

На правах рукописи



Гопин Александр Викторович

**Преобразование и концентрирование акустической энергии на искусственно
созданных неоднородностях в гидрогелевых средах**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
ведущий научный сотрудник
Николаев Александр Львович

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре радиохимии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель: **Николаев Александр Львович**
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты: **Ершов Юрий Алексеевич**
доктор химических наук, профессор
профессор кафедры БМТ-2 медико-технических информационных технологий
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)»

Михаленко Ирина Ивановна
доктор химических наук, профессор
профессор кафедры физической и коллоидной химии
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский университет дружбы народов (РУДН)

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской Академии Наук**

Защита состоится «14» апреля 2017 года в 16 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.90 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет, аудитория 446.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27.
Автореферат диссертации размещен на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (<http://www.chem.msu.ru>) и на сайте ВАК (<http://vak.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан « » февраля 2017 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 501.001.90
кандидат химических наук, доцент



Шилина М.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В терапии онкологических заболеваний развиваются комплексные методы лечения ориентированные на пациентов. При этом классические противоопухолевые мероприятия, разрушающие опухоль (операция, лучевая терапия, химиотерапия, и др.), сочетаются с различными физическими воздействиями и, в частности, с ультразвуком. В последние годы спектр терапевтических методов в онкологии пополнил метод сонодинамической терапии.

Этот метод заключается в воздействии на опухоль ультразвука средней интенсивности в присутствии предварительно введенных в нее веществ нелекарственной природы – соносенсибилизаторов, которые являются концентраторами акустической энергии. Такой подход дает возможность эффективно использовать средне- и низкоинтенсивные акустические поля для получения локальных высокоэнергетических эффектов, приводящих к деструкции опухолевой ткани. В качестве соносенсибилизаторов в методе сонодинамической терапии часто используются наночастицы различной природы. В настоящее время отсутствуют методология выбора эффективных соносенсибилизаторов и соответствующих режимов ультразвукового воздействия, что приводит к появлению большого числа исследований, не приводящих к конечной цели – клиническому применению. На современном этапе развития сонодинамической терапии, связанной с применением «разрушающих» режимов воздействия, весьма актуальными являются разработка физико-химической базы, позволяющей по результатам экспериментов на относительно простых модельных системах выбирать перспективные соносенсибилизаторы и оптимальные режимы ультразвукового воздействия.

Выявление факторов, определяющих величины акустических эффектов в присутствии в среде твердофазных неоднородностей, является базой для разработки методологии выбора и синтеза оптимальных наноразмерных соносенсибилизаторов. Создание трехуровневой (физико-химический, *in vitro*, *in vivo*) системы, взаимодополняющих экспериментальных тестов является необходимым условием успешного внедрения метода комбинированной ультразвуковой терапии в

клиническую практику. В работе в качестве модели (фантома) опухолевой ткани были выбраны гидрогели, широко используемые при моделировании ультразвуковых эффектов в биологических средах. Параметры ультразвука выбирались близкими к тем, которые используются в сонодинамической терапии в реальных экспериментах на животных и в клинических исследованиях. Частота находилась в интервале 0.7-2.64 МГц, интенсивность не превышала 5 Вт/см². В качестве модификаторов использовали неорганические соединения различной природы. При этом некоторые из них могут быть использованы в реальной процедуре сонодинамической терапии злокачественных опухолей.

Цель и задачи исследования

Целью работы было выявление факторов, определяющих величины температурных и кавитационных ультразвуковых эффектов в гидрогелевых средах (гидрогели агарозы, полиакриламида, желатины, плюроники), модифицированных твердофазными включениями. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- выявление влияния гелевой матрицы и условий синтеза на локализацию и морфологию твердофазных модификаторов в гидрогелях, модифицированных сульфатом бария, гидроксидом железа (III) и кальциевой солью октакарбокситаллоцианина кобальта (терафтала);
- оценка влияния природы твердофазных модификаторов в гидрогелях на величину ультразвуковых температурных и кавитационных эффектов;
- разработка ферментативного метода синтеза твердофазных соносенсибилизаторов микрометрового размера;
- подтверждение *in vitro* и *in vivo* эффективности комбинированного воздействия ультразвука и твердофазных включений;
- разработка физико-химической и математической модели, описывающей массоперенос в гелевом слое, кинетику гомогенной реакции и кинетику кристаллизации, а также распределение по размерам частиц твердой фазы.

Научная новизна

Показано наличие нескольких типов локализации твердофазных включений в гидрогелевые матрицы – высокодисперсные наноструктуры, равномерно

распределенные по нитям полимерной матрицы, агрегаты, локализованные на отдельных ее центрах, агрегаты, локализованные в поровом пространстве гелевой матрицы.

Выявлены зависимости температурных эффектов от концентрации и типа локализации модификатора в полиакриламидных и агарозных гидрогелевых средах. Установлено, что наибольшие эффекты возникают при компактной локализации модификатора на отдельных структурных элементах полимерной матрицы.

Показано повышение интенсивности кавитации в гидрогелевых средах, модифицированных твердофазными включениями. Наибольший эффект достигается при применении включений с гидрофобной поверхностью.

Предложен ферментативный метод синтеза гидроксиапатита. Он обеспечивает заданную локализацию фазообразования, определяемую локализацией фермента, позволяет управлять формой, размером, степенью кристалличности и кинетикой образования гидроксиапатита.

Ферментативным методом получены композиты на основе гидроксиапатита и гидрогелей агарозы и полиакриламида. Для полученных композитов показано существенное усиление температурных эффектов ультразвукового воздействия по сравнению с неминерализованными гидрогелями.

На основании результатов физико-химических экспериментов с модифицированными гидрогелевыми системами гидроксиапатит предложен в качестве соносенсибилизатора для проведения доклинических исследований.

Практическая значимость работы

Полученные результаты, относящиеся к температурным и кавитационным ультразвуковым эффектам в твердофазно модифицированных гидрогелях, могут быть использованы для разработки методик выбора и синтеза оптимальных наноразмерных соносенсибилизаторов и создания взаимосвязанной трехуровневой (физико-химический, *in vitro*, *in vivo*) системы взаимодополняющих экспериментальных тестов.

Разработанный метод ферментативного образования нерастворимых фосфатов может быть использован для направленного синтеза соносенсибилизаторов и в костной хирургии для синтеза наполнителей костных дефектов.

На основании полученных результатов гидроксиапатит может быть рекомендован для проведения доклинических экспериментов по ультразвуковой терапии злокачественных опухолей в качестве соносенсибилизатора.

Результаты работы были использованы при оформлении ряда патентов (патент РФ № 2375090 от 10 декабря 2009 г., патент РФ № 2446844 от 10 апреля 2012 г., патент РФ № 2447916 от 20 апреля 2012 г.).

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, подготовке и проведении большинства экспериментов, в обработке экспериментальных данных, их интерпретации и обсуждении, подготовке к печати публикаций, представлении материала на научных конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

- классификация типов локализации твердофазных включений в полиакриламидные и агарозные гидрогелевые матрицы;
- данные о зависимости температурных эффектов от концентрации и типа локализации модификатора в полиакриламидных и агарозных гидрогелях;
- данные о влиянии природы гетерогенных включений в гидрогелевые матрицы на интенсивность кавитации;
- ферментативный метод синтеза твердофазного соносенсибилизатора – гидроксиапатита – и композитов с гидрогелями агарозы и полиакриламида;
- результаты проверки *in vitro* и *in vivo* эффективности соносенсибилизаторов, выбранных в экспериментах на гидрогелевых средах;
- физико-химическая модель фазообразования в гидрогелевой среде, описывающая массоперенос в слое, кинетику гомогенной реакции, кинетику кристаллизации, а также распределение по размерам частиц твердой фазы.

