

УДК 616-006-008:577.44

Соносенсибилизация материалов для направленного транспорта лекарственных веществ

А. Л. Николаев, Д. С. Чичерин, И. В. Мелихов

АЛЕКСАНДР ЛЬВОВИЧ НИКОЛАЕВ — кандидат химических наук, старший научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизические эффекты в акустических полях, кристаллизационные процессы в биологических системах.

ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ ЧИЧЕРИН — аспирант Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Область научных интересов: принципы создания материалов с триггерными свойствами.

ИГОРЬ ВИТАЛЬЕВИЧ МЕЛИХОВ — доктор химических наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий лабораторией гетерогенных процессов кафедры радиохимии Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Область научных интересов: кинетика фазовых превращений, топочимические реакции, радиохимия.

119899 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М. В. Ломоносова, Химический факультет, тел. (095)939-32-07, E-mail nic@radio.chem.msu.ru

Предлагается подход к созданию материалов с управляемыми ультразвуком свойствами на основе композиции полимерной матрицы-носителя, чувствительной к ультразвуку, и иммобилизованного в ней целевого компонента. Действие ультразвука, вызывающее изменение структуры матрицы, приводит к синхронному изменению свойств связанного с ней целевого компонента. Чувствительность полимерной матрицы-носителя к ультразвуку повышается введением в нее специфических сенсibilизаторов. Экспериментально реализованы варианты предложенного подхода, в которых матрицами являются полидиметилакриламидный гель и эритроциты, а модификаторами — гидроксипатит, гетит и краситель.

В данной статье речь пойдет о выявлении дополнительных возможностей так называемого терапевтического ультразвука, давно и успешно используемого в различных областях медицины [1]. Терапевтическое действие ультразвука обусловлено его поглощением тканями организма. При этом взаимодействии энергия ультразвука в основном трансформируется в тепло, энергию поля сдвиговых напряжений стационарных акустических течений, а также, в небольшой степени, расходуется на образование и активизацию газовых или паровых пузырьков (кавитация) и, для больших полимерных молекул, на нетепловые специфические эффекты (в основном механические).

Каждый из приведенных путей трансформации ультразвуковой энергии в той или иной степени может быть использован для получения терапевтических эффектов. В результате локального выделения тепла в тканях активируются обменные процессы, ускоряется рассасывание инфильтратов, увеличивается проницаемость клеточных мембран. Последнее обстоятельство облегчает поступление в клетку лекарственных веществ. Акустические течения также интенсифицируют обменные процессы и облегчают лекарственный транспорт в очаг поражения.

Кавитационные явления, сопровождающие возникновение, осцилляцию и коллапс парогазовых пу-

зырьков (микротоки, кумулятивные струи, образование свободных радикалов $\text{H}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, а также продуктов их рекомбинации и взаимодействия с молекулами среды) приводят к трудно регулируемым эффектам главным образом деструктивного характера. Принципиально и они могут быть использованы в терапевтических целях, если удастся их инициировать и локализовать в подлежащем разрушению органе или его части. Однако в обычной ультразвуковой терапии стараются использовать режимы, минимизирующие вероятность появления кавитационных эффектов.

В действительности перечень эффектов, вызванных взаимодействием ультразвука с живой тканью, гораздо обширнее приведенного выше. Но и из сказанного следует, что объект, помещенный в ультразвуковое поле, оказывается под воздействием целого ряда факторов и что конечный результат этого воздействия зависит от их абсолютной и относительной интенсивности. Сложность заключается в том, что существуют весьма ограниченные возможности раздельного управления интенсивностью того или иного нужного нам фактора. Мы можем варьировать общую интенсивность ультразвука, его частоту, продолжительность воздействия. Однако этого не всегда достаточно для реализации в очаге поражения условий преимущественного проявления факторов, оптимальных для терапии данной патологии. Так, для уменьшения вероятности возникновения кавитационных процессов мы можем увеличить частоту ультразвука, но вместе с тем усилится его поглощение, как следствие, уменьшится глубина проникновения и повысится опасность перегрева поверхностных участков. Подобных трудностей довольно много, поэтому ультразвуковая терапия вынуждена пользоваться некоторыми условно-оптимальными режимами, которые не обеспечивают максимального терапевтического эффекта, но и не приводят к отрицательным последствиям. На наш взгляд, частичным решением этой проблемы является модифицирование объекта, подвергающегося воздействию акустического поля, таким образом,

чтобы существенно повысить его чувствительность к необходимому для решения конкретной задачи фактору. Ниже мы покажем, как это можно сделать при синтезе материалов с управляемыми ультразвуком транспортными и каталитическими свойствами и для эритроцитов, используемых в качестве транспортных контейнеров лекарственных веществ.

