

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»**

Химический факультет

На правах рукописи



Гопин Александр Викторович

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

Специальность 02.00.04 – Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

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

Москва – 2017

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Обзор литературы	10
1.1. Кристаллизация в гидрогелевых средах	10
1.2. Ультразвуковые эффекты в водных средах	20
1.3. Ультразвуковая терапия	35
1.4. Ультразвуковые фантомы	44
1.5. Выбор объектов исследования и параметров ультразвукового воздействия.....	46
2. Экспериментальная часть.....	48
2.1. Реактивы.....	48
2.2. Синтез гидрогелей.....	48
2.3. Синтез твердофазных модификаторов.....	49
2.4. Синтез модифицированных гидрогелей	50
2.5. Измерение температурных эффектов.....	52
2.6. Измерение кавитационных эффектов	53
2.7. Бактериальная модель.....	57
2.8. Экспериментальные животные	58
2.9. Мессбауэровская спектроскопия	60
2.10. Сканирующая электронная микроскопия.....	60
2.11. Трансмиссионная электронная микроскопия	61
2.12. Рентгенографический фазовый анализ	62
2.13. Адсорбционные измерения.....	62
3. Результаты и обсуждения.....	63
3.1. Кристаллизация в гидрогелевых средах	63
3.2. Температурные эффекты ультразвукового воздействия	76
3.3. Кавитационные эффекты ультразвукового воздействия.....	86

3.4. Ферментативный синтез твердофазных соносенсибилизаторов.....	99
3.5. Оценка эффективности сочетанного действия твердофазных включений и ультразвука на живых системах.....	113
3.6. Модель фазообразования в гидрогелях.....	118
3.7. Заключение.....	129
Основные результаты и выводы.....	131
Список литературы.....	132

ВВЕДЕНИЕ

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 низко интенсивные 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, плуроника), 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 Конференция «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, Summy, 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.

1. Обзор литературы

1.1. Кристаллизация в гидрогелевых средах

Контроль над кристаллизацией добавкой различных веществ исследуется достаточно давно [1]. Огромное число процессов кристаллизации контролируется различными добавками, но выбор режимов часто обоснован лишь эмпирически. Пожалуй, лучшим примером контролируемой кристаллизации является биокристаллизация [2, 3]. Различают два разных типа добавок для такого контроля. Первые обычно называют нерастворимой или структурной матрицей. Различные организмы используют органические компоненты для организации среды для последующей кристаллизации, которая контролируется различными растворимыми добавками или функциональной матрицей. Сочетание этих двух добавок приводит к высочайшему уровню контроля, обычно проявляемому в биоминерализации [4].

Нерастворимые добавки выступают в качестве шаблонов, контролирующих структуру зародыша или полиморфизм кристалла. Кроме того они могут обеспечивать гетерогенную нуклеацию, которая обычно имеет меньший энергетический барьер, нежели гомогенная. Существует множество подобных добавок – монослои Ленгмюра, самосборные монослои, коллоидные кристаллы, вирусы, различные гели и др.

Монослои Ленгмюра могут быть использованы для контроля полиморфизма и нуклеации. Монослои можно сжать, изменяя при этом расстояние и упаковку поверхностных групп [5]. Было исследовано большое число систем. В результате была подтверждена возможность контроля полиморфизма и нуклеации. Так, в работе [6] ориентация кристаллов карбоната кальция контролируется соответствием между кристаллической решеткой и полярными группами жирных кислот. Также было установлено, что сжатие слоев стеариновой кислоты влияет на гомогенность нуклеации ватерита. Предположительно причиной этого является стереохимическое и электростатическое соответствие [7]. Исследования показали, что кристаллизация карбоната кальция на монослоях стеариновой кислоты происходит из кластеров, которые агрегируют с образованием аморфной фазы. Эта фаза присоединяется к монослою, а затем внутри нее на контакте с монослоем происходит рост кристаллической фазы. Если ориентация кристалла и монослоя соответствуют друг другу, то происходит рост, иначе фаза распадается (рис. 1) [8, 9]. Самосборные

монослои похожи на монослои Ленгмюра. Как и последние, они часто использовались как модели для биоминерализации. В частности, в сочетании с растворимыми молекулами и гелями их использовали для исследования биомиметической кристаллизации карбоната кальция [10, 11].