Достоверность результатов обусловлена использованием высокоточного откалиброванного оборудования и реактивов высокой степени чистоты, статистической обработкой экспериментальных данных и сопоставлением между собой результатов, полученных различными независимыми методами.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих международных и российских научных

конференциях: XVI Международная научная конференция «Математические методы в технике и технологиях» (Россия, Санкт-Петербург, 2003); XVII Международная конференция «Математические методы в технике и технологиях» (Россия, Кострома, 2004); XXV международная научная конференция «Математические методы в технике и технологиях» (Россия, Саратов, 2012); XXVIII международная научная конференция «Математические методы в технике и технологиях ММТТ-28» (Россия, Саратов, 2015); V Минский международный форум по тепломассообмену (Белоруссия, Минск, 2004); XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Россия, Москва, 2007); XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Россия, Волгоград, 2011); IX International Conference «Mössbauer Spectroscopy and its Applications» (Россия, Екатеринбург, 2004); Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам Ломоносов-2005 (Россия, Москва, 2005); Научная конференция «Ломоносовские чтения» (Россия, Москва, 2008); Российская Конференции «Радиохимия – наука настоящего и будущего» (Россия, Москва, 2011); 13th Meeting of the European Society of Sonochemistry (Ukraine, Lviv, 2012); International Conference «Nanomaterials: Applications and Properties» (Ukraine, Sumy, Ukraine, 2013); Первая Российская конференция по медицинской химии «MedChem Russia» (Россия, Москва, 2013); XVIII Сессия Российского акустического общества (Россия, Таганрог, 2006); XIX сессия Российского акустического общества (Россия, Нижний Новгород, 2007); XX сессия Российского акустического общества (Россия, Москва, 2008); XXII сессия Российского Акустического общества (Россия, Москва, 2010); XXIV сессия Российского акустического общества (Россия, Саратов, 2011); XXV сессия российского акустического общества (Россия, Таганрог, 2012); 1-я Всероссийская акустическая конференция (Россия, Москва, 2014); XIX Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем» (Россия, Яльчик, 2012); XXIII Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем» (Россия, Яльчик, 2016); III Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации» (Россия, Иваново, 2004); IV Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Нанокристаллизация. Биокристаллизация» (Россия, Иваново, 2006); V Международная научная конференция «Кинетика и

механизм кристаллизации. Кристаллизация для нанотехнологий, техники и медицины» (Россия, Иваново, 2008); VI Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Самоорганизация при фазообразовании» (Россия, Иваново, 2010); VII Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы нового поколения» (Россия, Иваново, 2012); VIII Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества» (Россия, Иваново, 2014); IX Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы будущего» (Россия, Иваново, 2016).

Публикации

Основное содержание работы изложено в 21 публикации: из них 14 статей (8 из которых входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК), 3 патента и 4 тезиса докладов в сборниках российских и международных конференций.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, основных результатов и выводов, списка литературы. Материал изложен на 153 страницах, содержит 67 рисунков и 7 таблиц. Библиография включает 230 наименований источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы работы и выбор объектов исследования, сформулированы цели и задачи исследования, отмечена ее научная новизна, практическая значимость работы, даны сведения об апробации работы и личном вкладе соискателя.

В **Главе 1 (Обзор литературы)** рассмотрены вопросы о влиянии гидрогелевой матрицы на кристаллизацию различных веществ, эффекты, возникающие при взаимодействии ультразвука с гомогенными и гетерогенными средами, способы использования ультразвука в терапии онкологических заболеваний, в частности в методе сонодинамической терапии, гидрогелевые фантомы биологических тканей, используемые в ультразвуковых исследованиях.

В Главе 2 (Экспериментальная часть) даны сведения об использованных реактивах и инструментальных методах, описаны методики синтеза образцов, проведения экспериментов. В работе использовались методы сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, рентгенографического фазового анализа, мессбауэровской спектроскопии, акустические и химические методы определения активности кавитации.

В Главе 3 (Результаты и обсуждения) содержатся результаты экспериментов и их обсуждение

Кристаллизация в гидрогелевых средах

В зависимости от химической природы гидрогеля и кристаллизующегося модификатора можно ожидать формирование различных вариантов локализации твёрдой фазы, которые могут отличаться величинами ультразвуковых эффектов.

В работе была проведена классификация возможных типов локализации твердофазного модификатора относительно гидрогелевой матрицы. Оценка проводилась путём экспериментального скрининга различных композиций гидрогель-модификатор. Синтез образцов проводили последовательной пропиткой гидрогелей растворами реагентов. Сопоставление электронно-микроскопических изображений немодифицированного и модифицированного гидрогелей дает основание сделать заключение о наличии нескольких типов локализации кристаллизующейся твердой фазы (рис. 1).

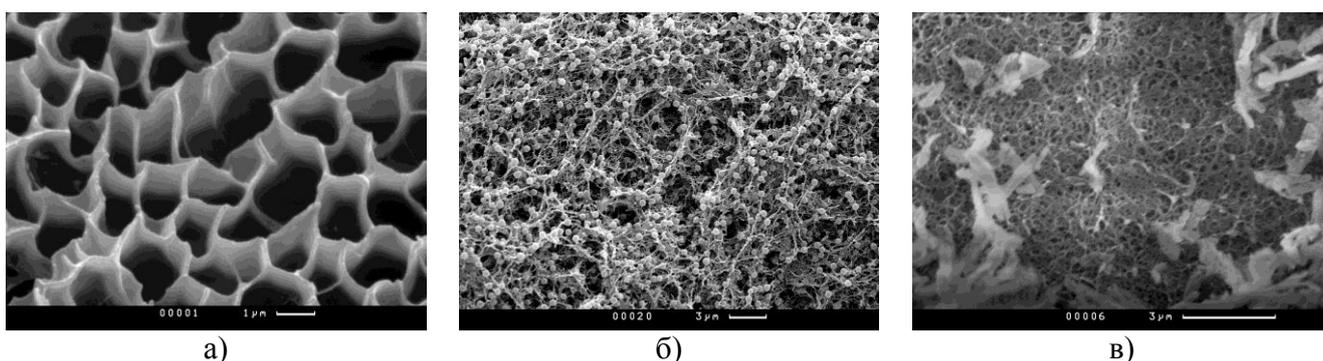


Рисунок 1. Электронные микрофотографии гидроксида железа (III), осажденного в гидрогеле полиакриламида (а); кальциевой соли октакарбокситфалоцианина кобальта, осажденного в гидрогеле агарозы (б); сульфата бария, осажденного в гидрогеле агарозы (в).