Материалы с управляемыми ультразвуком транспортными и каталитическими свойствами

Основное требование, предъявляемое к таким материалам — это наличие у них способности быстро, обратимо и в значительной степени изменять свои функциональные свойства под действием низкоэнергетических внешних воздействий. В литературе для подобных материалов используется термин «триггер-материалы». В качестве основы при синтезе триггер-материалов мы выбрали термочувствительный полидиэтилакриламидный (ПДЭА) гидрогель, который наряду с хорошей биосовместимостью способен достаточно быстро и обратимо изменять свои физико-химические свойства при небольшом изменении температуры. В качестве управляющего внешнего физического воздействия использовали ультразвук низкой терапевтической мощности (до 1 Вт/см^2 , при частоте $2,64 \text{ МГц}$). «Триггерные» свойства синтезированных материалов оценивали по изменению скорости выделения модельного лекарственного вещества из гидрогелей под действием ультразвука. Для фермента, иммобилизованного в гидрогеле, критерием «триггерности» являлось изменение каталитической активности под действием ультразвука.

Принцип управления свойствами полимерного композита заключается в том, что в результате поглощения ультразвука полимерная матрица, нагреваясь, претерпевает обратимый структурно-фазовый переход через нижнюю критическую температуру смешения (НКТС), сопровождающийся уменьшением ее объема в несколько раз. Вследствие этого, введенный в матрицу в виде раствора целевой компонент выносится возникающими потоками из образца во внешнюю среду, а активность иммобилизованного фермента изменяется из-за обратимых конформационных изменений его глобулы, ковалентно связанной с полимерной матрицей. Основным действующим фактором ультразвука в этом процессе является теп-

ловой эффект. Поглощение ультразвука гидрогелем, состоящим на 80% из воды, невелико, поэтому дозы, необходимые для достижения образцом нижней критической температуры смешения, весьма значительны, а в некоторых случаях (термостатирование при более низкой, чем НКТС температуре) осуществить структурно-фазовый переход вообще не удается. Для повышения чувствительности гидрогелевых образцов к ультразвуку мы модифицировали его неорганическими соединениями. Фаза модификатора из-за высокого поглощения ультразвука является для окружающей гелевой среды с малым коэффициентом поглощения внутренним источником тепла (рис. 1). При прочих равных условиях это приводит к снижению дозы ультразвука, необходимой для достижения заданной температуры в системе, по сравнению со случаем немодифицированного геля. Вместе с тем заданное распределение фазы модификатора по объему образца определяет направления изменения плотности гидрогеля в процессе перехода через НКТС в ультразвуковом поле и связанных с этими изменениями потоков раствора внутри образца.

Модифицирование гидрогеля можно провести двумя способами — включением модификаторов во время синтеза гелей и методом встречной диффузии реагентов [2]. В последнем случае гель, предварительно насыщенный раствором соединения А, после промывания помещали в раствор соединения В. В результате реакции $A+B=AB$ в объеме геля образовывалась твердая фаза малорастворимого модификатора АВ. Таким образом были получены гидрогели, модифицированные гетитом, карбонатом кальция, сульфатом бария, гидроксидом магния, трикальцийфосфатом и др.

Изучение кристаллизации разных модификаторов в гидрогелях дает основание выделить два типа модификаторов — модификаторы, кристаллы которых зарождаются в поровом пространстве матрицы, и модификаторы, скорость образования которых и локализация определяются физико-химическими и структурными свойствами полимерной матрицы.

