

Томашевич Максим Сергеевич

**Математическое моделирование в процессе создания
аппликационных лекарственных средств с использованием
субстанций биотехнологического происхождения**

03.00.23 – биотехнология

Автореферат

диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Москва – 2006

Работа выполнена во Всероссийском научно – исследовательском институте
лскаренных и ароматических растений (ВИЛАР)

Научные руководители:

академик РАМН и РАСХН,

доктор технических наук

доктор фармацевтических наук

Быков В.А.

Кривошеев С.А.

Официальные оппоненты:

Доктор технических наук, профессор

Кандидат биологических наук

Винаров А.Ю.

Оганесян Е.А.

Ведущая организация:

Московский Государственный Университет Инженерной Экологии, Кафедра
«Экологическая и промышленная биотехнология»

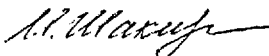
Защита состоится «19» декабря в «10³⁰» часов на заседании диссертационного
совета ДМ 212.204.13 при Российском химико-технологическом университете
им. Д.И. Менделеева по адресу: 125047: Москва, Миусская пл. д. 9, аудитория
443.

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-библиотечном центре
РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат разослан « 8 » ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ДМ 212.204.13

кандидат технических наук



Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. Биотехнологические методы исследования занимают в последние годы значительное место при разработке и конструировании аппликационных лекарственных средств (АПЛС) [Prats P.A. et al., 2002; Kanematsu A. et al., 2004]. АПЛС, содержащие биологически активные вещества (БАВ) биотехнологического происхождения, активно применяются при ожогах, лечении ран различной этиологии, кожных болезнях и ряда соматических заболеваний [King M.J. et al., 2002, 2003 ; Engl T. et al., 2004; Dogan A.K. et al., 2005].

Однако получение АПЛС с необходимым терапевтическим эффектом затруднено сложным характером взаимодействия биологически активных и вспомогательных веществ с различными структурами кожного покрова, отсутствием чётких концентрационных и временных характеристик транспорта БАВ из АПЛС и ряда других процессов.

Применение методов математического и компьютерного моделирования с учетом физико-химических и, в том числе, диффузионных параметров БАВ, морфо-функциональных особенностей кожного покрова дает возможность определить ряд основных показателей разрабатываемого АПЛС, усовершенствовать технологию его конструирования и получения ещё до проведения сложных медико-биологических экспериментов. Это особенно актуально в тех случаях, когда в качестве лекарственных препаратов для АПЛС выступают вещества биотехнологического происхождения, такие как рекомбинантные цитокины, плазмиды, антисмысловые олигонуклеотиды, получение которых требует значительных энергетических и экономических затрат.

В связи с этим целью настоящего диссертационного исследования являлась разработка методов математического и компьютерного моделирования для описания транспорта БАВ и их применение в процессе создания АПЛС с

использованием субстанций биотехнологического происхождения (на примере фактора роста эпидермиса человека - чЭФР).

В задачи настоящего исследования вошли:

- 1) Отработка условий культивирования и хранения рекомбинантного штамма *Escherichia coli* - продуцента чЭФР.
- 2) Изучение биологических свойств цитокина, отражающих особенности взаимодействия чЭФР с клетками эпидермиса с целью использования полученных данных при конструировании АПЛС.
- 3) Моделирование процесса доставки БАВ в кожу с учётом морфо-функциональных особенностей кожного покрова.
- 4) Создание математических моделей и компьютерных программ, позволяющих прогнозировать параметры АПЛС на основе биологических свойств чЭФР.
- 5) Разработка методики расчёта времени пропитывания АПЛС для достижения необходимой концентрации БАВ с помощью математического и компьютерного моделирования.
- 6) Оптимизация на основе разработанных математических моделей технологических условий конструирования АПЛС и проверка их ранозаживляющих свойств.

Научная новизна работы. На примере использования в качестве БАВ биотехнологического происхождения рекомбинантного белка чЭФР впервые проведено математическое и компьютерное моделирование диффузионных процессов для прогнозирования основных параметров АПЛС с регулируемым высвобождением лекарственных препаратов. Предложена двухслойная математическая модель и ее программное обеспечение для изучения транспорта БАВ в кожу с учётом морфо-функциональных особенностей кожного покрова. С помощью математической модели АПЛС, используемых в качестве раневых покрытий, определены начальная концентрация цитокина в лекарственной

форме, ее оптимальные размеры, диапазон коэффициентов диффузии, обеспечивающих необходимую плотность потока ЭФР. Созданы математические модели и компьютерные программы, позволяющие рассчитывать время пропитывания носителя, необходимое для получения заданной концентрации веществ в АПЛС при различных технологических условиях. Изучены оптимальные условия культивирования и режим хранения рекомбинантного штамма *Escherichia coli* - продуцента чЭФР.

Научно-практическая значимость. Предложенный в диссертации подход и разработанная методология построения математических моделей и компьютерных программ позволяют осуществлять выбор оптимальных параметров при конструировании АПЛС с использованием БАВ биотехнологического происхождения еще до проведения медицинских экспериментов, что снижает затраты на их доклиническую разработку и испытание. Экспериментально обоснованные условия культивирования и хранения, обеспечивают гарантированное получение лекарственной субстанции. На основе результатов математического и компьютерного моделирования разработана схема конструирования и созданы АПЛС, содержащие чЭФР, обладающие ранозаживляющими свойствами. Математическая модель, построенная с учетом морфо-функциональных особенностей кожного покрова, дает возможность перехода на новую технологию применения АПЛС, позволяющую прогнозировать время и условия их использования. Предложенные модели могут быть также использованы в косметологии, парфюмерии, стоматологии для анализа процессов проницаемости БАВ в различные ткани организма, количественной оценки риска чужеродного проникновения токсических веществ и химических соединений. Полученные результаты могут лечь в основу одного из перспективных направлений в биомедицинской технологии – компьютерному

конструированию аппликационных лекарственных средств нового поколения, использоваться в производстве АПЛС с ранозаживляющими свойствами.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на XI и XII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» 2004-2005гг., 3 Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспектива развития» 2005г. г. Москва, 3 Российской конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов» 2005г. г. Москва, 3-4 Всероссийской конференции по «Биомедицинской технологии» 2005-2006гг. г. Москва.