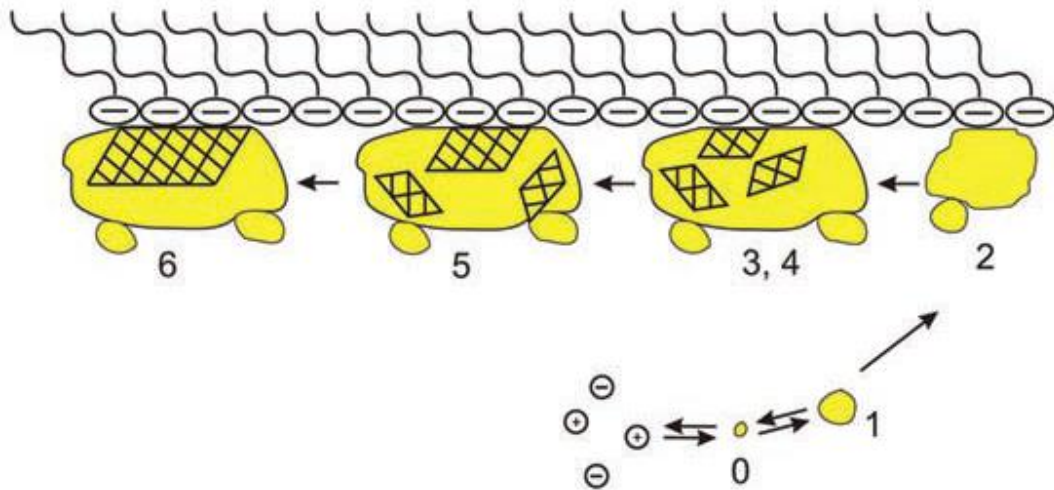


Рисунок 1. Схема минерализации органической матрицы. 0 – образование кластеров, 1 – агрегация кластеров в 30 нм агрегаты аморфного карбоната кальция, 2 – сборка кластеров и рост аморфной фазы на органической матрице, 3 – начало кристаллизации, образование слабокристаллических частиц, 4 – образование нанокристаллических доменов внутри аморфной фазы, 5 – преобладающий рост кристаллических доменов стабилизированный шаблоном монослоя, 6 – образование и рост ориентированных монокристаллов [9].

Различные твердые тела могут служить шаблоном для конечной формы кристалла. Такими шаблонами могут выступать различные коллоидные кристаллы и латексы. Подобным образом было синтезировано достаточно большое число кристаллов. Например, коллоидный кристалл из полистирольных микросфер можно использовать для создания кристаллической макропористой реплики из карбоната [12] или фосфата кальция [13]. Для подобных целей можно использовать также различные вирусы или ферритин. Они достаточно твердые, что позволяет проводить внутри них контролируемую кристаллизацию [14]. Так, вирус табачной мозаики был использован для выращивания металлических нанонитей [15]. Подобные системы очень интересны в качестве нанореакторов. Поскольку средствами генной инженерии можно влиять на

белковую структуру капсид вирусов, то представляется возможным сделать заряд внутренней поверхности капсид отрицательным. Такая поверхность будет эффективно стабилизировать поверхностную нуклеацию оксидов переходных металлов [16].

Еще один вариант контроля кристаллизации предоставляют различные гелевые матрицы. Они широко распространены в биоминерализации. Так, например, формируется перламутровый арагонитовый слой раковин моллюсков [17, 18], отолиты рыб [19] и др. В отличие от вышеупомянутых вариантов контроля, гели не являются шаблоном для роста кристаллической фазы. Их скорее можно рассматривать как некие «строительные леса» [20]. В зависимости от химического состава гели могут как предоставлять некие места для нуклеации, так и контролировать рост и сборку неорганических наночастиц. В гелях может протекать и классическая кристаллизация с образованием монокристаллов, и какие-то другие пути кристаллизации, ведущие к мезокристаллам [21]. Следует отметить, что не всегда удастся четко разделить эти два типа кристаллов. Кроме того мезокристаллы могут переходить в непрерывный единый монокристалл [22].

Кристаллизация в гелях применялась для получения больших, качественных и часто бездефектных кристаллов [23, 24, 25]. Причиной этого является структура геля – пространственная сетка с системой пор разного размера, которую можно варьировать, изменяя плотность сшивки. При большой плотности сшивки размер пор составляет несколько нанометров, при меньшей размер пор растет, например в 1% агарозном геле он составляет порядка 140 нм [26]. Плотность сшивки влияет на диффузию ионов, уменьшая ее более чем в 2 раза [27]. Это дает возможность роста больших монокристаллов в условиях градиентов концентрации и подавленного конвекционного переноса. Также может подавляться образование критического зародыша, поэтому высокие пересыщения будут приводить к росту нескольких больших кристаллов, а не к формированию множества наночастиц. Пересыщение обычно создают встречной диффузией реагентов, охлаждением или диффузионной подачей жидкости с меньшей растворимостью желаемого вещества [28]. Гель поддерживает стабильные градиенты концентраций и рост единичного кристалла в отсутствие действия на него слишком больших сил. Существует несколько механизмов, определяющих итоговый размер кристалла [23]: постепенное расходование реагентов; уменьшение диффузионных градиентов концентрации при движении границы реакции вдоль геля, приводящее к

уменьшению скорости роста; изменение рН при осаждении, приводящее к изменению увеличению растворимости кристаллов и, соответственно к остановке при определенном равновесном размере (например, закисление при расходе карбонат-ионов при осаждении карбоната кальция). Таким образом, существует возможность вырастить достаточно большие кристаллы. Так, кристаллы дигидрофосфата калия и аммония, выращенные в гелях тетраметоксисилана при охлаждении, вырастают достаточно крупными. Более того, при росте в гелевых системах было подавлено образование различных дефектов [29].

Наличие гелевой среды оказывает существенное влияние на морфологию образующихся кристаллов. Так, кристаллы моногидрата аспарагина выращенные в различных средах демонстрируют различную огранку [30]. Разнообразие форм огранки объясняется характером взаимодействия тех или иных граней кристаллов со средой, в частности количеством образуемых водородных связей. Еще одним способом влияния на морфологию кристаллов является регуляция пересыщения. Примером может быть рост восьмилучевых звездчатых кристаллов карбоната кальция в агарозном геле (рис. 2) [31]. Такая форма кристаллов является результатом ограниченной диффузии ионов в геле. Первоначально насыщенный хлоридом кальция гель помещался в раствор карбоната натрия. Сначала по пути диффузии карбонат-ионов образуется множество мелких ромбоэдрических кристаллов кальцита, что приводит к обеднению среды по реагентам в непосредственной близости от них. Затем по мере диффузии карбонат-ионов в гель восемь точек ромбоэдрических кальцитовых зародышей растут быстрее всего, так как в условиях заторможенной диффузии в геле по пространственным соображениям имеют наибольшую вероятность накопить необходимое количество строительного материала. В итоге эти восемь точек разрастаются, образуя в итоге восьмилучевые звездчатые кристаллы. В отличие от рассмотренного случая, рост карбоната кальция в агарозном геле на поверхности самосборных слоев приводит к образованию ромбоэдрических кристаллов кальцита [11].