Наиболее ярким представителем модификаторов первого типа является карбонат кальция, второго — гетит. Характер распределения модификатора внутри образца определяет вектор изменения плотности полимерной матрицы в ходе структурно-фазового перехода, стимулированного ультразвуком. Так, фаза модификатора, зарождающаяся на полимерных це-

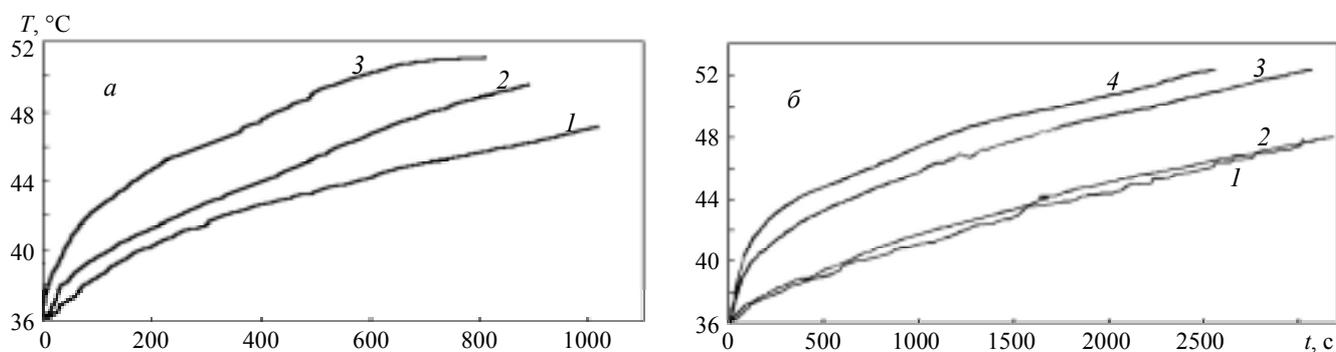


Рис. 1. Динамика нагревания образцов ПДЭА-гидрогеля, немодифицированного и модифицированного (а) гетитом и (б) гидроксиапатитом (частота УЗ $2,64 \text{ МГц}$, интенсивность 1 Вт/см^2):

(а): 1 — контрольный образец (вода); 2 — немодифицированный гель; 3 — гель, модифицированный гетитом (измерения проводили в центре образцов геля); (б): 1 и 2 — немодифицированный гель, измерения проводили на периферии (1) и в объеме (2) образца геля; 3 и 4 — гель, модифицированный гидроксиапатитом, измерения проводили на периферии (3) и в центре (4) образца геля (модификатор включался в центр гелевого тела в процессе синтеза)

пях, равномерно распределяется по образцу, и, в результате, при структурно-фазовом переходе отсутствует преимущественное направление изменения плотности гелевой сетки. Крупные поликристаллические агрегаты, зарождение которых происходило в поровом пространстве, являясь локальными источниками тепла, выделяющегося в результате поглощения ультразвука, существенно влияют на направление изменения плотности геля и, как следствие, на направление потоков внутри образца. Выбор типа модификатора зависит от конкретной задачи. При регулировании каталитической активности иммобилизованного фермента, если не стоит специальная задача организации потоков субстрата и продукта, предпочтительнее равномерное распределение модификатора. При управляемом транспорте вещества из гидрогеля существенным оказывается именно направление потоков, а следовательно, предпочтительнее использование крупных модификаторов, нужным образом распределенных в гелевом теле.

Во всех изученных случаях ультразвуковое поле, наложенное на образцы термочувствительного гидрогеля, содержащего целевой компонент (модельное лекарственное вещество), в несколько раз увеличивало скорость его выхода из образца. Причем это увеличение было тем больше, чем медленнее происходила собственная диффузия субстрата. Так, скорость выхода из образца гидрогеля овомукоида ($M=30000$ а.е.) под действием ультразвука увеличивалась на два порядка, в то время как для ферроцерона ($M=350$ а.е.) — в пять—восемь раз (коэффициент проницаемости овомукоида почти на два порядка ниже, чем у ферроцерона). Типичные зависимости увеличения скорости выхода целевого продукта под действием ультразвука приведены на рис. 2. Полученные результаты можно объяснить, предположив, что при сжатии геля в результате действия ультразвукового поля возникают потоки наполняющего матрицу раствора, которые вносят основной вклад в транспорт лекарственного вещества. При тепловом пере-

ходе через НКТС эти потоки встречают на своем пути уплотненный слой геля, распространяющийся от периферии к центру образца; это замедляет сжатие и мешает выходу растворенного вещества. Для достаточно больших молекул это может привести к полному блокированию их в матрице гидрогеля, что наблюдается, например, для овомукоида. В случае иницирования этого процесса ультразвуком при центральной локализации твердофазного модификатора уплотнение распространяется от центра образца к краю. Такое движение способствует выходу потоков сквозь ту часть матрицы, которая еще не претерпела структурно-фазовый переход и не уплотнилась. При этом для молекул растворенного вещества меньше вероятность быть задержанными уплотняющейся сеткой геля. Пример овомукоида подтверждает правдоподобность данных предположений.