Это равномерное распределение модификатора по нитям матрицы (гидроксид железа (III), рис. 1а), локализация твердофазного модификатора на отдельных центрах нитей матрицы (кальциевая соль октакарбокситфалоцианина кобальта,

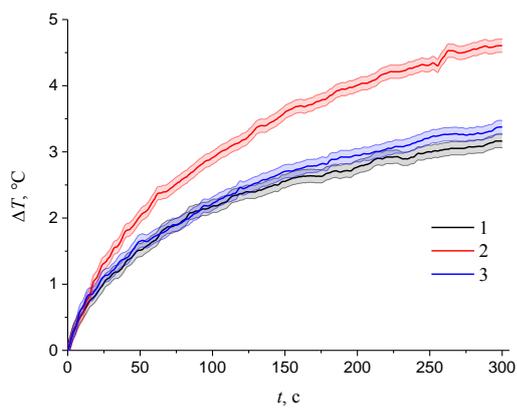
рис. 1б) и смешанный – локализация модификатора в поровом пространстве и на нитях матрицы (сульфат бария, рис. 1в). Вероятность реализации каждого из них определяется природой полимерной матрицы и модификатора.

Температурные эффекты ультразвукового воздействия

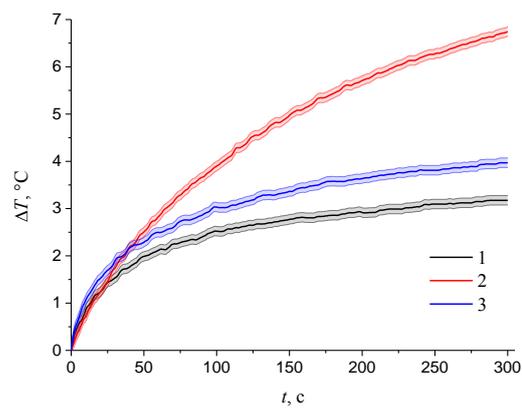
Задачей данной части работы являлось выявление на модельных гидрогелевых системах различных факторов, определяющих величину повышения температуры гидрогелевых сред, содержащих твердофазные включения разной природы, при ультразвуковом воздействии.

В качестве этих факторов были выбраны – тип взаимодействия включений с полимерной матрицей, величина собственного поглощения ультразвука гидрогелем, интенсивность ультразвукового воздействия, концентрация твердофазных включений, способ иммобилизации твердофазных включений в гидрогеле. Во всех случаях при оценке влияния различных факторов на температурные ультразвуковые эффекты использовали частоту 2.64 МГц. На этой частоте, при выбранных интенсивностях излучения, отсутствуют кавитационные эффекты, которые могут вносить погрешность в температурные измерения.

Полученные данные указывают на наличие зависимости величин акустических температурных эффектов от типов локализации модификатора относительно гидрогелевой матрицы. Установлено, что при прочих равных условиях, большим эффектом обладают системы с модификаторами, локализованными на отдельных элементах объема матрицы или со смешанной локализацией (рис. 2). В среднем величины поглощения акустической мощности для образцов, модифицированных сульфатом бария, в 1.5-2 раза выше, чем в случае гидроксида железа (III). При этом следует отметить, что для образцов, модифицированных гидроксидом железа (III), инкрустирующим матрицу, в некоторых случаях наблюдается уменьшение поглощения ультразвука. Это может быть связано с изменением механических характеристик сетки матрицы, приводящей к изменению её вязкоупругих характеристик.



а)



б)

Рисунок 2. Динамика роста температуры при воздействии акустического поля на: а) полиакриламидный гидрогель (10 % по массе), б) агарозный гидрогель (3 % по массе). 1 – немодифицированный гидрогель, 2 – гидрогель, модифицированный сульфатом бария (2 % по массе), 3 – гидрогель, модифицированный гидроксидом железа (2 % по массе). Мощность излучателя 6 Вт.

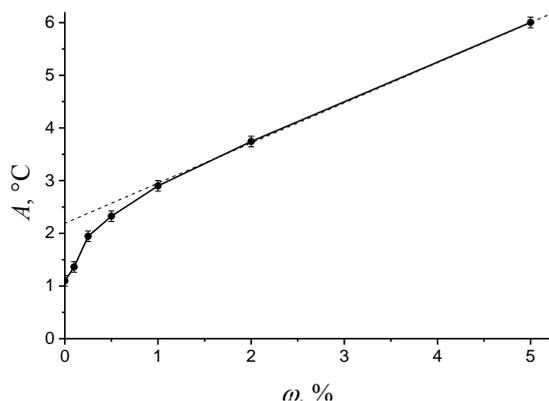


Рисунок 3. Зависимость максимально достижимой (стационарной) температуры агарозного гидрогеля от массовой доли сульфат бария.

Зависимость температурных эффектов от концентрации твердофазных включений исследовали на образцах агарозных гидрогелей, модифицированных гидроксидом и сульфатом бария. Для сравнительного анализа величин нагрева в акустическом поле зависимости роста температуры от времени были аппроксимированы следующей функцией: $\Delta T = A[1 - \exp(-Bt)]$, где ΔT – величина

нагрева образца, A – максимально достижимая в условиях опыта стационарная температура, B – константа. Для обоих случаев наблюдалась нелинейность при низких содержаниях модификатора (на рисунке 3 приведена зависимость стационарной температуры от содержания сульфата бария). Вероятно, это связано с сильным взаимодействием модификатора с матрицей. Дальнейшее увеличение содержания модификатора приводит к заполнению порового пространства гидрогеля и линейному росту температурных эффектов.

При увеличении концентрации полимерной основы гидрогеля происходит увеличение его собственного звукопоглощения. На этом фоне усиление

температурных эффектов ультразвуковых воздействий становится менее выраженным.

Также было показано, что ультразвуковые температурные эффекты зависят от способа введения твердой фазы в гель. Так образец кальциевой соли терафтала, введенный в гель методом смешения показывает в 1.4 раза меньшее изменение температуры по сравнению с методом встречной диффузии, при котором твердая фаза кальциевой соли терафтала зарождается на нитях матрицы.

Наблюдаемые отличия ультразвуковых температурных эффектов для разных образцов коррелируют с отличиями в типах локализации модификаторов в гидрогелевой матрице.

Кавитационные эффекты ультразвукового воздействия

В ультразвуковой терапии управление основным разрушающим опухоль фактором – кавитацией – связано с рядом трудностей, определяемых её физической природой. Это вероятностный характер возникновения, слабая воспроизводимость, плохо контролируемая локализация и форма разрушения, зависимость интенсивности от газосодержания среды. Отнесение изменения в исследуемом объекте на результат кавитационного воздействия требует применения нескольких методов его регистрации.

Задачей данного раздела работы являлась оценка возможного вклада гетерогенных включений в увеличение интенсивности кавитационных процессов в воде и гидрогелях и выявление качественных закономерностей этого процесса, определяемых природой поверхности модификаторов.

В качестве гидрогелевых образцов использовали агарозу и плуроник F127, в качестве объектов, включаемых в гелевые образцы – соединения отличающихся природой поверхности (графитированная сажа, фталоцианин железа, модифицированный пальмитиновой кислотой силикагель, гидроксид железа (III), сульфат бария и силикагель). Эти соединения являлись модельными. В качестве соединения используемого в схеме сонодинамической терапии *in vivo*, к ним была добавлена кальциевая соль октакарбокситалоцианина кобальта (терафтала).

