 nm. 1–4 — samples 1–4.

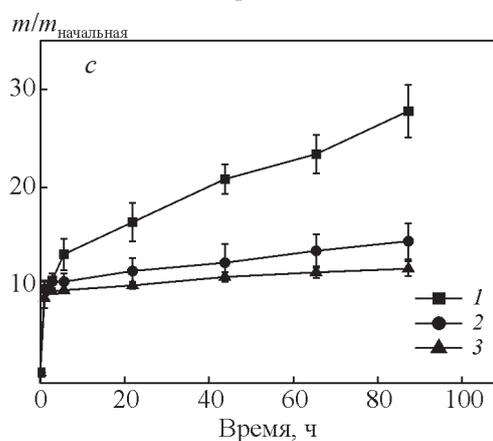
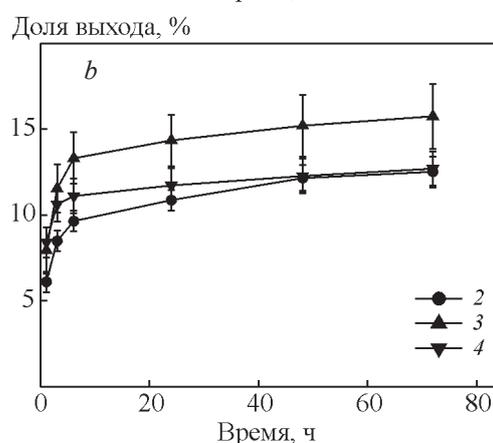
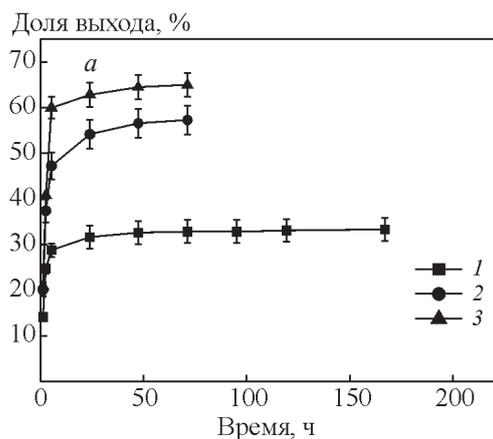


Рис. 7. Кинетические кривые выхода доксорубина из конструкций с различным содержанием ПЭГДА в геле (в масс. %: 1 — 0,625, 2 — 2,5, 3 — 5, 4 — таблетка) в динамических условиях при 37 °С: *a* — способ введения — доксорубин в геле, *b* — способ введения — доксорубин в керамической таблетке, *c* — набухание гелей.

Fig. 7. Kinetic curves of the yield of doxorubicin from constructs with different PEGDA contents in the gel (in wt.%: 1 — 0.625, 2 — 2.5, 3 — 5, 4 — tablet) under dynamic conditions at 37 °C: *a* — the route of administration is doxorubicin in the gel, *b* — the route of administration is doxorubicin in a ceramic pellet, *c* — swelling of the gels.

ние концентрации вышедшего доксорубина от первого состава к четвертому. С другой стороны, низкая структурированность замедляла диффузию молекул из слоя гидрогеля в раствор ввиду наличия механических затруднений. По данной причине доксорубин высвобождался дольше из менее сшитых гелей, что соответствует росту выхода препарата от первого состава к четвертому.

В динамических условиях кинетические кривые выхода доксорубина (рис. 7а, 7б) из конструкций с гелевым слоем, содержащим различное количество сшивающего агента ПЭГДА, демонстрируют отмеченные ранее тенденции. Менее сшитый и, следовательно, сильнее набухающий гель (рис. 7с), замедляет выход препарата в сравнении с сильнее сшитыми гелями. Следует отметить, что более сильная сорбция и, соответственно, более слабая отдача сильно набухающими гелями отмечалась в литературе и ранее. Это объясняют рядом причин: а) специфической плохо организованной структуре слабосшитых гелей, б) осмотический поток растворителя, направленный в гель, в) выравнивание концентрации препарата в сильно разбухающем геле и окружающем растворе.