Нами также была установлена принципиальная возможность изменения каталитической активности фермента, ковалентно связанного с матрицей термочувствительного гидрогеля, в результате перехода гидрогеля через НКТС под действием ультразвука. Так, каталитическая активность трипсина, ковалентно иммобилизованного в ПДЭА-гидрогеле, уменьшается в три—пять раз в результате ультразвукового воздействия в течение 4 мин (рис. 3). Изменение активности носит обратимый характер. Скорость изменения активности определяется тепловыми характеристиками системы, а также коэффициентом поглощения ультразвука и наличием модификаторов (в присутствии модификаторов скорость уменьшения активности возрастает примерно на порядок). Время восстановления активности определяется скоростью охлаждения системы, и в нашем случае составляло 5 мин. Кинетические исследования показали, что активность меняется из-за обратимых конформационных изменений молекул иммобилизованного фермента, вызванных обратимыми структурными изменениями в матрице носителя под влиянием ультразвука [3].

Таким образом, при соответствующем выборе

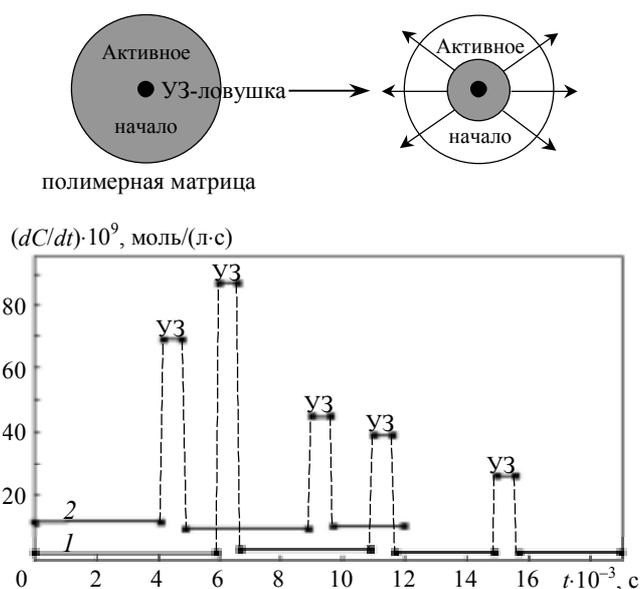


Рис. 2. Зависимость скорости выхода овомукоида (1) и ферроцерона (2) из образцов геля от продолжительности ультразвукового воздействия (частота УЗ 2,64 МГц, интенсивность 1 Вт/см²)

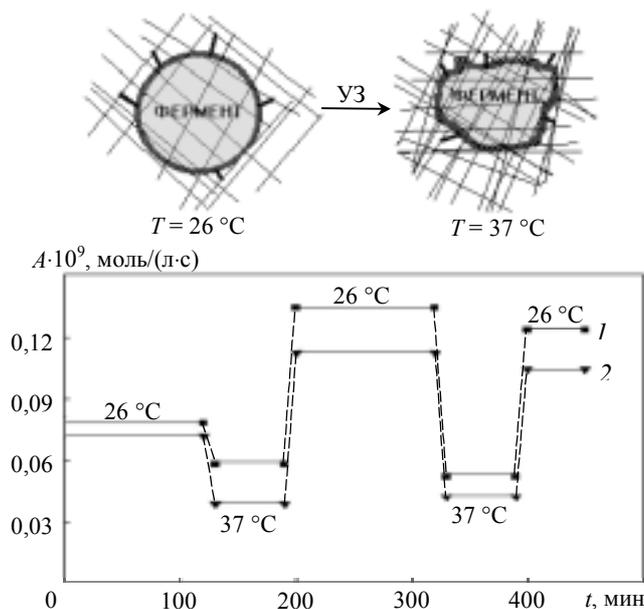


Рис. 3. Зависимость активности трипсина, иммобилизованного в модифицированном гетитом ПДЭА-гидрогеле, от продолжительности воздействия ультразвука (1) и температуры (2).