Влияния модификаторов на пороги кавитации оценивали по величинам пороговых значений субгармоник – $1/2f$ и $3/2f$, и по изменению во времени

интенсивности сонолюминесценции, а на интенсивность кавитации – по амплитуде широкополосного шума. Оценку влияния твердофазных включений в гидрогелевую матрицу на её ультразвуковую деструкцию исследовали, используя гель плуроника F127. Его физико-химические свойства (гель становится жидкостью при температуре ниже 20 °С) дают возможность отделить твердофазные включения и оценить изменение в молекулярно-массовом распределении полимера, произошедшее в результате ультразвукового воздействия на гель.

Методом сонолюминесценции для водных сред было установлено, что введение наночастиц магнетита приводит к снижению времени задержки возникновения свечения, Это сокращение пропорционально концентрации наночастиц и свидетельствует о снижении порога кавитации.

Результаты экспериментов по определению порогов кавитации в агарозном геле показывают, что их величина в модифицированных системах с гидрофобными примесями существенно ниже (на 6-9 дБ), чем в среде без примесей (рис. 4). В образцах агарозного геля с гидрофильными примесями – гидроксид железа и сульфат бария – снижение уровня порога появления гармоник не наблюдалось. Многократное воздействие на модифицированный гель приводит к нарушению его структуры, выносу частиц из зоны облучения и повышению порога до соответствующего чистому гелю. Косвенным выводом из полученных результатов может быть заключение о локализации кавитационных эффектов в месте нахождения твердофазных включений.

Сравнительная оценка зависимостей уровня широкополосного шума от интенсивности ультразвука немодифицированных и модифицированных кальциевой солью тарафтала образцов (рис. 5) агарозных гидрогелей показывает, что условия для возникновения и развития кавитации в модифицированных гелях более благоприятны.

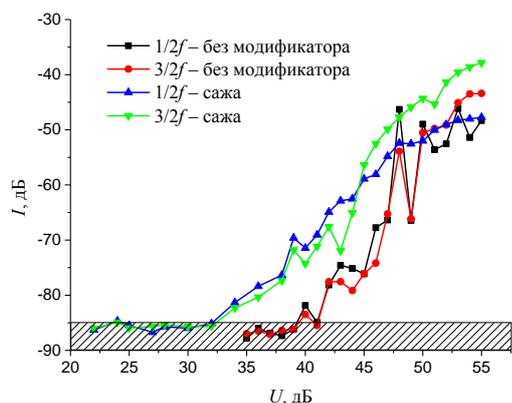


Рисунок 4. Сравнение сигналов частот $f/2$ и $3f/2$ в образцах агарозного гидрогеля и агарозного гидрогеля, модифицированного сажей.

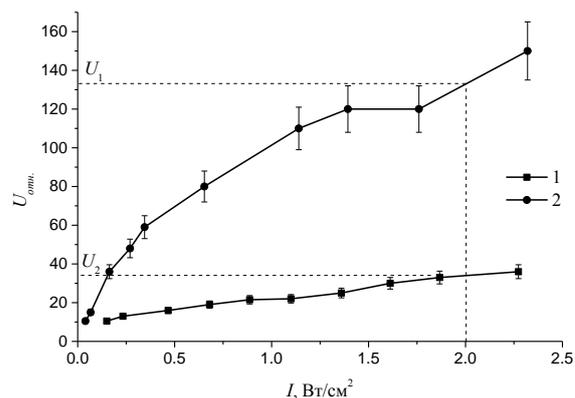


Рисунок 5. Сравнительная оценка уровня широкополосного шума в полосе частот 2-10 МГц.

Степень ультразвуковой деструкции полимерных молекул оценивали по изменению их молекулярно-массового распределения. Соотношение средневесовой и среднечисловой молекулярных масс (M_w/M_n) характеризует степень полидисперсности полимеров. Ультразвуковое воздействие на гель F127, модифицированный наночастицами силикагеля и силикагеля, покрытого пальмитиновой кислотой, приводит к уширению молекулярно-массового распределения (табл. 1). При этом уменьшение средних молекулярных масс (M_n и M_w) свидетельствует о том, что такое уширение произошло в результате появления относительно низкомолекулярной фракции. Появление этой фракции указывает на кавитационную деструкцию молекул полимера. Молекулярно-массовое распределение немодифицированного полимера после ультразвукового воздействия практически не изменяется. Это может свидетельствовать о появлении относительно низкомолекулярной формы в результате увеличения кавитационной деструкции молекул полимера.

Таблица 1. Влияние ультразвука на молекулярно-массовое распределение плуроника F127. Параметры ультразвука: частота 0.88 МГц, интенсивность 1 Вт/см². Содержание плуроника в геле – 20 %. Содержание силикагеля в образце – 1 %

Образец	M_n , кДа	M_w , кДа	M_w/M_n
Гель плуроника без модификатора	10.3±0.1	13.4±0.1	1.30±0.02
Гель плуроника + УЗ	9.4±0.1	12.0±0.1	1.28±0.02
Гель плуроника +УЗ+1% SiO ₂	8.6±0.1	11.6±0.1	1.35±0.02
*Гель плуроника +УЗ +1% SiO ₂ /C ₁₆	7.1±0.1	10.8±0.1	1.52±0.02

* – поверхность образца силикагеля гидрофобизована пальмитиновой кислотой

На увеличение интенсивности кавитационных процессов в присутствии твердофазных включений указывают также данные об увеличении дисперсности модификаторов, осажденных в гидрогеле при ультразвуковом воздействии (рис. 6а) Средний размер частиц твердой фазы в результате кавитации уменьшился с 470 нм до 130 нм (рис. 6б).

Основной вывод заключается в том, что модифицирование гидрогелей нано- и микрочастицами позволяет снизить порог кавитации, увеличить её интенсивность, локализовать кавитационный кластер. В большей степени эти эффекты проявляются у модификаторов с гидрофобной природой поверхности.

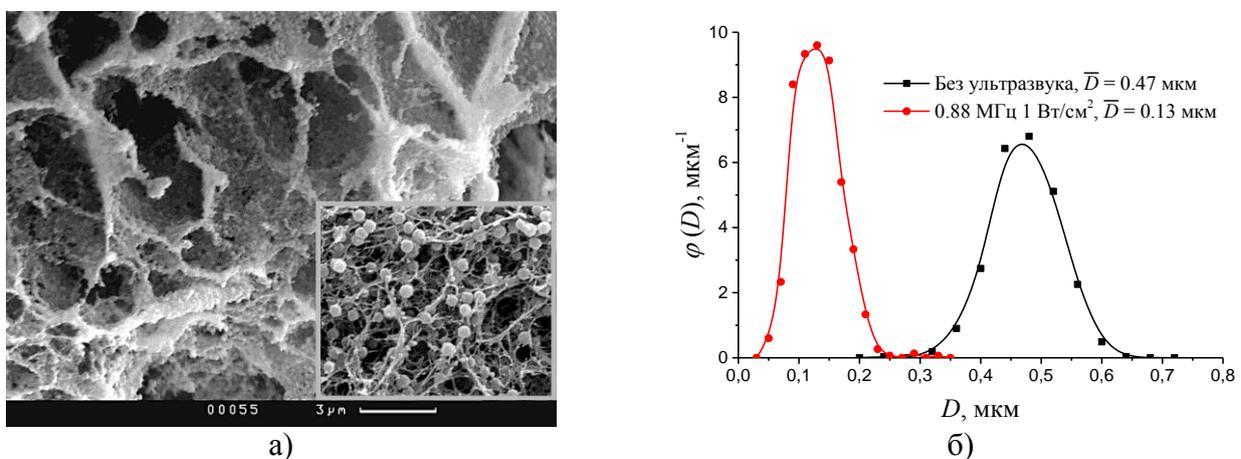


Рисунок 6. Электронная микрофотография агарозного геля, модифицированного кальциевой солью тарафтала при ультразвуковом воздействии (а). На врезке справа внизу микрофотография агарозного геля, модифицированного кальциевой солью тарафтала без ультразвукового воздействия. Функции распределения по диаметру частиц кальциевой соли тарафтала, осажденной в агарозном гидрогеле (б).