Публикация результатов исследования. Основные результаты диссертации опубликованы в 6 статьях и 4 тезисах.

Связь исследования с федеральными научными программами и планами НИР. Диссертационная работа соответствует одному из «Приоритетных направлений и Критических технологий федерального уровня», утверждённых Президентом РФ 30.03.02г. «Компьютерное моделирование», а также приоритетным направлениям по отделению медико-биологических наук РАМН и МЗ РФ на 2000-2005 гг. «Разработка новых лекарственных средств с помощью современных методов и создание биомедицинских технологий коррекции состояния организма»; и на 2006-2010гг. «Разработка новых оригинальных лекарственных средств». Исследование проводилось согласно плану теоретических и прикладных НИР ВИЛАР.

Положения, выносимые на защиту.

- Условия культивирования и хранения рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента чЭФР, обеспечивающие гарантированное получение лекарственной субстанции.
- Методология применения математического и компьютерного моделирования для прогнозирования базовых свойств АПЛС с

использованием субстанций биотехнологического происхождения (на примере чЭФР).

- Анализ диффузионных процессов транспорта БАВ в кожу с учетом морфо-функциональных особенностей кожного покрова на базе двухслойной математической модели и её программного обеспечения.
- Математическая модель, построенная на основе результатов исследования биологических свойств чЭФР, для прогнозирования параметров АПЛС, используемых в качестве раневых покрытий.
- Методика расчёта времени пропитывания АПЛС для достижения необходимой концентрации БАВ с помощью математического и компьютерного моделирования.
- Схема конструирования АПЛС, содержащих чЭФР, с заданными диффузионными параметрами и результаты проверки их ранозаживляющих свойств.

Объём и структура диссертации Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, пяти разделов результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, в который вошли 280 работ, в том числе 60 русских и 220 иностранных авторов. Диссертация написана на 164 страницах, имеет 19 таблиц и 20 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты. Материалы и методы исследования.

В работе использован рекомбинантный штамм *Escherichia coli*, любезно предоставленный нам разработчиками [Батчикова Н.В. и др., 1992]. Параметры роста культуры определяли по общепринятой схеме [Шлегель Г., 1987] на среде М9 (Na_2HPO_4 – 6 г, KH_2PO_4 – 3 г, NaCl – 0,5 г, NH_4Cl – 1 г, 1М MgSO_4 – 2 мл, 20% глюкоза – 10 мл, 1М CaCl_2 – 0,1 мл, тиамина хлорида – 5 мг, агар – 15 г, H_2O – до 1 л) или LB (триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 10 г,

тиамина хлорида – 5 мг, ампициллин – 50 мг, H₂O – до 1 л). Выделение чЭФР их периплазматической фракции проводили по ранее описанному методу, индуцируя экспрессию цитокина изопропил-1 β -D-тиогалактозидом (IPTG) [Батчикова Н.В. и др., 1992]. Культуру хранили при температуре жидкого азота, используя в качестве криопротектора 20% раствор глицерина. Количество плазмидных (ПК) и бесплазмидных клеток (БПК) определяли высевом на селективные (среда М9 + 50 мг/л ампициллина) и неселективные (среда М9) среды соответственно [Яковлева М.Б. и др., 2003]. Полученный препарат чЭФР анализировали с помощью ВЭЖХ, диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Проверку его биологической активности *in vitro*, выполнялась на базальных клетках биопсийной кожи человека [Вещикова Е.В., 1999].

Составление математических моделей, описывающих процессы диффузии БАВ, проводили на основе дифференциальных уравнений, отражающих второй закон Фика а их аналитическое решение выполняли методом разделения переменных [Фарлоу С., 1985]. Программирование проводили в среде Borland C++Builder [Tendon S., 1992]. Коэффициенты диффузии определяли при нанесении на поверхность полимеров тонкого слоя диффузанта и последующем послойном анализе его распределения [Солунский В.И., Радченков А.П., 1969]. Проверку сходимости экспериментальных и расчетных данных проводили, используя ПААГ с различными коэффициентами диффузии для чЭФР. Ранозаживляющее действие полученных АПЛС, содержащих чЭФР, проверяли на крысах используя модели кожных ран с асептическим воспалением [Чекмарева И.А. и др., 2004]. Статистическую обработку результатов проводили на ПК с помощью пакета статистических программ MS Excel 2000 приложения.

Оптимизация условий культивирования и хранения рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента чЭФР.

Для конструирования АПЛС, содержащих чЭФР, и изучения биологических свойств цитокина необходимым условием является гарантированное получение

самой лекарственной субстанции с использованием рекомбинантных микроорганизмов. При работе с такими биообъектами необходимо решать целый ряд экспериментальных задач, основными из которых являются оптимизация условий культивирования микроорганизмов, обеспечивающая максимальную продуктивность и разработка методов консервации для сохранения биосинтетических свойств продуцента.

На основе анализа параметров роста рекомбинантного штамма *Escherichia coli* нами установлено, что оптимальными условиями культивирования является среда LB и температура 37°C (табл.1).

Таблица 1. Параметры роста рекомбинантного штамма *E.coli* при различных условиях культивирования.