фермента и матрицы для его иммобилизации возможно создание каталитических систем, быстро реагирующих на низкодозовое ультразвуковое воздействие значительным изменением каталитической активности.

Рассмотренные системы являются модельными и призваны продемонстрировать разумность подхода к задаче тепловой сенсibilизации плохо поглощающих ультразвук сред путем модифицирования их неорганическими полидисперсными включениями. На базе этих представлений нами было разработано устройство, обеспечивающее стимулированное ультразвуком выделение целевого компонента в окружающую среду [4]. Оно может быть использовано в медицине, например, при помещении в постоперационное пространство после удаления злокачественной опухоли, для дистанционного локального выделения цитостатиков с контролируемым временным профилем. Цель такой процедуры — снижение вероятности рецидива.

Основной задачей тепловой ультразвуковой сенсibilизации является разработка способов синтеза звукопоглощающих включений в полимерные среды с заданными пространственным распределением и распределением по размерам частиц модификатора, а также разработка подходов к оценке структуры и динамики температурных полей таких систем в ультразвуковом поле.

Эритроцитарные носители лекарственных средств

Основная особенность и преимущество эритроцитов в качестве транспортной формы лекарства — биосовместимость с организмом человека, причем абсолютная, поскольку можно использовать так называемую аутокровь, т.е. кровь самого пациента. Не вызывающие побочных эффектов и отсроченных аллергических реакций эритроциты, в отличие от липосом, относительно долго циркулируют в организме, причем в зависимости от методики предварительной обработки клеток время их циркуляции в кровотоке можно оценить заранее. Так как объем эритроцита относительно велик, а побочные эффекты практически отсутствуют, то доза депонированного в нем лекарства может быть доведена до уровня, в десятки раз превышающего его переносимость при непосредственном, например, внутривенном или внутримышечном введении. Это свойство потенциально важно при лечении злокачественных опухолей, где лечебное действие в конечном итоге лимитируется побочными эффектами препарата — миело-, нефро- или гастронтестинальной токсичностью. В то же время большой объем эритроцита служит препятствием выходу его за пределы капиллярного русла, по крайней мере, в большинстве тканей организма. Тем не менее как раз в опухоли очень часто наблюдается так называемая экстравазация эритроцитов, да и время прохождения их через опухоль достаточно велико из-за дефектного кровообращения в большинстве злокачественных новообразований.

Методики заполнения эритроцитов лекарственными препаратами достаточно хорошо отработаны. Подавляющее большинство этих методик основано на набухании клеток в гипотоническом растворе, что ведет к раскрытию пор в мембране эритроцита. Вследствие этого происходит выход из него сначала метаболитов и гемоглобина, а затем молекулярных структур, более тесно связанных с плазмалеммой. Можно достичь строго дозированного поэтапного выхода содержимого

эритроцитов и получить всю гамму форм — от нативной, только слегка поврежденной клетки до истинных «стромальных теней», представляющих собой изолированную плазматическую мембрану эритроцита. По данным [5], оптимальной методикой приготовления наиболее приспособленных к длительной циркуляции эритроцитов является гипотонический лизис с предварительным набуханием.

Нами предложен способ вскрытия эритроцитарных носителей в опухолевой ткани путем воздействия ультразвука терапевтической мощности (до 3 Вт/см^2) [6]. При этом предполагается, что выделившийся из разрушенных эритроцитов препарат преимущественно остается в опухоли. Такой способ пригоден для направленного транспорта любых цитостатиков, в том числе и нескольких одновременно.