Ферментативный синтез твердофазных соносенсибилизаторов

Для некоторых вариантов сонодинамической терапии возникает потребность в относительно крупных частицах соносенсибилизаторов. Они могут использоваться в качестве носителей лекарственных средств при эмболизации сосудов, при внутритканевом введении в поверхностные опухоли, при комбинированной терапии, в качестве наполнители костных дефектов в костной хирургии. В то же время, желательна возможность локализации таких частиц в участке, где необходимо получить целевой эффект ультразвукового воздействия. Для решения этой задачи был предложен ферментативный метод синтеза биосовместимых соносенсибилизаторов на основе фосфатов кальция. Суть метода заключается в

образовании нерастворимых фосфатов кальция путем ферментативного гидролиза его растворимых органических фосфатов. В работе в качестве растворимой формы использовали глицерофосфат кальция, который в результате ферментативного гидролиза переходит в слабощелочной среде в гидроксиапатит. В качестве фермента была выбрана щелочная фосфатаза, катализирующая гидролиз фосфатов. Синтез проводили в растворе ($\text{pH}=9.1$) и в гидрогелях.

При синтезе в растворе исследовались изменения габитуса твердофазных образований, распределения по размерам частиц и степени кристалличности в зависимости от времени протекания реакции и концентрации фермента. Оценивались также удельная поверхность и пористость. Реакцию проводили в буферной системе и в водной среде. Из данных сканирующей электронной микроскопии и рентгенофазового анализа следует, что на первом этапе образуются рентгеноаморфные образования шарообразной формы (рис. 7а) с гладкой поверхностью. Через сутки агрегаты остаются рентгеноаморфными (рис. 7б). Наблюдается формирование рельефа поверхности. На 7 суток (рис. 7в) степень кристалличности твердой фазы заметно повышается. В данном случае можно говорить о формировании частично аморфизованной фазы гидроксиапатита. Динамика изменения структурных характеристик сведена в таблице 2.

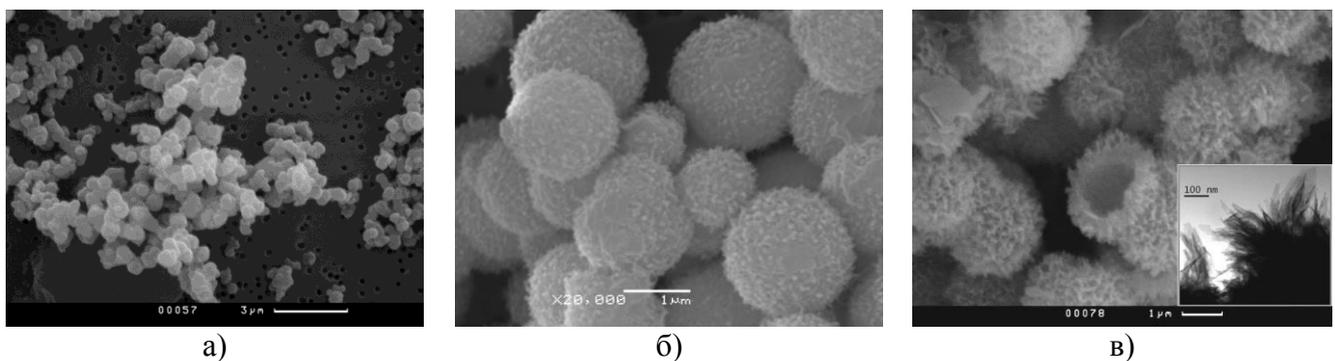


Рисунок 7. Данные сканирующей электронной микроскопии образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере ($\text{pH}=9.1$) при концентрации щелочной фосфатазы 0.5 мкг/мл через 1 час (а), 1 день (б) и 7 дней (в) после начала реакции. На врезке (в) трансмиссионная электронная микрофотография образца.

Таким образом, методом ферментативного фазообразования можно получить агрегаты гидроксиапатита относительно крупных размеров сферической формы с высокой удельной поверхностью и высокой пористостью. Агрегаты в некоторых случаях являются полыми. Нанометровый размер кристаллитов (12-14 нм) указывает

на то, что крупные сферические образования представляют собой сложную иерархическую структуру, организованную множеством мелких кристаллов. Размерами, скоростью роста и степенью кристалличности такой структуры можно управлять, варьируя условия ферментативного гидролиза глицерофосфата кальция.

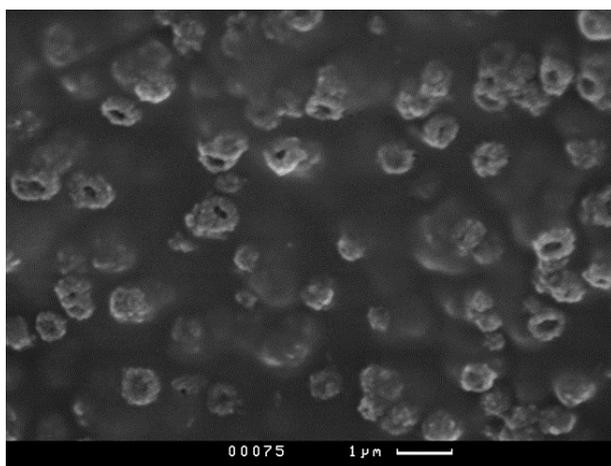
Таблица 2. Параметры частиц образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (pH=9.1) при концентрации щелочной фосфатазы 0.5 мкг/мл

Время синтеза	1 час	24 часа	7 суток
Удельная поверхность, м ² /г	3	25	270
Средний объем пор, см ³ /г	0	0.05	0.6
Средний диаметр, мкм	0.5	1.5	2.7

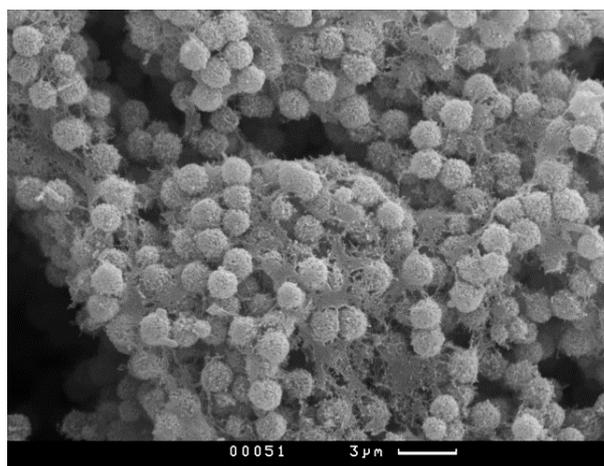
Синтез фосфатов в гидрогелях

Щелочную фосфатазу вводили в образцы гидрогелей на стадии их синтеза. Далее образцы гидрогелей с иммобилизованным в них ферментом помещали в раствор глицерофосфата кальция с концентрацией 0.02 моль/л и оставляли до формирования твердой фазы осадка. Такой процесс может имитировать минерализацию патологического очага. В синтезе использовали гель агарозы и полиакриламида. Локализация осадка определяется двумя факторами – диффузией субстрата и кинетикой его гидролиза в присутствии щелочной фосфатазы.