Параметры роста Культуры	Среда			
	LB		M9	
	37°C	26°C	37°C	26°C
Время перехода к стационарной фазе роста, ч	22	24	24	40
Длительность лаг-фазы, ч	0,5	2	2	4
Константа скорости роста, ч ⁻¹	0,64±0,06	0,41±0,05	0,37±0,03	0,22±0,03
Время удвоения, ч	1,08±0,10	1,69±0,21	1,87±0,15	3,15±0,42
Сухая биомасса, г/л	2,14±0,10	1,74±0,09	1,95±0,09	1,83±0,07

Максимальная продуктивность наблюдалась при внесении индуктора в первой половине экспоненциальной фазы роста, длительности культивирования с индуктором – 6 ч (табл. 2) и его концентрации от 0,5 до 1 mM (табл. 3). Распространённый способ поддержания культур - пересев на агаризованных средах не позволил сохранить скорость роста, количество плазмидных клеток и продуктивность штамма. В связи с этим были разработаны 2 метода консервации рекомбинантных клеток *E.coli* при температуре жидкого азота позволяющие сохранить плазмидные клетки и обеспечить стабильность биосинтетических свойств продуцента (табл.4).

Таблица 2. Продуктивность рекомбинантного штамма *E.coli* при различных условиях внесения индуктора (мг/л).*

Фаза роста	Время культивирования с индуктором, ч					
	2	4	6	8	16	24
Ранняя экспоненциальная ($A_{600} = 0,7$)	1,3±0,1	1,8±0,2	2,5±0,2	2,0±0,3	0,50±0,04	< 0,1
Поздняя экспоненциальная ($A_{600} = 2,4$)	1,2±0,1	1,6±0,2	1,5±0,2	1,0±0,1	0,30±0,04	< 0,1
Стационарная	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

*- концентрация индуктора 1 мМ.

Таблица 3. Влияние концентрации индуктора на продуктивность рекомбинантного штамма *E.coli*. *

Концентрация индуктора, мМ	Продуктивность, мг/л
2	2,5±0,1
1	2,6±0,2
0,5	2,3±0,2
0,4	2,1±0,1
0,2	1,2±0,1

*- условия внесения индуктора: ранняя экспоненциальная фаза роста, время культивирования с индуктором 6 ч.

Таблица 4. Параметры роста культуры, соотношение ПК/БПК и продуктивность рекомбинантного штамма *E.coli* после криоконсервации*

Время хранения, сут	1 вариант криоконсервации			2 вариант криоконсервации		
	Константа скорости роста, ч ⁻¹	Продуктивность, мг/л	ПК/БПК	Константа скорости роста, ч ⁻¹	Продуктивность, мг/л	ПК/БПК
До хранения	0,70±0,07	2,6±0,2	8,5	0,70±0,07	2,6±0,2	8,5
10	0,80±0,05	2,5±0,3	8,4	0,75±0,07	2,7±0,3	8,0
60	0,85±0,06	2,7±0,3	9,0	0,80±0,06	2,7±0,3	8,0
360	0,85±0,06	2,5±0,2	8,3	0,80±0,07	2,6±0,3	9,0

*- засевалось 10^{10} жизнеспособных клеток.

Таким образом, отработаны условия культивирования и хранения рекомбинантного штамма *E.coli*, обеспечивающие синтез и секрецию чЭФР, что позволило приступить к следующим этапам исследования: выявлению

основных биологических свойств цитокина, отражающих особенности взаимодействия ЭФР с базальными клетками эпидермиса и математическому моделированию процессов его транспорта.. Показано, что инкубация суспензии базальных клеток эпидермиса в присутствии ЭФР (60 нанограм/мл) в течение 3-4 ч приводит к стимуляции синтеза ДНК в среднем на 30-33%.

Моделирование диффузионных процессов транспорта БАВ в кожу с учётом морфо-функциональных особенностей кожного покрова.

Следующим этапом работы являлось моделирование диффузионных процессов транспорта чЭФР в кожу с учётом биологических свойств цитокина и морфо – функциональных особенностей кожного покрова. Исследование проводилось на основе двухслойной математической модели структурная схема которой представлена на рис. 1.

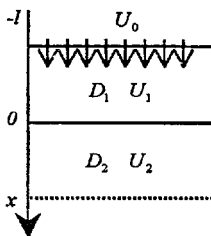


Рис.1 Структурная схема процесса диффузии лекарственного препарата в двухслойной системе тканей.

$-\ell$, 0 - границы слоев; x - расстояние от поверхности (см); D_1 , D_2 - коэффициенты диффузии ($\text{см}^2/\text{сек}$); U_0 - концентрация лекарственного препарата, нанесенного на наружную поверхность ($\text{г}/\text{см}^3$); U_1 , U_2 - концентрация диффундирующего вещества в первом и во втором слое ($\text{г}/\text{см}^3$); $-\ell < x < 0$ - первый слой, $x > 0$ - второй слой.

Первый слой – роговой слой, второй слой – клеточные элементы эпидермиса и дерма. Такое разделение целесообразно при изучении транспортных процессов связанных с лиганд – рецепторным эндоцитозом. При этом второй

слой представлен как полу бесконечная среда, т.е. среда в которой происходит постоянный отток БАВ [Tojo K. et al., 1985].

Аналитическое решение системы уравнений, удовлетворяющее начальным, граничным условиям и условиям сопряжения, определяется следующими выражениями [Райченко А.И., 1981]:

$$U_1 = U_0 \sum_{n=0}^{\infty} \alpha^n \left[\operatorname{erfc} \frac{(2n+1)(\ell+x)}{2\sqrt{D_1 t}} - \alpha \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)(\ell-x)}{2\sqrt{D_1 t}} \right]; -\ell < x < 0 \quad (1)$$

$$U_2 = \frac{2U_0\omega}{\omega+1} \sum_{n=0}^{\infty} \alpha^n \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)\ell + \omega x}{2\sqrt{D_1 t}}; x > 0 \quad (2) \quad \text{где } \omega = \sqrt{\frac{D_1}{D_2}}; \alpha = \frac{1-\omega}{1+\omega}$$