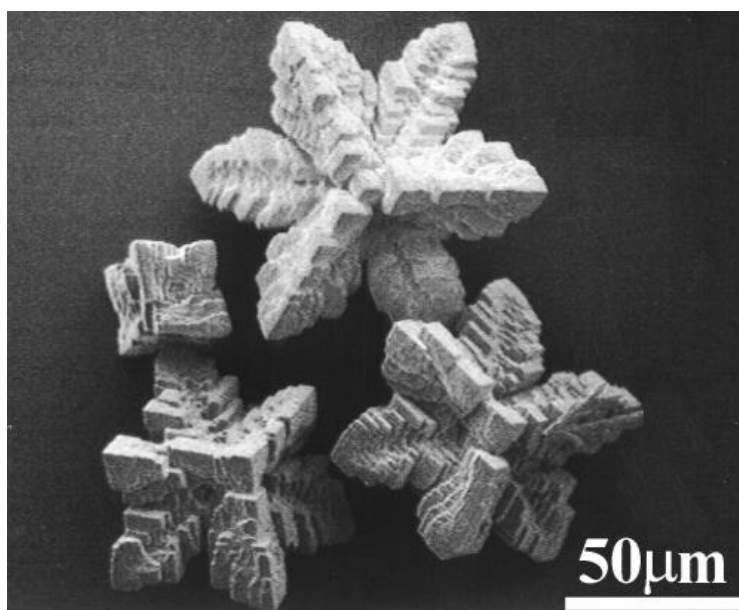


Рисунок 2. Электронная микрофотография кристаллов кальцита, выращенных в агарозном геле [31].

Форма кристаллов, выращенных в гелях, может существенно изменяться во времени. Так, было показано, что внешний вид кристаллов кальцита в самособирающихся функционализированных карбоксильными группами гелях меняется со временем – поверхность кристалла приобретает заметную текстуру [20]. Такое текстурирование может быть связано с накоплением молекул желирующего агента в дефектах кристалла и дальнейшим подрастворением в этих местах. Подобная повышенная по сравнению с идеальным кристаллом растворимость обнаружена и для биоминералов [32]. Она также может быть объяснена эффектом связывания кристаллом макромолекул геля.

Гель сам по себе может непосредственно взаимодействовать с растущим кристаллом. Рост кристаллов октакальцийфосфата в ксерогелях желатина приводит к формированию тонких пластинок вытянутых вдоль оси c с большими гранями $\{100\}$. Рост в деформированных вытянутых ксерогелях приводит к тому, что эти оси оказываются практически параллельны оси растяжения [33].

Кристаллизация в гелях при больших пересыщениях может приводить к мезокристаллам. При подавленной нуклеации происходит рост единичных кристаллов. Если же это не так, то образующиеся наночастицы послужат блоками для дальнейшего формирования мезокристаллов. Их образование происходит достаточно медленно из-за

диффузионных затруднений. Одним из наиболее исследованных синтетических кристаллов является гексагональный затравочный кристалл фторапатита. Такие кристаллы формируются в желатиновом геле, где они дальше разрастаются по сторонам и формируют похожие на гантели частицы, а затем замыкаются в сфероиды (рис. 3а-в) [34, 35]. Первичный затравочный кристалл демонстрирует правильную форму и хорошую огранку. Рентгеновская дифракция свидетельствует о том, что эта затравка является монокристаллом, ориентированным вдоль оси *c*. Это происходит из-за очень высокой упорядоченности наночастиц, формирующих этот кристалл. Такие наночастицы хорошо видны на трансмиссионной электронной микрофотографии тонкого среза такого кристалла (рис. 3г) [36]. Их размер составляет приблизительно 10 нм, что хорошо соотносится с размером первичных наночастиц. Рост гексагонального ватерита в желатиновом гидрогеле также происходит за счет сборки из первичных наночастиц и дальнейшего их слияния в единый пористый кристалл [37].