На рисунке 8 приведены микрофотографии фосфата кальция, полученного гидролизом раствора глицерофосфата кальция в трис буфере (pH=9.1) внутри гидрогелей полиакриламида и агарозы. Форма частиц во всех случаях близка к сферической. В полиакриламидном гидрогеле частицы сильно деформированы. Это может быть связано с высокой плотностью геля, мешающей свободному росту частиц осадка. У всех образцов наблюдается ярко выраженный рельеф поверхности и фиксируется кристалличность. Средний размер частиц меньше, чем в растворе (1 мкм), функция распределения очень узкая. Это может объясняться ограничением, которое накладывает на рост частиц поровое пространство.



а)



б)

Рисунок 8. Электронные микрофотографии гидрогелей полиакриламида (а) и агарозы (б), минерализованные ферментативным методом.

Было установлено, что коэффициент усиления температурных эффектов ультразвукового воздействия на ферментативно минерализованные гидрогели зависит от концентрации фермента и достигал 2.9 при содержании фосфатазы в гидрогеле 0.5 мкг/мл.

Таким образом, искусственная минерализация с помощью ферментативного синтеза нерастворимых фосфатов может обеспечить заданную локализацию фазообразования, определяемую локализацией фермента, что повысит избирательность ультразвукового воздействия.

Оценка эффективности сочетанного действия твердофазных включений и ультразвука на живых системах

Сопоставление результатов, полученных на модельных гидрогелевых фантомах, с результатами *in vitro* и *in vivo*, вызваны необходимостью сформулировать положения, которые в дальнейшем могут определить критерии отбора соединений перспективных для сонодинамической терапии. В ряду эффективных твердофазных соносенсибилизаторов, определённых по результатам экспериментов на гидрогелевых средах, реально используемыми в ультразвуковой терапии могут быть терафтал и гидроксиапатит. Поэтому они были выбраны для исследований эффективности комбинированного воздействия ультразвука и твердофазных включений на живых системах. Исследования *in vitro* проводили на суспензиях бактерий *Escherichia coli* и *Enterococcus*, а *in vivo* на экспериментальных

животных (мышях BDF1) в институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Эксперименты *in vitro*

Введение раствора терафтала в суспензию бактериальных клеток *Escherichia coli* приводит к формированию твердой фазы кальциевой соли, локализованной на поверхности бактерий. При этом потери жизнеспособности не происходит. Ультразвуковое воздействие на бактерии, находящиеся в плотном контакте с кальциевой солью терафтала, приводит к частичной ее потере. Такое разрушение, по всей вероятности, связано с активизацией кавитационных процессов в местах локализации кальциевой соли терафтала, осажденной на поверхности бактерий.

Аналогичную картину разрушений можно наблюдать и для бактерий рода *Enterococcus* (рис. 9). Из рисунка 9 следует, что в результате ультразвукового воздействия часть бактерий подвергается деструкции, сопровождающейся, по-видимому, вытеканием цитоплазмы. Однако большая часть клеток сохраняет нормальную форму. У бактерий, предварительно обработанных терафталом, наблюдается изменение формы и разрушение мембран, которые охватывают практически все обработанные клетки.

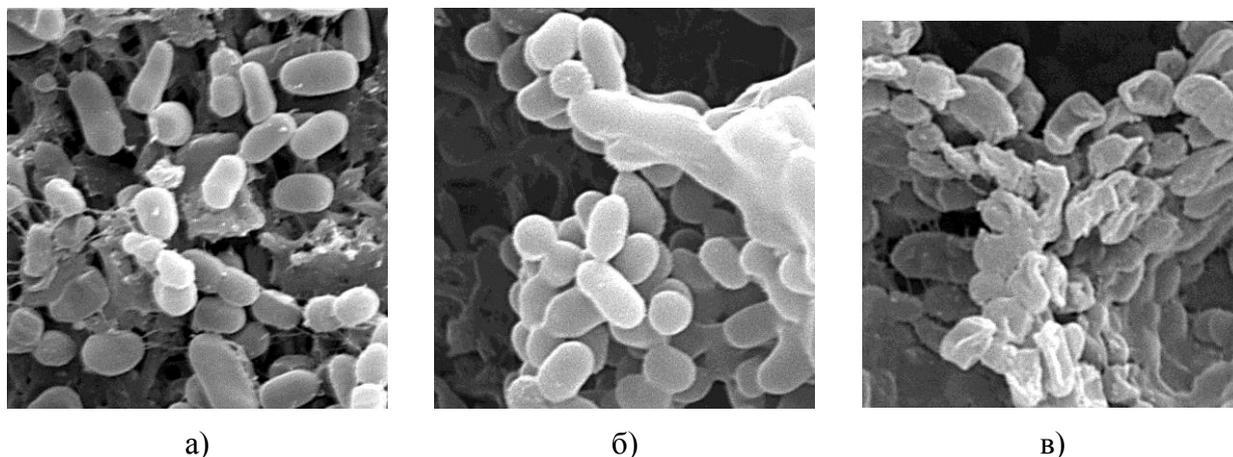


Рисунок 9. Действие ультразвука на бактерии рода *Enterococcus*: а) нативные бактерии, б) бактерии, обработанные ультразвуком, в) бактерии, обработанные ультразвуком и терафталом.

Таким образом, можно сделать вывод об эффективности совместного действия ультразвука и терафтала. Главным действующим фактором, вероятно, является акустическая кавитация, усиление которой в присутствии терафтала наблюдалось в экспериментах на гидрогелевых фантомах.

Эксперименты *in vivo*

На рисунке 10 представлены кривые динамики роста опухоли при совместном действии ультразвука и терафталла. Терафталл, как и в случае бактериальных клеток, образует твердую фазу кальциевой или кислой формы в условиях опухоли, что обеспечивает соносенсибилизирующий эффект. Видно, что действие ультразвука не приводит к значимому терапевтическому эффекту, а терафталл вообще не оказывает влияние на рост опухоли. Совместное действие ультразвука и терафталла приводит к существенному торможению роста опухоли. В зависимости от дозы, время удвоения объёма опухоли по сравнению с контролем увеличивается в 2-3 раза.

Также, в качестве твердофазного соносенсибилизатора впервые был опробован препарат на основе нанокристаллов гидроксиапатита. Установлено, что сочетанное действие ультразвука и гидроксиапатита приводит к выраженному торможению роста опухоли. Увеличение эффективности комбинированной терапии достигает двух раз при оптимальном интервале между введением гидроксиапатита и ультразвуковым воздействием в 4 часа (рис. 11).