Отметим, что в ситуации, когда гель выполняет роль диффузионно-тормозящего слоя (рис. 7б), а препарат содержится в керамической таблетке, наличие гелевого слоя не слишком сильно влияет на скорость выхода, хотя она заметно снижается в том случае, когда препарат находится исходно в гелевом слое (рис. 7а). Таким образом, лимитирующей стадией здесь является выход препарата из фосфатной керамики. Визуально, таблетки остаются окрашенными в красный цвет и после 2-х недельного эксперимента. Это говорит о наличии специфической сорбции доксорубина на ТКФ (по-видимому, хемосорбции). Если к раствору доксорубина в воде прилить раствор, содержащий более 50 мМ фосфата, то выпадает крупноволокнистый красный осадок (по-видимому, гидрофосфата доксорубина). Подобный факт не отражен в литературе, хотя достаточно активно обсуждается в частном порядке исследователями, работающими с этим препаратом.

В целом, выход препарата из изготовленных конструкций характеризуется быстрой стадией, длящейся до 10 ч в течение которых выходит от 10 % (при помещении препарата в керамику) до 60 % (препарат в слабосшитом гелевом слое). Далее следует медленная стадия выхода, длительность которой определяется или полной деградацией геля (несколько суток при уровне сшивки 1 %) или резорбцией ТКФ (не менее полугода).

Выводы

Разработаны модельные гибридные тканеинженерные конструкции, предназначенные для регенерации костных дефектов и состоящие из резорбируемой керамической основы (ТКФ), покрытой слоем гидрофильного биodeградируемого полимера.

Биосовместимость керамики оценивали в тестах *in vitro* с использованием культур клеток фибробластов человека.

Для повышения терапевтического потенциала создаваемые модельные конструкции насыщали противоопухолевым препаратом доксорубином в составе покрытия из УФ-полимеризуемого гидрогеля на основе полиакриламида/полиэтиленгликольдиакрилата (ПАА/ПЭГДА).

Кинетику высвобождения лекарственного средства изучали методами спектрофотометрии с использованием растворов, моделирующих физиологические жидкости внеклеточной среды организма. Исследуемые гибридные конструкции обладали низкой цитотоксичностью. Выход препарата из изготовленных конструкций характеризовался быстрой стадией, длящейся до 10 ч, в течение которых выходило от 10 % (при помещении препарата в керамику) до 60 % (препарат в слабосшитом гелевом слое). Далее следовала медленная стадия выхода, длительность которой определялась или полной деградацией геля или резорбцией ТКФ.

Полученные результаты демонстрируют технологическую возможность создания функционализированных остеокондуктивных имплантатов на основе фосфатов кальция, пригодных для локальной доставки противоопухолевых препаратов.

Работы выполнены в рамках гранта РФФИ 18-29-11070_мк с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского университета.

Литература

1. Porter J.R., Ruckh T.T., Popat K.C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog., 2009, vol. 25, pp. 1539 – 1560.
2. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИРЦ” Минздрава России, 2017, 250 с.
3. Gdowski A.S., Ranjan A., Vishwanatha J.K. Current concepts in bone metastasis, contemporary therapeutic