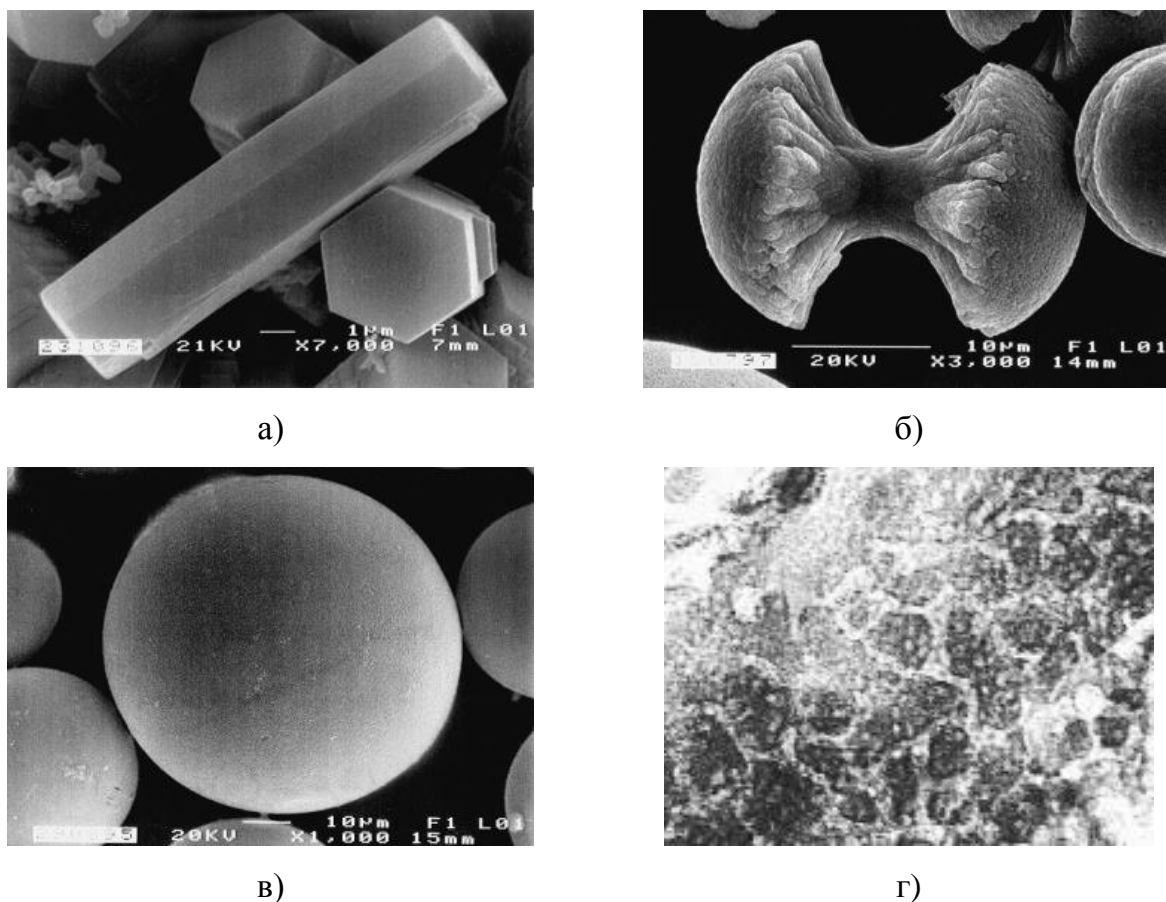


Рисунок 3. Иерархический рост агрегатов фторапатита: а) гексагональная затравка, б) агрегат в форме гантели, в) сферический агрегат, г) микрофотография среза затравочного кристалла – видны первичные наночастицы (ширина поля снимка 130 нм) [35, 36].

Желатиновый гель может взаимодействовать с неорганическими кристаллами заряженными группами. В то же время гели полиакриламида практически инертны. Рост карбоната кальция в таких гелях приводит к псевдооктаэдрическим кристаллам кальцита (рис. 4а) [38, 39]. Такая октаэдрическая морфология невозможна для монокристаллов кальцита. В данном случае они построены из ромбоэдрических первичных нанокристаллов, которые практически идеально сориентированы, а цепи органической матрицы пронизывают пространство между этими кристаллами. Введение полярных групп оказывает существенное влияние на морфологию. Так, кристаллизация карбоната кальция в геле, полученном сополимеризацией акриламида и 2-акриламидо-2-метил-1-пропан сульфокислоты, приводит к формированию псевдокубооктаэдрических кристаллов кальцита (рис. 4б) [40], состоящих из более мелких сориентированных ромбоэдрических кристаллов. Степень влияния на морфологию итогового мезокристалла зависит от количества заряженных групп в геле. При введении 1% сульфокислоты происходит лишь небольшое искажение псевдооктаэдров, а введение 10% приводит к явному изменению морфологии к кубооктаэдрам. Введение других полярных групп приводит к существенному изменению хода кристаллизации. Так в геле, синтезированном сополимеризацией акриламида и акриловой кислоты, первоначально происходит нуклеация множества мелких кристаллов кальцита и ватерита, которые временно стабилизируются даже при достаточно больших пересыщениях. И лишь после большого индукционного периода происходит рост больших сферических агрегатов. В данном случае на механизм минерализации оказывает существенное влияние наличие специфического взаимодействия между карбоксильными группами и осаждающейся неорганической фазой, чего не наблюдается для сульфогрупп [41].

Рост карбоната кальция в агарозном геле также может приводить к созданию иерархических самоподобных мезокристаллов кальцита. Типичная ромбоэдрическая форма генерируется на трех разных уровнях – от микрометров до нанометров. Kontakтами между наночастицами служат кристаллические мостики. В отличие от октаэдрических мезокристаллов кальцита, получаемых в инертном полиакриламидном геле, ромбоэдрическая форма в данном случае объясняется слабым взаимодействием между гидроксильными группами агарозы и кальцитом в процессе роста [42]. Мезокристаллы с кластероподобной морфологией из взаимноориентированных

ромбоэдрических кристаллов кальцита растут в полиакриламидном геле на поверхности монокристаллов кальцита [43]. Причиной формирования таких структур является сжатие геля, которое приводит к формированию органической мембраны с пониженной проницаемостью у поверхности растущего кристалла. Подобная мембрана затем может вызывать образование наноагрегатов и кластеров из-за локального ограничения скоростей диффузии. Оклюзия макромолекул приводит к образованию пор в мезокристалле, как, например, в случае роста кальцита в матрице агарозного геля [44]. Хотя его ромбоэдрическая морфология типична для монокристаллов кальцита, было показано, что в данном случае происходит формирование мезокристалла из ориентированных блоков размером 100-300 нм. Порозность получаемого кристалла можно регулировать, варьируя степень сшивки геля.