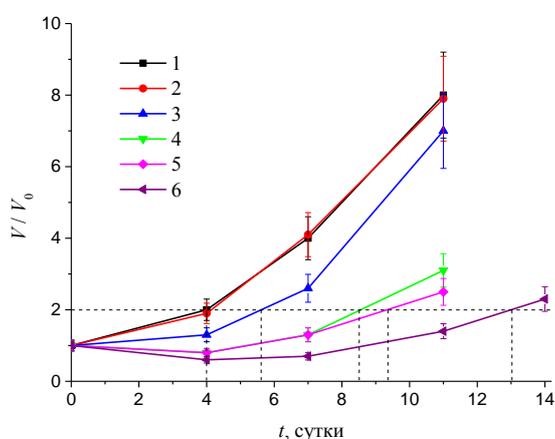


Рисунок 10. Динамика роста опухоли при совместном действии ультразвука и терафталла:

1 – контроль, 2 – терафталл 80 мг/кг, 3 – ультразвук, 4 – ультразвук и терафталл 40 мг/кг, 5 – ультразвук и терафталл 60 мг/кг, 6 – ультразвук и терафталл 80 мг/кг.

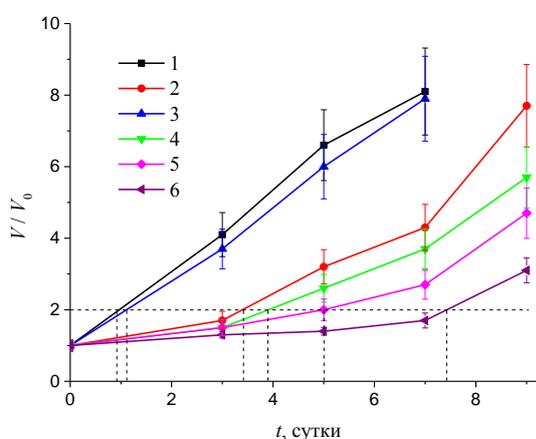


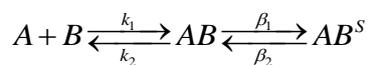
Рисунок 11. Динамика роста опухоли при совместном действии ультразвука (УЗ) и наночастиц гидроксиапатита (НЧ ГАП) в зависимости от интервала между введением НЧ ГАП и УЗ воздействием: 1 – контроль, 2 – ультразвук, 3 – НЧ ГАП, 4 – НЧ ГАП и УЗ через 15 минут, 5 – НЧ ГАП и УЗ через 1 час, 6 – НЧ ГАП и УЗ через 4 часа. Опухоль – меланома B16.

Таким образом, результаты, полученным *in vivo* согласуются с результатами, полученными на гидрогелевых моделях. Дальнейшее развитие работ в этом

направлении связано с разработкой физико-химической базы, определяющей параметры формирования твёрдой фазы в биологических средах.

Модель фазообразования в гидрогелях

Основным способом выявления закономерностей, связывающих характеристики твёрдой фазы в гидрогелевой матрице с величинами акустических эффектов, на данном этапе решения проблемы является экспериментальный скрининг. В то же время, экспериментально полученные закономерности дают возможность сформулировать простейшие модели, целью создания которых является сокращение числа экспериментов и проверка адекватности выводов. В работе была предпринята попытка создания простейшей модели, определяющей связи между концентрациями и диффузионными параметрами реагентов, а также кинетическими параметрами фазообразования с массой, локализацией и распределением по размерам образующихся в результате реакции кристаллов. Процессы, приводящие к образованию твёрдого модификатора в гелевой матрице, можно представить следующим образом:



Здесь индекс S относится к твёрдой фазе. Вследствие диффузии и гомогенной реакции между A и B в объём слоя поровый раствор становится пересыщенным по AB. В пересыщенном растворе зарождаются и растут кристаллы AB^S. Выросшие кристаллы AB^S входят в контакт друг с другом и с частицами матрицы. Продукт AB^S заполняет пространство гидрогелевой матрицы и проницаемость слоя уменьшается вплоть до полной его «закупорки». Скорость диффузии, нуклеации и роста кристаллов определяется концентрацией компонентов раствора и физико-химическими характеристиками гидрогелевой матрицы. Функция распределения числа кристаллов по размерам подчиняется уравнению Фоккера-Планка. Решение задачи с учётом диффузии реагентов в матрице, зависимости коэффициента диффузии от массы образовавшихся в поровом пространстве кристаллов, скоростей образования и растворения кристаллов находили численными методами для простейшего одномерного случая. Для этого производные заменяли конечными разностями и решали получившуюся систему линейных уравнений методом прогонки. Обезразмеривание задачи проводили на характерный размер слоя H

гелевой матрицы, начальную концентрацию первого реагента C_1 , коэффициент диффузии первого реагента D_1 , время $t = D_1\tau/H^2$.

Были определены параметры, характеризующие твёрдую фазу для разных условий. Наиболее близкими к условиям фазообразования *in vivo* являлась встречная диффузия реагентов при постоянной концентрации одного компонента и убывающей во времени по определенному закону концентрации другого компонента или при многократном последовательном введении реагента в систему. Решение показывает, что для обоих случаев характерно наличие времени, соответствующего максимальному накоплению твёрдой фазы в выбранных условиях, а максимальная масса достигается после отключения подачи реагентов (рис. 12). Кроме того, в случае двукратного введения реагента при второй подаче в слое выделяется существенно больше твердой фазы продукта, чем при первой. При этом функция распределения кристаллов по размерам становится бимодальной (рис. 13). Следует отметить, что в реальных экспериментах по ультразвуковой терапии злокачественных опухолей на животных двукратное введение соносенсибилизатора приводило к повышению терапевтической эффективности.

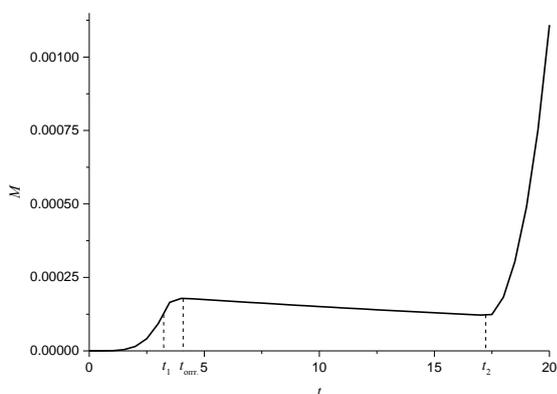


Рисунок 12. Зависимость суммарной массы твердого продукта, осажденного в гелевом слое от времени.

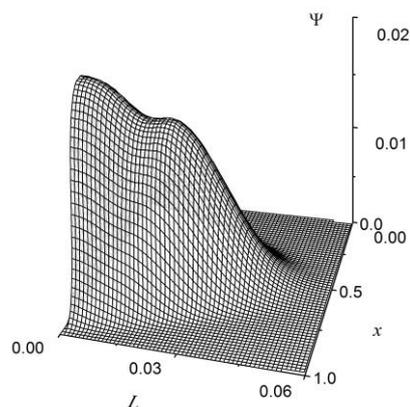


Рисунок 13. Функция распределения твердого продукта по размерам в конечный момент времени.

Конкретное применение результатов моделирования ограничено отсутствием полного набора необходимых параметров и требует наработки соответствующей базы данных. В настоящее время данные вычислительных экспериментов могут служить лишь ориентиром для выбора направления экспериментального поиска.