Из анализа литературы следует вывод о чрезвычайной устойчивости эритроцитов *in vivo* [7], что вполне понятно, так как, являясь важнейшим функциональным образованием, эритроцит и должен быть защищен в организме от нежелательных последствий случайных воздействий. Вероятно, его фантастическая устойчивость (лишь 10% гемолиза в результате 10-минутной экспозиции в акустическом поле с мощностью 15 Вт/см^2 при частоте 1 МГц) определяется уникальными свойствами его мембраны. Из сказанного следует, что использование ультразвука для вскрытия эритроцитарного контейнера в организме заведомо неэффективно без дополнительных приемов, сенсibilизирующих эритроциты. Мы предположили, что нагрузка эритроцитов, в зависимости от ее степени, как раз и может оказаться сенсibilизирующим фактором, поскольку в первую очередь отражается на состоянии и механической прочности мембран, и поведение нагруженных эритроцитов в ультразвуковом поле должно отличаться от поведения нативных. Для проверки этого предположения мы провели эксперименты по сравнительному изучению устойчивости к действию ультразвука в физиологическом растворе нативных эритроцитов и нагруженных индикатором (фталоцианиновый краситель). Устойчивость к действию ультразвука оценивали по скорости выхода красителя из эритроцитов в результате их ультразвукового гемолиза. Следует отметить, что устойчивость эритроцитов в физиологическом растворе не очень высока. Даже мощности до $0,5 \text{ Вт/см}^2$ вызывают быстрый выход гемоглобина. Поэтому эксперименты *in vitro* можно рассматривать как качественное подтверждение справедливости предположения о повышении чувствительности нагруженных эритроцитов к ультразвуковому воздействию. Результаты показаны на рис. 4. Их анализ позволяет сделать следующий вывод: эритроциты после процедуры нагрузки менее устойчивы к воздействию ультразвука, чем нативные. На начальных стадиях скорость ультразвукового гемолиза нагруженных эритроцитов почти в 10 раз выше, чем у нативных.

Еще одной возможностью облегчения процесса «вскрытия» нагруженных эритроцитов является понижение кавитационной прочности среды. Стимуляторы кавитационных процессов существуют для систем *in vitro* (суспензии газовых пузырьков, высокодисперсные твердофазные суспензии, некоторые ионы и др.), а также и для живого организма. Можно предположить, что обнаруженные закономерности сохраняются при переходе к экспериментам *in vivo*.

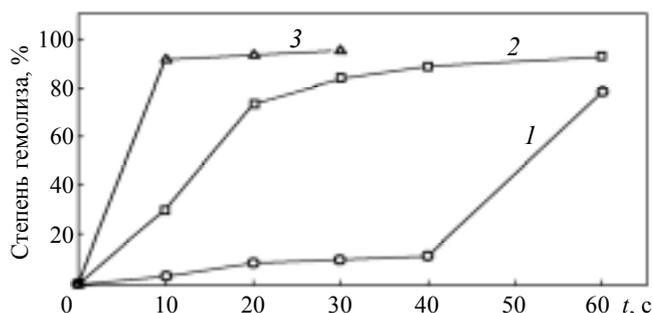


Рис. 4. Динамика ультразвукового гемолиза эритроцитов *in vitro* (частота УЗ 1,0 МГц, интенсивность 0,4 Вт/см²):

1 — нативные эритроциты; 2, 3 — нагруженные фталоцианиновым красителем эритроциты в отсутствие (2) и в присутствии (3) наночастиц гидроксиапатита

Действительно эксперименты на животных (рис. 5) показали:

1) краситель, введенный внутривенно в эритроцитарных контейнерах, накапливается в опухоли медленнее, чем введенный в физиологическом растворе. Это означает, что по крайней мере в течение времени эксперимента краситель в основном находится в эритроцитах;

2) после ультразвукового воздействия малой мощности (1 Вт/см²) на опухоль содержание в ней красителя значительно увеличилось, что связано с разрушением эритроцитарных контейнеров и выходом красителя. Следовательно, нагрузка эритроцитов целевым компонентом ошутимо сенсibiliзирует их к действию ультразвука и *in vivo*.

Очевидно, что использование направленного транспорта лекарственных веществ с помощью разрушаемых ультразвуком эритроцитарных контейнеров имеет смысл только для тех соединений, которые быстро и необратимо связываются с мишенью. В противном случае описанный, довольно сложный способ доставки лекарственного вещества в очаг поражения ничем не будет отличаться от простого внутривенного введения. В то же время ограничением метода является степень наполнения эритроцитов целевым компонентом: если лекарственного вещества слишком много, эритроциты быстро удаляются из кровотока ретикулоэндотелиальной системой печени и селезенки.