- strategies and ongoing clinical trials. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2017, v. 36(1):108, pp. 1 – 13
4. Miura S., Mii Y., Miyauchi Y. et al. Efficacy of slow-releasing anticancer drug delivery systems on transplantable osteosarcomas in rats. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1995, v. 25, no. 3, pp. 61 – 71.
 5. Шишацкая Е.И., Горева А.В., Кузьмина А.М. Исследование лекарственной эффективности доксорубина, депонированного в микрочастицы из резорбируемого “Биопластотана”, на лабораторных животных с солидной формой карциномы Эрлиха. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012, т. 154, № 12, с. 741 – 745.
 6. Ievlev V.M., Putlyayev V.I., Safronova T.V., Evdokimov P.V. Additive technologies for making highly permeable inorganic materials with tailored morphological architectonics for medicine. *Inorganic Materials*, 2015, v. 51, no. 13, pp. 1295 – 1313.
 7. Путияев В.И., Евдокимов П.В., Мамонов С.А., Зорин В.Н., Климашина Е.С., Родин И.А., Сафронова Т.В., Гаршев А.В. Стереолитографическая 3D-печать биокерамических матриц заданной формы и архитектуры для регенерации костной ткани. *Перспективные материалы*, 2019, № 5, с. 28 – 40.
 8. Kargupta R., Bok S., Darr C.M., Crist B.D., Gangopadhyay K., Gangopadhyay Sh., Sengupta S. Coatings and surface modifications imparting antimicrobial activity to orthopedic implants. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.*, 2014, v. 6, pp. 475 – 495.
 9. Бронич Т.К. Полимерные наногели: новые биоматериалы для доставки лекарств от рака. *Вестник Казанского технологического университета*, 2014, т. № 3, с. 175 – 178.
 10. Sivashanmugam A., Arun Kumar R., Visnu Priya M. et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 2015, v. 72, pp. 543 – 565.
 11. Anuj Kumar, Kummara Madhusudana Rao, Sung Soo Han. Synthesis of mechanically stiff and bioactive hybrid hydrogels for bone tissue engineering applications. *Chemical Engineering Journal*, 2017, v. 317, p. 119 – 131.
 12. ГОСТ ISO 10993-5-2011 “Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro”. М., Стандартинформ, 2014.
 13. Benedikt S., Wang J., Markovic M., Moszner N., Dietliker K., Ovsianikov A., Gruetzmacher H., R. Liska. Highly Efficient Water-Soluble Visible Light Photoinitiators. *J. Polymer Sci., Part A: Polymer Chemistry*, 2016, v. 54, pp. 473 – 479.
 - Engineers Biotechnol. Prog., 2009, vol. 25, pp. 1539 – 1560.
 2. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. *Zlokachestvennie novoobrazovaniya v Rossii v 2015 godu (zabolevayemost i smertnost)* [Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality)]. Moscow, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Center Publ., 2017, 250 p.
 3. Gdowski A.S., Ranjan A., Vishwanatha J.K. Current concepts in bone metastasis, contemporary therapeutic strategies and ongoing clinical trials. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2017, vol. 36(1) 108, pp. 1 – 13.
 4. Miura S., Mii Y., Miyauchi Y. et al. Efficacy of slow-releasing anticancer drug delivery systems on transplantable osteosarcomas in rats. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1995, vol. 25, no. 3, pp. 61 – 71.
 5. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kuzmina A.M. Issledovaniye lekarstvennoy effektivnosti doksorubicina, deponirovannogo v mikrochastici iz rezorbiруемого “Bioplastotana”, na laboratornih zhitovnih s solidnoy formoy karcinomi Erlicha [Study of the efficiency of doxorubicin deposited in microparticles from resorbable Bioplastotane™ on laboratory animals with Ehrlich’s solid carcinoma]. *Bulleten’ eksperimentalnoy biologii i medicini — Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, vol. 154, pp. 773 – 777.
 6. Ievlev V.M., Putlyayev V.I., Safronova T.V., Evdokimov P.V. Additive technologies for making highly permeable inorganic materials with tailored morphological architectonics for medicine. *Inorganic Materials*, 2015, vol. 51, no. 13, pp. 1295–1313.
 7. Putlyayev V.I., Yevdokimov P.V., Mamonov S.A., Zorin V.N., Klimashina E.S., Rodin I.A., Safronova T.V., Garshev A.V. Stereolitograficheskaya 3D-pechat biokeramicheskikh matriksov zadannoy formi i arkhitekturi dlya regeneratsii kostnoy tkani [Stereolithographic 3D printing of bioceramic scaffolds of a given shape and architecture for bone tissue regeneration]. *Perspektivnye Materialy — Inorganic Materials: Applied Research*, 2019, vol. 10, no. 5, pp. 1101 – 1108.
 8. Roli Kargupta, Sangho Bok, Charles M. Darr, Brett D. Crist, Keshab Gangopadhyay, Shubhra Gangopadhyay, Shramik Sengupta. Coatings and surface modifications imparting antimicrobial activity to orthopedic implants. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.*, 2014, vol. 6, pp. 475 – 495.
 9. Bronich T.K. Polimerniye nanogeli: noviye biomateriali dlya dostavki lekarstv ot raka [Polymeric nanogels: new biomaterials for delivering of anticancer drugs]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta — Herald of Kazan Technological University*, 2014, vol. 17, no. 3, pp. 175 – 178.
 10. Sivashanmugam A., Arun Kumar R., Visnu Priya M. et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 2015, vol. 72, pp. 543 – 565.