Концентрацию на границе полубесконечной среды можно получить, приняв в

формуле (2) $x=0$.
$$U_2 = \frac{2U_0\omega}{\omega+1} \sum_{n=0}^{\infty} \alpha^n \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)\ell}{2\sqrt{D_1 t}} \quad (3)$$

Общее количество диффузанта $-Q(t)$ г/см², поступившего за время t (сек) в среду через единицу поверхности на границе $x=-\ell$, рассчитывается по формуле:

$$\frac{Q(t)}{U_0\ell} = 2 \left(\frac{D_1 t}{\pi \ell^2} \right)^{\frac{1}{2}} \left[1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \alpha^n \exp \left(-\frac{n^2 \ell^2}{D_1 t} \right) \right] - 4 \sum_{n=1}^{\infty} n \alpha^n \operatorname{erfc} \frac{n\ell}{\sqrt{D_1 t}} \quad (4)$$

Указанная модель и разработанная на её основе компьютерная программа позволяют: - рассчитать концентрацию биологически активных соединений в любой точке кожи; - определить зависимость концентрационных профилей от времени; - рассчитать общее количество продиффундирующего вещества при его накожном применении. Анализ полученных результатов показал, что в условиях неповрежденного рогового слоя с низкими коэффициентами диффузии для белков и пептидов 10^{-10} см²/сек и ниже диффузانت практически не проникает в кожу. Относительная концентрация 0,04 U_0 в точке $x=0,2$ см (сосочковый слой дермы) будет соответственно достигнута только через 10 суток обработки. Далее исследовались процессы транспорта чЭФР из АПЛС для использования в качестве раневых покрытий при повреждениях кожи.

**Разработка математической модели и программного обеспечения
для прогнозирования основных параметров АПЛС, содержащих чЭФР.**

Процесс диффузии из АПЛС моделировался с помощью однослойной системы, представленной на рис.2. Особенностью модели являлось то, что на границе АПЛС-раневая поверхность, концентрация вещества в течение всего процесса приравнивалась нулю, так называемая «связывающая граница». Введение данного граничного условия связано с тем, что одним из свойств ЭФР является широкий арсенал клеток различных тканей, с рецепторами которых он активно взаимодействует. В условиях раневой поверхности, насыщенной большим количеством клеточных элементов, это приводит к быстрому и полному связыванию ростового фактора [Prats P.A. et al., 2002].

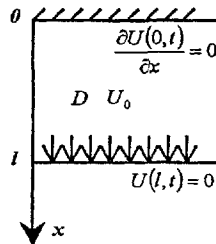


Рис.2. Структурная схема модели процесса диффузии из АПЛС в подлежащие ткани.

D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{сек}$); $0, l$ – наружная и внутренняя границы АПЛС; x – расстояние от наружной границы АПЛС вглубь ткани (см).

Для описания процесса диффузии БАВ из АПЛС использовалось уравнение с частными производными параболического типа (5). Задача сводилась к нахождению решения уравнения (5), удовлетворяющего граничным и начальным условиям (6-8). Окончательное решение для определения концентрации БАВ внутри АПЛС имеет вид (9).

$$\frac{\partial U(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 U(x,t)}{\partial x^2} \quad (5)$$

где $U(x, t)$ – концентрация диффундирующего вещества (г/см^3) в зависимости от координаты- x (см) и времени- t (сек). D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{сек}$)

$$\frac{\partial U(0, t)}{\partial x} = 0 \quad (6); \quad U(l, t) = 0 \quad (7); \quad U(x, 0) = U_0 \quad (8).$$

$$U(x, t) = \frac{4}{\pi} U_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \left[\frac{2n+1}{2} \pi \frac{x}{l} \right] \cdot \exp \left[\frac{-D\pi^2 (2n+1)^2 t}{4l^2} \right] \quad (9).$$

В связи с особенностями взаимодействия ЭФР с рецепторным аппаратом клеток наибольший интерес представляет изучение плотности потока, особенно на границе АПЛС с подлежащими тканями. Нами были получены математические выражения, определяющие плотность потока в любой точке системы и в точке $x=l$, т.е. на границе АПЛС с раневой поверхностью (10-11).

$$J = 2D \frac{U_0}{l} \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n \sin \left[\frac{2n+1}{2} \pi \frac{x}{l} \right] \cdot \exp \left\{ \frac{-D\pi^2}{4l^2} (2n+1)^2 \cdot t \right\} \quad (10)$$

$$J = 2D \frac{U_0}{l} \sum_{n=0}^{\infty} \exp \left[\frac{-D\pi^2}{4l^2} (2n+1)^2 t \right] \quad (11)$$

где: J ($\text{г/см}^2/\text{сек}$) плотность потока в любой точке системы (10) и в точке $x=l$ (11).

Общее количество продиффундирующего вещества $Q(t)$ с единицы площади АПЛС (г/см^2) в подлежащие ткани с начала процесса до момента времени t (сек), будет определяться выражениями (12-13).

$$Q(t) = \int_0^t J_{x=l}(t) dt \quad (12)$$

$$Q(t) = 8 \frac{U_0 l}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \left\{ 1 - \exp \left[\frac{-D\pi^2}{4l^2} (2n+1)^2 t \right] \right\} \quad (13)$$

На базе математической модели (уравнения - 9-13) была разработана компьютерная программа, позволяющая в широком диапазоне диффузионных параметров изучать процесс диффузии БАВ из АПЛС в условиях раневого повреждения. Программное обеспечение дает возможность рассчитывать и представлять в графическом виде следующие зависимости: - распределение относительной концентрации диффундирующего вещества внутри АПЛС в зависимости от координаты x и времени диффузии; - зависимость плотности

потока из АПЛС различной толщины от времени контакта с подлежащими тканями и коэффициентов диффузии; - зависимость количества продифундировавшего вещества из АПЛС в подлежащие ткани от времени.

Интерфейс программы визуально разделен на 3 смысловые части: набор установок “Общие параметры”, блок “Параметры” и блок “Графики” (Рис 3).