Для развития этого направления необходимо разработку базы данных по константам скоростей связывания лекарственных веществ с соответствующими мишенями сочетать с изучением устойчивости в организме нагруженных лекарственными веществами эритроцитарных контейнеров.

Приведенные примеры избирательной сенсibiliзации системы к тому или иному фактору акустического поля показывают принципиальную возможность успешной работы в этом направлении. Особенно привлекательно, на наш взгляд, использование подходов направленной соносенсибилизации в медицине. Возможности добиться успеха там гораздо больше, чем где бы то ни было. Живой организм — сложнейшая система, оптимизированная по неким важнейшим параметрам, тем не менее допускает самые различные вариации менее значимых. Их совокупность определяет область относительно безопасного модифицирования, в которой находятся основные резервы направленной соносенсибилизации.

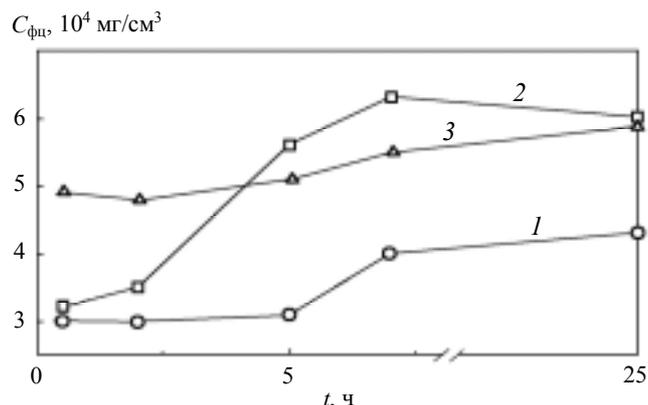


Рис. 5. Зависимость содержания фталоцианинового красителя в опухоли у мышей от времени после его внутривенного введения в эритроцитарных контейнерах (1), в физиологическом растворе (2) и в эритроцитарных контейнерах с последующей обработкой ультразвуком (частота УЗ 1,0 МГц, интенсивность 1 Вт/см², продолжительность обработки 10 мин)

Целью такого модифицирования в первую очередь является достижение локального ультразвукового терапевтического эффекта путем повышения чувствительности очага поражения к соответствующей составляющей ультразвукового воздействия. В частности, объектом модифицирования может являться злокачественная опухоль. Введение в опухоль соносенсибилизатора в форме полидисперсных твердофазных включений с высоким коэффициентом поглощения ультразвука обеспечивает ее разрушение в ультразвуковом поле в областях, непосредственно прилегающих к частицам модификатора. Деструкция опухоли происходит в результате ряда процессов, инициированных взаимодействием ультразвукового поля с частицей модификатора, среди которых главными являются тепловые и кавитационные. Целью сенсibiliзации в этом случае является локальное активирование всего «разрушающего потенциала» ультразвука. Проблема избирательности воздействия решается направленным модифицированием опухолевой ткани в результате системного введения модификатора. Принципиальная возможность этой процедуры следует из анализа физико-химических и биологических особенностей опухоли. Изложенные соображения составляют основу одного из направлений сонодинамической терапии злокачественных заболеваний, развиваемого авторами совместно с Онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина РАМН.

ЛИТЕРАТУРА

- Хилл К., Миллер Э., Бэмбер Дж. и др. Применение ультразвука в медицине. М.: Мир, 1989.
- Марокко А.Ю., Шауро В.С., Горбачевский А.Я. Модели зонной кристаллизации и тепло-массопереноса. Математические методы в технике и технологиях. Смоленск, 2001, с. 194.
- Николаев А.Л., Чичерин Д.С., Синани В.А. и др. Высокомолек. соед., Сер. А, 2001, т. 43, № 1, с. 1—7.
- Патент РФ №2153930, 1999.
- Rechsteiner M. Exp. Cell Res., 1975, v. 93, № 3, p. 487—493.
- Николаев А.Л., Раевский П.М. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 1998, т. 42, № 5, с. 105—110.
- Williams A.R. e. a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, v. 86, № 10, p. 7663—7666.