11. Anuj Kumar, Kummara Madhusudana Rao, Sung Soo Han. Synthesis of mechanically stiff and bioactive hybrid hydrogels for bone tissue engineering applications. *Chemical Engineering Journal*, 2017, vol. 317, pp. 119 – 131.
12. GOST [State Standard] ISO 10993-5-2011: Medical Devices, Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity, Moscow, Standartinform Publ., 2014.
13. Benedikt S., Wang J., Markovic M., Moszner N., Dietliker K., Ovsianikov A., Gruetzmacher H., Liska R. Highly efficient water-soluble visible light photoinitiators. *J. Polymer Sci., Part A: Polymer Chemistry*, 2016, vol. 54, pp. 473 – 479.

*Статья поступила в редакцию — 6.06.2019 г.
после доработки — 26.06.2019 г.
принята к публикации — 27.06.2019 г.*

Каралкин Павел Анатольевич — Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, специалист в области биологических испытаний биоматериалов. E-mail: pkaralkin@gmail.com.

Сергеева Наталья Сергеевна — Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3), доктор биологических наук, профессор, заведующая отделением, специалист в области биологических испытаний биоматериалов и исследования опухолеассоциированных серологических маркеров. E-mail: prognoz.01@mail.ru.

Свиридова Ирина Константиновна — Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области биологических испытаний биоматериалов. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Кирсанова Валентина Александровна — Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3), кандидат биологических наук, научный сотрудник, специалист в области биологических испытаний биоматериалов. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Ахмедова Сурая Абдуллакызы — Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3), кандидат биологических наук, научный сотрудник, специалист в области биологических испытаний биоматериалов. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Шанский Ярослав Дмитриевич — Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 3), кандидат биологических наук, научный сотрудник, специалист в области биологических испытаний биоматериалов. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Леонтьев Николай Владимирович — Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет), студент, область интересов — гибридные биоматериалы. E-mail: ganzauskas@yandex.ru.

Зуев Дмитрий Михайлович — Факультет наук о материалах Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 73, ГСП-1, МГУ, факультет наук о материалах), аспирант, область интересов — неорганические и гибридные биоматериалы. E-mail: zuev.dmitri@gmail.com.

Климашина Елена Сергеевна — Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет), кандидат химических наук, научный сотрудник, специалист в области химии неорганических материалов. E-mail: klimashina@inorg.chem.msu.ru.

Евдокимов Павел Владимирович — Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет), кандидат химических наук, младший научный сотрудник, специалист в области химии неорганических материалов. E-mail: pavel.evdokimov@gmail.com.