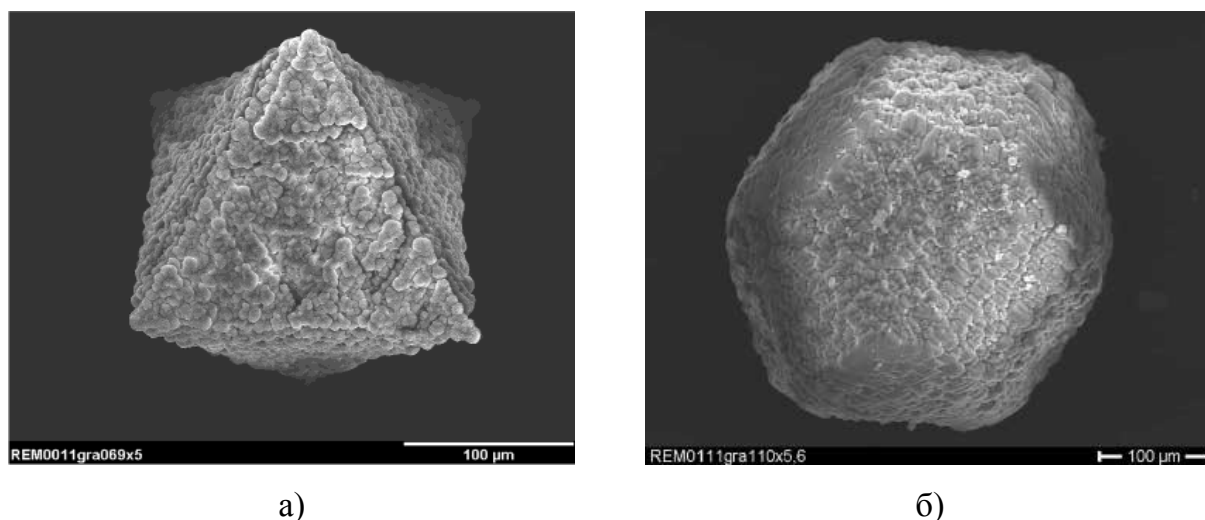


Рисунок 4. Электронная микрофотография: а) октаэдрических мезокристаллов кальцита, синтезированных в геле акриламида [38]; б) кубооктаэдрических мезокристаллов кальцита, синтезированных в геле акриламида, функционализированного сульфогруппами [39].

Кроме монокристаллов и мезокристаллов в гидрогелях может происходить рост поликристаллических структур со сложной морфологией. Частицы, растущие в гелях, часто имеют весьма интересную форму, как, например, спирали дихромата калия, выросшие в желатиновых гелях, [45] или сульфата калия, выросшие в полиакриламидном геле [46]. Соотношение левых и правых спиралей может быть изменено добавкой различных энантиомеров органических кислот [47].

Существует возможность контролировать полиморфизм кристаллов при осаждении в гелях. Ориентированные кристаллы кальцита [48], арагонита [49] могут быть выращены в или на пленках желатина, содержащего поли-L-аспарагиновую кислоту. Кристаллы ватерита также могут быть получены в этих пленках при высоких концентрациях поли-L-аспарагиновой кислоты [50]. Таким образом, эти пленки подходят для синтеза трех безводных форм карбоната кальция [51]. Тип, плотность и расположение заряженных групп отвечают за кристаллизацию карбоната кальция. Эти параметры можно легко регулировать, изменяя тип и количество кислотных полиэлектролитов в исходном растворе желатина. Структуру полиэлектролит-желатинового геля можно изменять его механической деформацией. Это изменяет условия в местах нуклеации и роста. В то время как поли-L-аспарагиновая кислота вызывает ориентированный рост кристаллитов, для поли-L-глутаминовой кислоты такого не наблюдается [50]. В желатиновом геле без таких добавок происходит рост кристаллов в форме гантели [38]. Такие кристаллы содержат значительное количество окклюдированного желатина. При добавлении полиаспарагиновой кислоты происходит подавление воздействия гелевой матрицы, что приводит к независимости морфологии от химического состава этой матрицы.

Ограниченная степень воздействия на формирование кальцита или арагонита продемонстрирована в агарозных гелях в присутствии связывающих кальций полисахаридов водорослей [52], некоторых двухвалентных катионов [53], моно- и трехвалентных катионов [54] и карбоновых кислот [55]. При осаждении в силикагеле в присутствии ионов магния как морфология, так и полиморфизм карбоната кальция связан с уровнем пересыщения [56]. При больших пересыщениях формируются сферические кристаллы кальцита, содержащие до 15% карбоната магния. При понижении пересыщения происходит снижение содержания карбоната магния, а морфология кристаллов меняется от сферической к похожей на гантелю, затем на подобную снопу и, наконец, к кристаллам с выраженными ромбоэдрическими гранями (рис. 5).