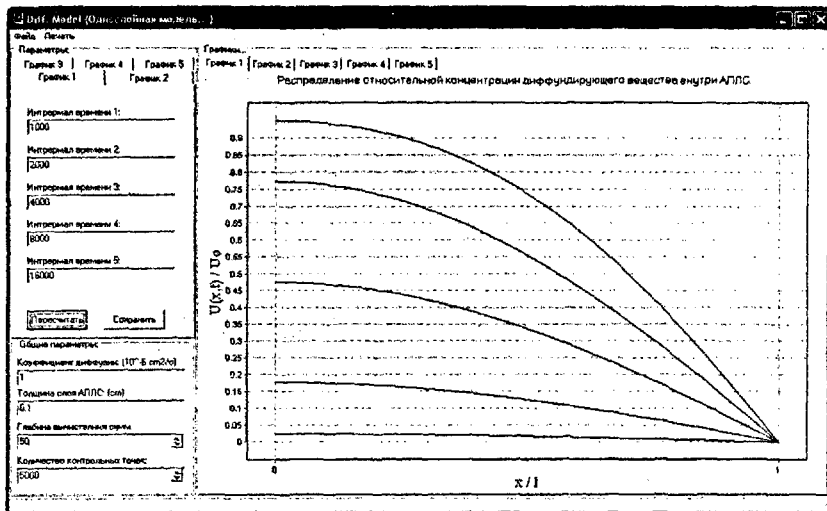


Рис.3. Интерфейс программы моделирования процесса диффузии БАВ из АПЛС с помощью однослойной модели.

Набор установок “Общие параметры” включает в себя четыре устанавливаемые пользователем переменные: поля “Коэффициент диффузии” и “Толщина АПЛС”, целочисленные поля “Глубина вычисления сумм” и “Количество контрольных точек”. Блок “Параметры” состоит из закладок-страниц, позволяющих пользователю изменять основные параметры процесса диффузии и расчетные характеристики. В блоке “Графики” у всех рассматриваемых зависимостей на одном поле отображается набор кривых, что

дает возможность не только численно, но и зрительно (в сравнении) оценить полученные результаты.

С помощью разработанных программ, проведены расчёты концентрационных профилей и параметров процесса диффузии БАВ из АПЛС.

На рис. 4 представлены расчётные кривые зависимости плотности потока из АПЛС различной толщины от времени контакта с подлежащими тканями.

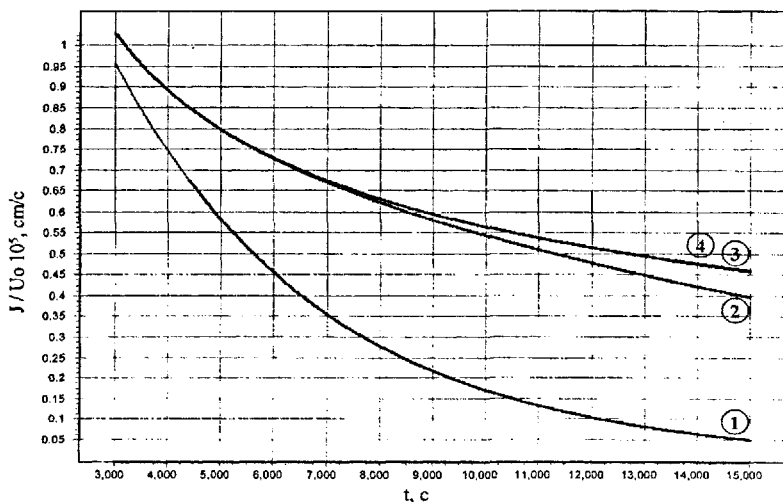


Рис.4 Зависимость относительной плотности диффузионного потока (J/U_0) из АПЛС различной толщины от времени контакта с подлежащими тканями. Толщина АПЛС (см): 1-0,1; 2-0,2; 3-0,3; 4-0,4. $D = 10^{-6} \text{ см}^2/\text{сек}$.

Анализ полученных результатов показывает, что плотность потока диффундирующего вещества из АПЛС снижается с увеличением времени контакта с подлежащими тканями и зависит от толщины раневого покрытия. При увеличении толщины выше 2 мм (кривые 2-4) в течение 3 - 4 часов от начала процесса плотность потока менялась менее значительно, обеспечивая оптимальные условия высвобождения БАВ.

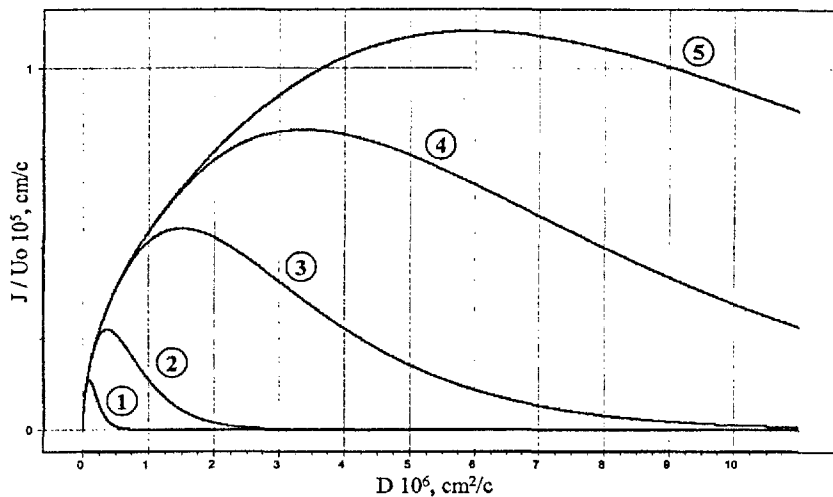


Рис.5. Зависимость относительной плотности потока в подлежащие ткани из АПЛС от коэффициента диффузии лекарственного вещества. Толщина АПЛС (см): 1-0,05; 2-0,1; 3-0,2; 4-0,3; 5-0,4. Время диффузии (сек) – 10800.