Основные результаты и выводы

1. На примере гидрогелей агарозы, полиакриламида и желатины, модифицированных сульфатом бария, гидроксидом железа (III) и кальциевой солью октакарбокситалоцианина кобальта, методом сканирующей электронной микроскопии показано наличие трех типов локализации твердофазных модификаторов в гидрогелевых средах:
 - высокодисперсные наноструктуры, равномерно распределенные по нитям полимерной матрицы;
 - агрегаты, локализованные на отдельных ее центрах;
 - агрегаты, локализованные в поровом пространстве гелевой матрицы.
2. Выявлены зависимости температурных эффектов ультразвукового воздействия от концентрации и типа локализации модификатора в гидрогелях. Показано, что наибольшее усиление эффектов (2.5-3.5 раза) возникает для агрегатов, локализованных на отдельных центрах полимерной матрицы. Для высокодисперсных наноструктур, равномерно распределенных по нитям полимерной матрицы, изменение эффектов не наблюдается.
3. Экспериментально показано, что модифицирование гидрогелей нано- и микрочастицами позволяет снизить порог кавитации и увеличить её интенсивность. Наибольший эффект достигается при применении включений с гидрофобной поверхностью.
4. Предложен ферментативный метод синтеза соносенсибилизаторов, позволяющий управлять локализацией, степенью кристалличности, размером и текстурой поверхности получаемых частиц. С помощью этого метода синтезирован гидроксиапатит в гидрогелях агарозы и полиакриламида. Для минерализованных гидрогелей показано усиление температурных эффектов ультразвукового воздействия до 3 раз по сравнению с неминерализованными.
5. Предложена модель фазообразования в гелевой среде, позволяющая определить параметры локализации твердой фазы.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Мелихов И.В., Горбачевский А.Я., Гопин А.В., Николаев А.Л. Кинетика кристаллизации и сопряженного тепломассопереноса в гелевой среде // Мат. мод. 2005. Т. 17, № 6. С. 122–128.
2. Николаев А.Л., Гопин А.В., Чичерин Д.С., Божевольнов В.Е., Мелихов И.В. Локализация акустической энергии в гелевых системах на твердофазных неоднородностях // Вестн. МГУ. Сер. 2: Химия. 2008. Т. 49. № 3. С. 203–208.
3. Мелихов И.В., Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е. Иерархическая модель кристаллизации в полимерных гелях и пористых телах // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83. № 1. С. 84–89.
4. Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Мелихов И.В. Применение твердофазных неоднородностей для повышения эффективности ультразвуковой терапии онкологических заболеваний // Акуст. журн. 2009. Т. 55. № 4-5. С. 565–574.
5. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Бохян Б.Ю., Меерович Г.А., Лощенов В.Б., Каршиева С.Ш., Долгушин Б.И. Экспериментальные подходы к использованию наночастиц в диагностике и терапии опухолей мягких тканей // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2013. № 1. С. 60–66.
6. Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Мелихов И.В., Филоненко Д.В., Мазина С.Е., Герасимова Г.К., Хорошева Е.В., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Бохян Б.Ю., Коган Б.Я., Калия О.Л. Комбинированная ультразвуковая терапия онкологических заболеваний // Рос. хим. журн. 2013. Т. LVII. № 2-выпуск 1. С. 83–99.
7. Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Мазина С.Е., Северин А.В., Рудин В.Н., Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Калия О.Л., Соловьева Л.И., Лукьянец Е.А. Сонодинамическая терапия онкологических заболеваний. Комплексное экспериментальное исследование // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 5. С. 1036–1047.
8. Перфильев Ю.Д., Николаев А.Л., Гопин А.В., Куликов Л.А. Механизм кристаллизационного модифицирования ферригидрита полимерным

- гидрогелем по данным мессбауэровской спектроскопии // Журн. физ. химии. 2014. Т. 88. № 4. С. 686–691.
9. Николаев А.Л., Гопин А.В., Конопацкая И.И., Миронов М.А., Пятаков П.А., Андропова Н.В., Трещалина Е.М., Дежкунов Н.В. Твердофазная соносенсибилизация в сонодинамической терапии онкологических заболеваний // Учен. зап. физ. фак-та Моск. ун-та. 2014. № 5. С. 145344–1–145344–13.
 10. Мазина С.Е., Гопин А.В., Николаев А.Л., Тальберг П.И. Соносенсибилизирующее действие терафтала в бактериальных средах // Биофизика. 2015. Т. 60. № 3. С. 525–529.
 11. Андропова Н.В., Божевольнов В.Е., Гопин А.В., Ворожцов Г.Н., Каляя О.Л., Лукьянец Е.А., Мелихов И.В., Николаев А.Л., Соловьёва Л.И., Трещалина Е.М., Филоненко Д.В. Способ подавления опухолевого роста. Патент № 2375090, 10 декабря 2009 г.
 12. Андропова Н.В., Божевольнов В.Е., Гопин А.В., Ворожцов Г.Н., Каляя О.Л., Николаев А.Л., Трещалина Е.М., Филоненко Д.В. Способ подавления опухолевого роста. Патент № 2446844, 10 апреля 2012 г.
 13. Андропова Н.В., Божевольнов В.Е., Гопин А.В., Ворожцов Г.Н., Каляя О.Л., Николаев А.Л., Трещалина Е.М., Филоненко Д.В. Способ подавления опухолевого роста. Патент № 2447916, 20 апреля 2012 г.
 14. Конопацкая И.И., Миронов М.А., Пятаков П.А., Божевольнов В.Е., Гопин А.В., Николаев А.Л. Воздействие интенсивного ультразвука на гелевые материалы // XX сессия Российского акустического общества. Москва. 2008. Т. 1. С. 80–84.
 15. Конопацкая И.И., Миронов М.А., Пятаков П.А., Божевольнов В.Е., Гопин А.В., Николаев А.Л. Исследование нелинейных эффектов в гелевых средах с нано- и микрочастицами // XXII сессия Российского Акустического общества и сессия Научного совета РАН по акустике. Москва. 2010. Т. 2. С. 104–109.
 16. Дежкунов Н.В., Франческутто А., Николаев А.Л., Гопин А.В., Котухов А.В. Исследование динамики развития кавитационной области в поле мощного фокусирующего излучателя // XXII сессия Российского Акустического

- общества и сессия Научного совета РАН по акустике. Москва. 2010. Т. 2. С. 40–44.
17. Котухов А.В., Николаев А.Л., Гопин А.В., Даллаказа В., Дежкунов Н.В. Влияние наночастиц магнетита на активность кавитации в высокочастотном фокусированном ультразвуковом поле // XXII сессия Российского Акустического общества и сессия Научного совета РАН по акустике. Москва. 2010. Т. 2. С. 44–47.
18. Nikolaev A., Gopin A., Bozhevovnov V., Andronova N., Treschalina E., Dezhkunov N. Ultrasonic nanomedicine in the aspect of therapy of oncological diseases // 13th Meeting of the European Society of Sonochemistry. Lviv. 2012. P. 91–92.
19. Gopin A., Mazina S., Nikolaev A. Efficiency of the combined action of ultrasound and nanoparticles of different nature on bacteria // 13th Meeting of the European Society of Sonochemistry. Lviv. 2012. P. 122–123.
20. Гопин А.В., Николаев А.Л. Ферментативная минерализация гидрогелей фосфатами кальция иммобилизованной щелочной фосфатазой // IX Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы будущего». Иваново. 2016. С. 183.
21. Николаев А.Л., Гопин А.В., Северин А.В., Долгова В.К. Ферментативный синтез наногидроксиапатита в водных и полимерных средах // Структура и динамика молекулярных систем. Яльчик. 2016. С. 116.