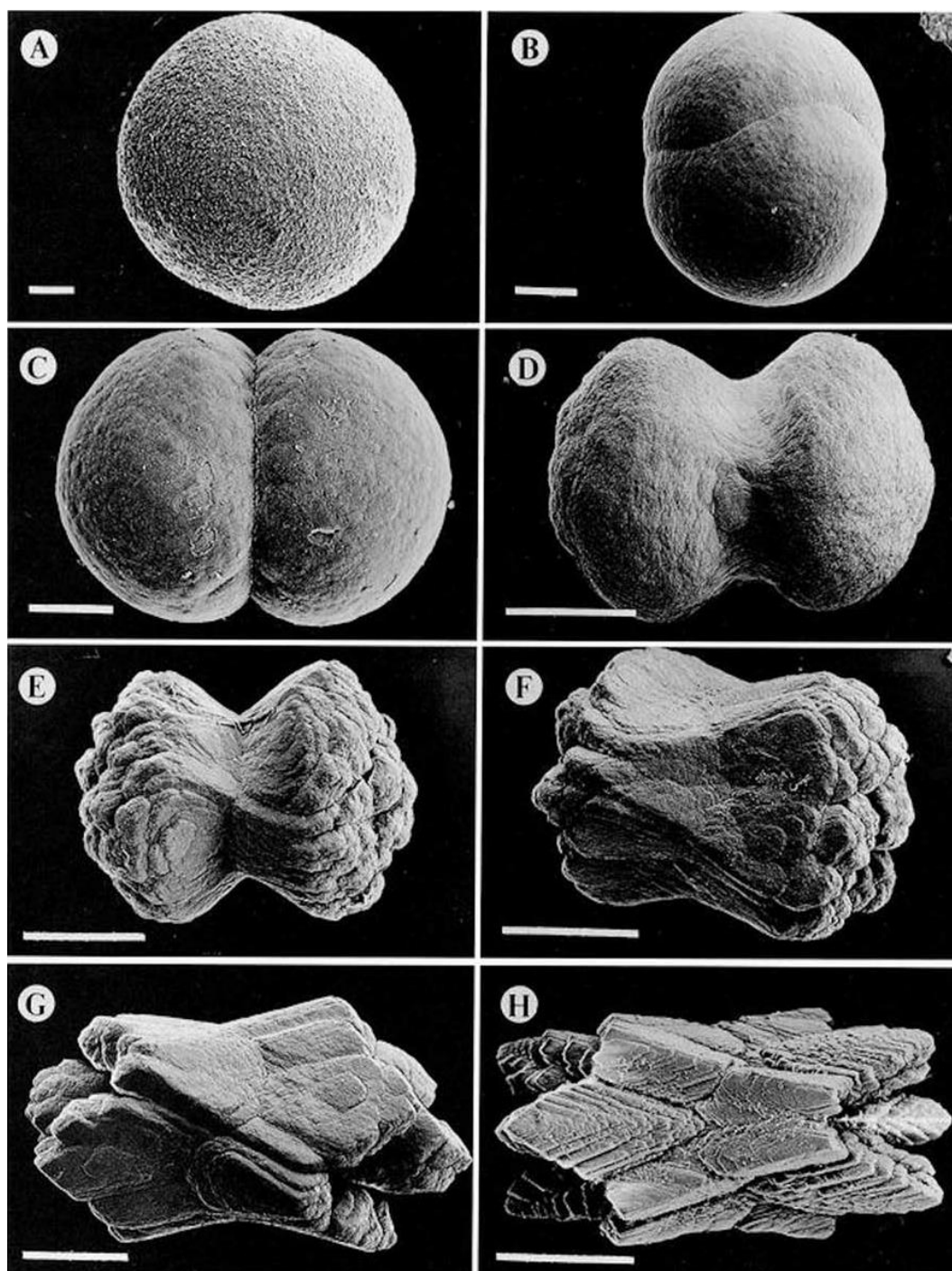


Рисунок 5. Сканирующие электронные микрофотографии Mg-кальцитов. Последовательность демонстрирует эволюцию морфологии как функцию содержания карбоната магния и пересыщения. Сферические частицы, например (А), соответствуют максимальному содержанию магния, а ромбоэдрические – минимальному. Шкала – 20 мкм (А-С) и 100 мкм (D-H). [56]

1.2. Ультразвуковые эффекты в водных средах

Общие положения

Ультразвуком называют упругие волны с частотой от 15-20 кГц до 1 ГГц (звук с большей частотой принято называть гиперзвуком). По частоте ультразвук удобно разделять на три диапазона: ультразвук низких частот (15-100 кГц), ультразвук средних частот (0.1-10 МГц) и ультразвук высоких частот (10-1000 МГц).

Распространение ультразвука подчиняется законам, общим для акустических волн любого диапазона частот. К основным законам распространения относятся законы отражения звука на границах различных сред, дифракция звука и рассеяние звука при наличии препятствий и неоднородностей в среде и неровностей на границах, законы волноводного распространения в ограниченных участках среды. Существенную роль при этом играет соотношение между длиной волны звука λ и характерным для условий его распространения геометрическим размером D – размером источника звука или препятствия на его пути. При $D \gg \lambda$ распространение звука вблизи препятствий происходит в основном по законам геометрической акустики [57].

Для идеальной среды волновое уравнение для ультразвука имеет следующий вид [58]:

$$\Delta\varphi = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial t^2}, \quad (1)$$

где c – скорость распространения волн.

Из волнового уравнения и его частных решений вводятся величины, необходимые для количественного описания ультразвукового поля. Такими характеристиками, в случае незатухающих колебаний, являются частота колебаний f , связанная с периодом колебаний τ и длиной волны λ следующим соотношением:

$$f = \frac{1}{\tau} = \frac{c}{\lambda}. \quad (2)$$

Выражение для средней плотности энергии гармонической акустической волны в единице объема выглядит следующим образом:

$$W = \frac{p_A^2}{2\rho_0 c^2}, \quad (3)$$

где p_A – амплитуда звукового давления, ρ_0 – плотность среды.