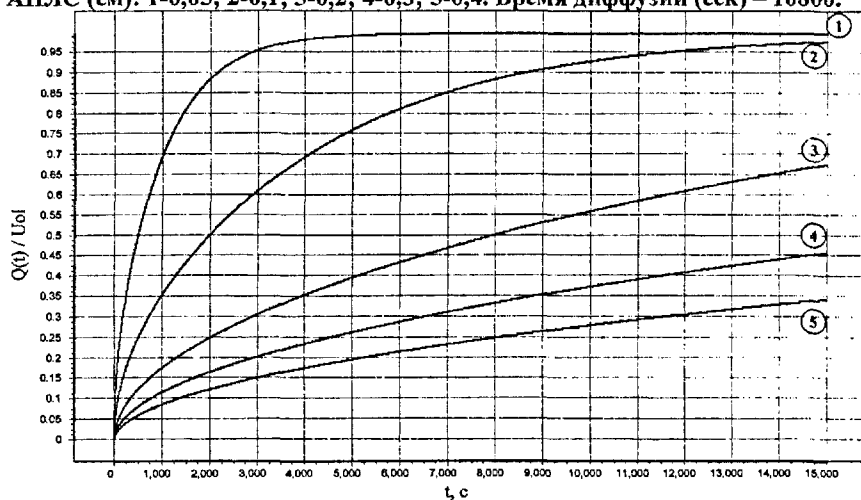


Рис.6. Зависимость относительного количества ($Q(t)/Uo1$) вышедшего вещества из АПЛС различной толщины от времени. Толщина АПЛС (см): 1-0,05; 2-0,1; 3-0,2; 4-0,3; 5-0,4. $D = 10^{-6}$ см²/сек.

На рис. 5 представлены зависимости плотности потока от коэффициента диффузии лекарственного вещества в АПЛС. Как видно из графиков, кривые зависимости имеют экстремум, положение которого определяется толщиной структуры. При увеличении толщины АПЛС положение экстремума смещается в сторону больших значений коэффициента диффузии. Для образцов с толщиной более 2 мм (кривые 4-5) изменение коэффициента диффузии в достаточно широких пределах вблизи точки экстремума не приводит к заметному снижению плотности диффузионного потока. Полученные результаты позволяют при конструировании АПЛС осуществлять целенаправленный поиск носителей с оптимальными диффузионными свойствами для лекарственной субстанции и толщиной слоя.

Зависимость количества вышедшего вещества из АПЛС с различной толщиной носителя от времени контакта с подлежащими тканями представлена на рис. 6. Полученные результаты показывают, что оптимальным является использование АПЛС с толщиной 2-3 мм (кривые 3-4), т.к. при этом обеспечивается длительное время взаимодействия чЭФР с рецепторами клеток и практически полный выход БАВ за 20-30 ч.

Анализ исследуемых зависимостей процесса диффузии и результаты проведённых ранее экспериментальных исследований по стимуляции синтеза ДНК в клетках кожи под действием ЭФР были использованы для расчёта начальной концентрации цитокина в АПЛС. Учитывая геометрические размеры базальных клеток и их количество в мл суспензии, можно подсчитать количество ЭФР $Q(t)$, поглощаемое 1 см^2 клеточной поверхности, которое должно быть не менее $1,9 \cdot 10^{-8} \text{ г/см}^2$. Для достижения указанных условий был проведен расчет параметров АПЛС, содержащих чЭФР, в зависимости от толщины носителя и коэффициентов диффузии (табл. 5). Аналогичным образом можно рассчитать начальную концентрацию цитокина и для АПЛС с другими задаваемыми геометрическими параметрами и коэффициентами диффузии.

Таблица 5. Расчет оптимальных параметров АПЛС, содержащих чЭФР.

Толщина АПЛС, см.	$U_0 \times 10^7$, г/см ³	$D \times 10^6$, см ² /сек.	$Q(t)/U_0 l$ за 4 ч.	Максимальное время аппликации, ч.
0,2	1,22	1,5	0,78	10
0,3	0,82	3,5	0,79	10
0,4	0,61	6,0	0,78	10

Математическое и программное обеспечение расчета технологических параметров диффузионных процессов пропитывания АПЛС.

Одним из определяющих факторов адекватного лечебного воздействия является создание в АПЛС оптимальной концентрации биологически активных веществ. Целью следующего этапа работы являлось составление математических моделей и разработка их программного обеспечения для изучения процесса диффузии БАВ в АПЛС. Пропитывание проходит или одновременно с двух сторон или только с одной стороны (рис.7).

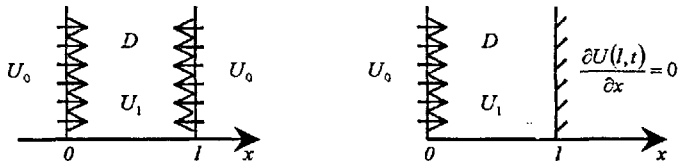


Рис.7. Структурная схема процесса диффузии в однослойную систему АПЛС при условии обработки её с двух сторон одновременно (слева) или только с одной стороны (справа).

D - коэффициент диффузии; $0, l$ - наружные границы носителя; x - расстояние от границы вглубь структуры. Концентрация диффундирующего вещества U_0 на наружной границе с АПЛС сохраняется постоянной в течение всего процесса.