Путляев Валерий Иванович — Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет), кандидат химических наук, доцент, специалист в области химии неорганических материалов. E-mail: valery.putlayev@gmail.com

Hybrid tricalcium phosphate/hydrogel constructs functionalized with an antitumor drug for bone tissue regeneration

**P. A. Karalkin, N. S. Sergeeva, I. K. Sviridova, V. A. Kirsanova,
S. A. Akhmedova, Ya. D. Shansky, N. V. Leontyev, D. M. Zuyev, E. S. Klimashina,
P. V. Yevdokimov, V. I. Putlyaev**

Hybrid materials designed for the regeneration of bone defects and consisting of a resorbable ceramic base (tricalcium phosphate - TCP) coated with a layer of hydrophilic biodegradable polymer have been developed. Ceramics biocompatibility was evaluated through vitro tests using cultures of human skin fibroblasts. To increase the therapeutic potential, the created model structures were saturated with the antitumor drug doxorubicin in the composition of the coating of UV-polymerizable hydrogel based on polyacrylamide / polyethylene glycol diacrylate (PAA / PEGDA). The kinetics of drug release was studied by spectrophotometry using Ringer's solution. The studied hybrid constructs had good cytotoxicity. Saturation of the structures with an antitumor drug led to its prolonged release. The results demonstrate the technological feasibility of creating osteoconductive implants based on calcium phosphates suitable for local delivery of antitumor drugs.

Keywords: hybrid biomaterials, tricalcium phosphate, biodegradation, hydrogels, doxorubicin, local drug delivery.

Karalkin Pavel — P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia (3, 2nd Botkinsky drive, Moscow, 125284), PhD (Med), senior researcher, expert in biology tests of biomaterials. E-mail: pkaralkin@gmail.com.

Sergeeva Natalia — P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia (3, 2nd Botkinsky drive, Moscow, 125284), Dr Sci, professor, head of Department, expert in biology tests of biomaterials and study of tumor-associated serological markers. E-mail: prognoz.01@mail.ru.

Sviridova Irina — P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRRC of the Ministry of Health of Russia (3, 2nd Botkinsky drive, Moscow, 125284), PhD (Biol), leading researcher, expert in biology tests of biomaterials. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Kirsanova Valentina — P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRRC of the Ministry of Health of Russia (3, 2nd Botkinsky drive, Moscow, 125284), PhD (Biol), researcher, expert in biology tests of biomaterials. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Akhmedova Suraya — P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRRC of the Ministry of Health of Russia (3, 2nd Botkinsky drive, Moscow, 125284), PhD (Biol), researcher, expert in biology tests of biomaterials. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Shansky Yaroslav — P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRRC of the Ministry of Health of Russia (3, 2nd Botkinsky drive, Moscow, 125284), PhD (Biol), researcher, expert in biology tests of biomaterials. E-mail: prognoz.06@mail.ru.

Leontiev Nikolay — Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1, bd.3, GSP-1, MSU, Chemistry Department), student, fields of interests — hybrid biomaterials. E-mail: ganzauskas@yandex.ru.

Zuev Dmitry — Lomonosov Moscow State University, Department of Materials Science (119991, Moscow, Leninski Gori, 1, bd.73, GSP-1, MSU, Chemistry Department), graduated student, field of interests – inorganic and hybrid biomaterials. E-mail: zuev.dmitri@gmail.com.

Klimashina Elena — Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1, bd.3, GSP-1, MSU, Chemistry Department), PhD, researcher, expert in chemistry of inorganic materials. E-mail: klimashina@inorg.chem.msu.ru.

Evdokimov Pavel — Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1, bd.3, GSP-1, MSU, Chemistry Department), PhD (Chem), junior researcher, expert in chemistry of inorganic materials. E-mail: pavel.evdokimov@gmail.com.

Putlayev Valery — Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1, bd.3, GSP-1, MSU, Chemistry Department), PhD (Chem), associated professor, expert in chemistry of inorganic materials. E-mail: valery.putlayev@gmail.com.