Интенсивность акустической волны есть количество энергии, переносимое в единицу времени через единичную площадку, перпендикулярно направлению распространения волны [59]:

$$I = \langle W \rangle_c = \frac{p_A^2}{2} \frac{1}{\rho_0 c}. \quad (4)$$

Экспериментальное определение интенсивности строится, как правило, на эффектах взаимодействия звуковой волны со средой и на использовании соотношения $I = W_T/S_T$, где W_T – мощность, отдаваемая преобразователем в среду, а S_T – площадь поверхности излучателя. Отдаваемая мощность W_T может быть измерена калориметрическими методами [60]:

$$W_T = mC \frac{T_2 - T_1}{t}, \quad (5)$$

где C – удельная теплоемкость вещества среды, m – масса вещества, T_1 и T_2 – соответственно начальная и конечная температуры, t – время. Калориметрический метод применим при полном поглощении излучения веществом среды. В противном случае этот метод дает лишь приблизительную оценку интенсивности излучения. Существуют и другие методы оценки интенсивности ультразвукового воздействия, например, по выходу в сонохимических реакциях [61], но полученные таким методом результаты существенно зависят от геометрии сонохимического реактора.

Источники ультразвуковых колебаний, используемые в науке и технике, можно разделить на две большие группы. К первой относятся излучатели-генераторы – сирены, газоструйные излучатели, свистки, в которых колебания возбуждаются из-за наличия препятствий на пути потока газа или жидкости. Вторая группа – электроакустические преобразователи (электродинамические, магнитострикционные, пьезоэлектрические). Они преобразуют заданные колебания электрического тока или напряжения в механические колебания твердого тела, которое и излучает в окружающую среду акустические волны. Для увеличения эффективности преобразования энергии используются резонансные излучатели, частота их собственных механических колебаний близка к частоте накладываемого внешнего электрического или магнитного поля [57]. В медицинской практике применяются пьезоэлектрические преобразователи.

Поглощение ультразвука в гетерогенных средах

Поглощением ультразвука называют необратимый переход энергии звуковой волны в другие виды энергии, в частности в тепло. Поглощение ультразвука обычно характеризуют коэффициентом поглощения α , определяемым как обратная величина расстояния, на котором амплитуда звуковой волны падает в e раз. Таким образом, амплитуда плоской звуковой волны падает с расстоянием как $e^{-\alpha x}$, а интенсивность – как $e^{-2\alpha x}$ [57].

Для газов и жидкостей диссипативные потери акустической энергии будут связаны с вязкостью и теплопроводностью. Выражение для коэффициента поглощения при этом примет вид [57, 59]:

$$\alpha = \frac{\omega^2}{2\rho c^3} \left[\left(\eta_v + \frac{4}{3}\eta \right) + \kappa \left(\frac{1}{C_v} - \frac{1}{C_p} \right) \right], \quad (6)$$

где $\omega = 2\pi f$ – круговая частота звуковой волны, ρ – плотность среды, η и η_v – коэффициенты сдвиговой и объемной вязкости соответственно, κ – коэффициент теплопроводности, C_p и C_v – теплоемкости при постоянном давлении и объеме соответственно. В выражение для коэффициента поглощения продольной волны входит сдвиговая вязкость. Это связано с тем, что объемные деформации сопровождаются тангенциальными смещениями и напряжениям.

Такое выражение применимо только для звуковых волн с малой амплитудой. Поглощение звука, связанное со сдвиговой вязкостью и теплопроводностью, называется классическим и характеризуется коэффициентом $\alpha_{кл}$. Часть коэффициента, пропорциональная объемной вязкости, связана с релаксационными процессами. На высоких частотах коэффициент объемной вязкости зависит от частоты. Выражение для части коэффициента поглощения, связанной с релаксацией, α_p имеет вид [57]:

$$\alpha_p = \frac{(c_\infty^2 - c_0^2)}{2c_0^3} \frac{\omega^2 \tau}{1 + \omega^2 \tau^2}, \quad (7)$$

где τ – время релаксации, c_0 – скорость распространения звука при малых частотах ($\omega\tau = 1$), c_∞ – скорость распространения звука при больших частотах ($\omega\tau \gg 1$). При этом полный коэффициент поглощения

$$\alpha = \alpha_{кл} + \alpha_p. \quad (8)$$

В случае коллоидных растворов, суспензий и эмульсий существуют ряд явлений, которые возникают при взаимодействии ультразвука со взвесью микрочастиц и в конечном счете определяют ослабление ультразвука и фазовую скорость и частотную зависимость этих величин [62]. Вклад каждого явления в волновое число частично зависит от контраста между физическими свойствами взвешенных частицы и дисперсионной среды, а также от длин волны волн сжатия, и, в определенных случаях, способа перехода сдвиговых и тепловых волн внутрь и наружу частицы. Ослабление звука и изменение фазовой скорости в дисперсиях могут быть объяснены на основании этих явлений, а в некоторых случаях единственным доминирующим явлением. Ниже приведены эти явления, сгруппированные по физическим условиям, с которыми они связаны.

1. Контраст материалов.

Распространяющаяся волна сжатия «проводит некоторое время» в дисперсной фазе, также как и дисперсионной среде. Ослабление и фазовая скорость при этом примут вид среднего ослабления и фазовой скорости в этих двух фазах. Также надо принять во внимание специфические эффекты на границе частицы (дифракция, акустическое сопротивление).

2. Контраст сжимаемости.