Решения, удовлетворяющие соответствующим граничным и начальным условиям при пропитывании с двух сторон одновременно или только с одной стороны, описываются выражениями (14-15).

$$U(x,t) = U_0 - \frac{4}{\pi} (U_0 - U_1) \sum_{n=1,3,5}^{\infty} \frac{\sin \frac{n\pi x}{l}}{n} e^{-\left(\frac{n\pi}{l}\right)^2 D t} \quad (14)$$

$$U(x, t) = U_0 - \frac{4}{\pi} (U_0 - U_1) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n+1} \sin \frac{2n+1}{2} \pi \frac{x}{l} e^{-\left(\frac{2n+1}{2}\right)^2 \pi^2 D t} \quad (15)$$

Наибольший интерес для практики представляет определение времени обработки необходимого для достижения в АПЛС заданной концентрации диффундирующего вещества, которое может быть рассчитано при использовании только первого члена суммы ряда. После соответствующих преобразований математические выражения для определения времени обработки с двух сторон одновременно или только с одной стороны имели следующий вид (формулы 16-17).

$$t \cong \frac{l^2}{\pi^2 D} \ln \left(\frac{4}{\pi} \frac{U_0 - U_1}{U_0 - U(\frac{l}{2}, t)} \right) \quad (16)$$

$$t \cong \frac{4l^2}{\pi^2 D} \ln \frac{4}{\pi} \frac{U_0 - U_1}{U_0 - U(l, t)} \quad (17)$$

Специальная компьютерная программа, разработанная для оценки ошибки упрощения, показала, что для большинства технологических условий пропитывания (интервал параметра $\beta = \frac{U_0 - U_1}{U_0 - U(x, t)} = 300-2,88$) ошибка при такой замене не превышает 1%. При изменении β от 2,88 до 1,11 ошибка увеличивается с 1,0082 до 15,7142 %, что необходимо учитывать при расчете технологических параметров.

Анализ полученных данных показывает, что при одинаковом значении заданных концентраций и коэффициентов диффузии требуемое время при пропитывании с одной стороны будет в четыре раза больше, чем при пропитывании с двух сторон одновременно. При этом время диффузии нелинейно зависит от толщины структуры. Кроме того, время обработки различных диффузионных сред существенно зависит от коэффициентов диффузии для того или иного вещества. При изменении значений коэффициентов диффузии на порядок время диффузии для двух моделей также меняется на порядок. Данные, полученные с помощью математических

моделей, позволяют оптимизировать технологический процесс пропитывания АПЛС биологически активными веществами. Так, для получения носителя чЭФР с расчетными характеристиками, представленными в табл. 5, при пропитывании образцов ПААГ толщиной от 0,2 до 0,4 см требуется от 137 до 178 мин соответственно.

Экспериментальная проверка ранозаживляющих свойств АПЛС с ЭФР.

Используя результаты, полученные при моделировании, была разработана схема получения АПЛС, содержащих чЭФР, основные технологическими этапами которой представлены на схеме 1.

Схема 1. Получение АПЛС, содержащих чЭФР, с заданными параметрами.



Проверка в биологическом эксперименте (табл. 7.) ранозаживляющих свойств опытных образцов, содержащих чЭФР, показала, что все три серии полимеров более активно стимулировали заживление ран по сравнению с контролем без

цитокина. Полное заживление ран в опытных группах отмечалось к 8-9 суткам, а в контрольной группе к 12-14-м.

Таблица 7. Ранозаживляющие свойства АПЛС, содержащих чЭФР.

Параметры	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Контроль
Толщина, см	0,2	0,3	0,4	0,2-0,4
Коэффициент диффузии, $\text{см}^2/\text{сек} \times 10^6$	$1,6 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,5$	-
Начальная концентрация чЭФР, $\text{нг}/\text{см}^3$	120 ± 10	85 ± 7	60 ± 5	-
Время закрытия раневого дефекта, сут.	$8,3 \pm 1,0$	$7,8 \pm 1,1$	$8,5 \pm 1,5$	$12,5 \pm 2$

Изучение диффузионных параметров транспорта чЭФР из АПЛС в биологическом эксперименте выявило хорошую сходимость экспериментальных результатов с расчетными данными (табл 8).

Таблица 8. Относительное количество чЭФР от начального содержания ($Q(t)/U_0$), вышедшего из АПЛС (серия 3).

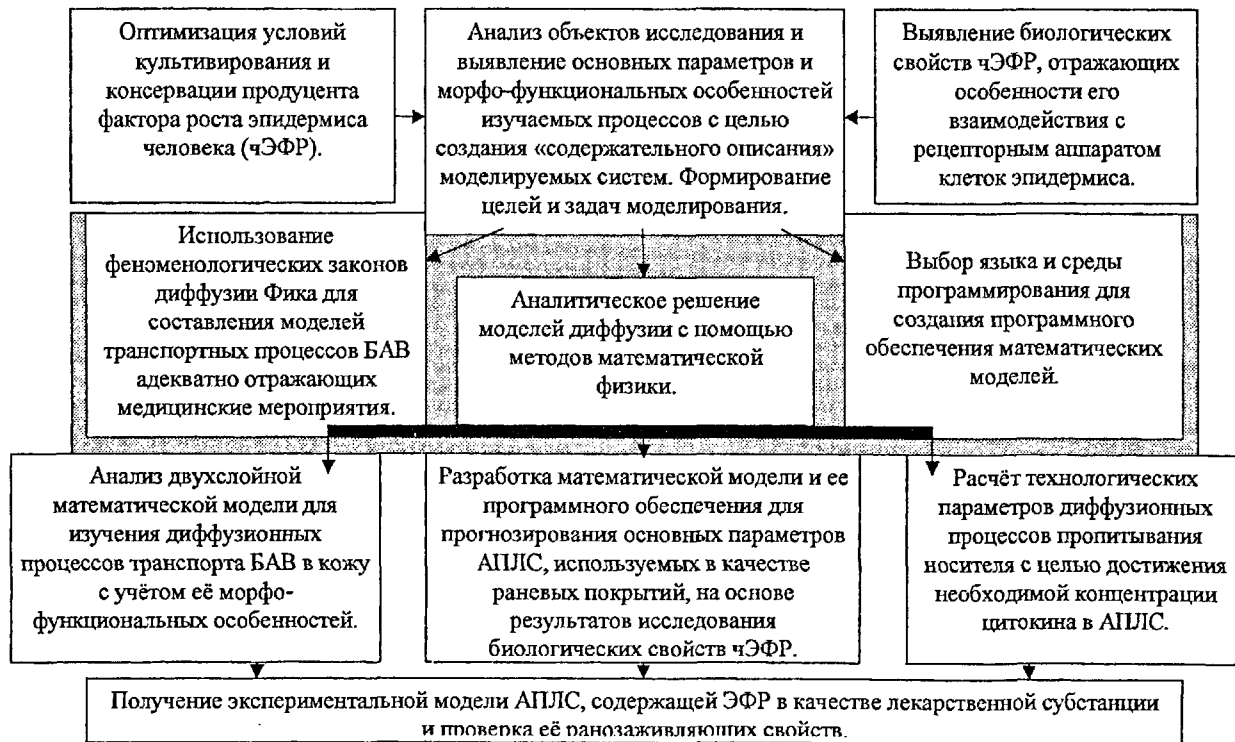
Время аппликации, сек	Расчетные данные	Экспериментальные данные
1800	0,28	$0,23 \pm 0,04$
3600	0,41	$0,46 \pm 0,05$
7200	0,58	$0,64 \pm 0,07$
10800	0,70	$0,73 \pm 0,08$

На основании проведенных исследований и представленных экспериментальных данных и результатов математического и компьютерного моделирования была составлена схема 2 разработки и конструирования аппликационных лекарственных средств, содержащих БАВ биотехнологического происхождения (на примере чЭФР).

ВЫВОДЫ

1. Разработана схема применения математического и компьютерного моделирования для прогнозирования базовых свойств АПЛС с использованием чЭФР биотехнологического происхождения.

Схема 2. Разработка и конструирование аппликационных лекарственных средств, содержащих БАВ биотехнологического происхождения, с помощью математического и компьютерного моделирования (на примере чЭФР).



2. Оптимизированы условия культивирования и хранения рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента чЭФР, обеспечивающие гарантированное получение лекарственной субстанции. Установлены состав среды, температура культивирования, время введения индуктора и его концентрация. Предложены два способа криоконсервации в жидком азоте, позволяющие сохранять биосинтетические свойства трансформированных клеток.
3. Изучены основные биологические свойства цитокина, отражающие особенности взаимодействия чЭФР с рецепторным аппаратом базальных клеток эпидермиса (концентрация цитокина не менее 60 нг/мл, время контакта 3-4 час).
4. Предложена двухслойная математическая модель и её программное обеспечение для проведения анализа диффузионных процессов транспорта БАВ в кожу с учетом морфо-функциональных особенностей кожного покрова.
5. На основе результатов исследования биологических свойств чЭФР разработана математическая модель и её программное обеспечение для прогнозирования параметров АПЛС (толщина носителя, коэффициенты диффузии, начальная концентрация, время аппликации), используемых в качестве раневых покрытий.
6. Разработаны математические модели и компьютерные программы для расчета времени пропитывания носителя БАВ при различных условиях обработки с целью достижения необходимой концентрации цитокина в АПЛС.
7. На основе разработанных математических моделей предложены технологические условия конструирования АПЛС, содержащих чЭФР, с заданными диффузионными параметрами. Показаны ранозаживляющие свойства полученных АПЛС.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Томашевич М.С., Никитина З.К., Быков В.А. Компьютерное моделирование аппликационных лекарственных средств на основе эпидермального фактора роста // Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - 2004. - С. 842-843.
2. Гордонова И.К., Вещикова Е.В., Никитина З.К., Томашевич М.С., Быков В.А. Влияние условий культивирования на скорость роста и секретирующую способность рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* – продуцента чЭФР // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2004. - № 8-9. - С. 40-44.
3. Гордонова И.К., Вещикова Е.В., Никитина З.К., Томашевич М.С., Быков В.А. Оптимизация условий культивирования рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента чЭФР // Биомедицинские технологии. Материалы II-ой Всероссийской научной конференции «Биомедицинские технологии» - М.: - 2004. - вып. 22. - С. 33-41.
4. Томашевич М.С., Быков В.А. Оценка выхода ЭФР из аппликационных лекарственных средств с заданными параметрами // Биомедицинские технологии. Материалы II-ой Всероссийской научной конференции «Биомедицинские технологии» - М.: - 2004. - вып. 23. - С. 174-184.
5. Томашевич М.С., Быков В.А. Разработка и конструирование раневых покрытий с помощью математического и компьютерного моделирования // Материалы III Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» - М.: - 2005. - ч. 1. - С. 56.
6. Томашевич М.С., Быков В.А. Разработка аппликационных лекарственных средств с ранозаживляющим действием // Тезисы докладов XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - 2005. - С. 713-714.
7. Томашевич М.С., Быков В.А. Моделирование диффузионных процессов транспорта биологически активных веществ из аппликационных лекарственных средств // Технологии живых систем. – 2005. - т. 2, № 3. - С. 49-54.
8. Томашевич М.С., Быков В.А. Математическое и компьютерное моделирование, как пример инновационных технологий при конструировании аппликационных лекарственных средств // Материалы III Российской конференции РАЕН «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов» - М.: - 2005. - С. 71-72.
9. Томашевич М.С., Быков В.А. Расчет технологических параметров процесса пропитывания аппликационных лекарственных средств // Технологии живых систем. – 2006. - т. 3, № 1. - С. 68-74.
10. Томашевич М.С., Воронникова Т.В., Быков В.А. Моделирование систем доставки биологически активных веществ в кожу и подлежащие ткани // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2006. - № 3. – С. 31-37.



Принято к исполнению 01/11/2006
Исполнено 02/11/2006

Заказ № 883
Тираж: 120 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
www.autoreferat.ru