Распространение волны сжатия через жидкость связано с когерентными колебаниями локального давления, которые вызывают местное сжатие и расширение жидкости. Взвешенная частица подвергается тем же самым колебаниям давления и также сжимается и расширяется соответственно. Если частица отличается по сжимаемости от дисперсионной среды, то её сжатие и расширение будет отличаться от сжатия и расширения среды в том же объеме. Из этого следует два явления. Прежде всего, часть жидкости дисперсионной среды будет течь к или от частицы в зависимости от различия в сжимаемости и изменения локального давления. Такие циклические потоки могут приводить к потере энергии через жидкое трение и/или создать сдвиг фаз в потоке энергии. Кроме того, циклически пульсирующая частица является точечным излучателем звука с той же самой частотой, что и волна сжатия, и возможно с другой фазой. Если частица мала относительно длины звуковой волны и имеет сферическую форму, то поле ее излучения будет полем излучения монополя.

3. Тепловой контраст.

Тепловой контрасты между дисперсной фазой и дисперсионной средой возникает из-за различий между теплопроводностью, удельными теплоемкостями и коэффициентами теплового расширения материалов этих фаз. При прохождении звуковой волны в зонах сжатия и разряжения возникают отклонения от равновесной температуры. Причем изменение температуры частицы не обязательно соответствует таковым для окружающей дисперсионной среды. В результате возникает циклический тепловой поток между частицей и средой. В зависимости от размеров частицы, возбуждающей частоты и теплопроводностей этих двух фаз, тепловой поток не обязательно останется в фазе с циклическим давлением. Таким образом, тепловой процесс может вызвать уменьшение энергии волны, что выражается как вклад в коэффициент затухания волны и сдвиг фаз в энергии волны, изменяющий фазовую скорость. Циклические изменения в локальной температуре также вызывают циклическое расширение и сжатие как частиц, так и дисперсионной среды. Если коэффициенты объемного расширения среды и частицы различаются, то частица будет вторичным генератором, как и в случае контраста сжимаемости. Тепловой поток представляют тепловой волной, распространяющейся от частицы в дисперсионную среду. Такие волны быстро затухают в соответствии с законом $e^{-k_T x}$. При этом величина k_T равна [59]:

$$k_T = \sqrt{\frac{\omega \rho C_p}{2\kappa}}. \quad (9)$$

4. Контраст плотности.

Если плотности частиц и среды значительно различаются, то циклические изменения в градиенте давления вызывают движение частицы относительно дисперсионной среды. Движущиеся относительно среды частицы подвергаются влиянию среды. Это влияет на распространение акустической волны различными способами: 1) вязкие эффекты в окружающей среде могут вызвать потерю энергии из-за ее нагрева, воздействуя на амплитуду распространяющейся акустической волны; 2) возникающие на поверхности частицы сдвиговые силы, распространяются в частицу и воздействуют на амплитуду и фазу акустической волны; 3) происходит вторичное излучение акустической энергии согласно полю диполя, если частица мала относительно длины падающей волны. Т.е. силы вязкости будут переносить колебания

вглубь жидкости в виде своеобразных вязких волн. Эти волны затухают в соответствии с законом $e^{-k_\eta x}$. При этом величина k_η равна [59]:

$$k_\eta = \sqrt{\frac{\omega}{2\nu}}, \quad (10)$$

где $\nu = \eta/\rho$ – кинематический коэффициент вязкости.

5. Резонанс частиц.

При высоких частотах и для относительно больших частиц существует возможность, что частицы будут резонировать различными способами, которые будут зависеть от их формы и физических свойств. Такие резонансные явления приведут к потерям через три основных механизма: вязкие эффекты, связанные с локальными потоками жидкости вокруг частицы, переизлучение звука и потери на внутреннее трение непосредственно в частице.

История различных теорий взаимодействия акустических волн с препятствиями, распределенными в пространстве, насчитывает более века [63, 64, 65]. Теории можно классифицировать как микроскопические (первая аналитическая теория волнового рассеяния была предложена Рэлеем) и макроскопические. Макроскопические теории имеют тенденцию к математической простоте, микроскопические же теории тяготеют к математической сложности.

Пример простой макроскопической теории можно видеть в работах Урика [66], Урика и Амента [67]. Урик определял адиабатическую сжимаемость малых частиц, суспендируя их в жидкости и затем измеряя скорость звука в суспензии. Идея состояла в том, чтобы оценить эффективную плотность и эффективную сжимаемость смеси из взвешенного среднего по объему удельного веса и сжимаемости этих двух фаз и скорости звука, найденной из уравнения Вуда [68]:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\rho_{eff} \beta_{eff}}}, \quad (11)$$

где ρ_{eff} и β_{eff} – эффективные плотности и сжимаемости смеси. Эта теория дала простой инструмент вычисления сжимаемости частицы на основе измерений скорости звука и плотности частиц.

Впоследствии Урик рассматривал ослабление волн сжатия в жидких суспензиях каолина и песка [69]. Он получал выражение для рассеяния одной частицей и затем выражение для коэффициента затухания с n частицами в единице объема. Итоговое

выражение включало член, отвечающий за рассеяние (пропорциональный $k^4 R^3$) и член, отражающий вязкие потери при движении взвешенных частиц относительно окружающей жидкости. Вязкостная часть зависит от квадрата отношения разности скорости частиц и среды и локальной скорости жидкости. Для малых частиц такое вязкостное затухание мало. При увеличении размера частиц это ослабление сначала возрастало, а потом снова уменьшалось. Итоговое выражение для поглощения имеет вид [67, 69]

$$2\alpha = \sum_r C_r \left[\frac{1}{3} k^4 a_r^3 + k(\sigma - 1)^2 \frac{s}{s^2 + (\sigma + \tau)^2} \right], \quad (12)$$

где $s = \frac{9}{4a_r\beta} \left\{ 1 + \frac{1}{a_r\beta} \right\}$, $\tau = \frac{1}{2} + \frac{9}{4a_r\beta}$, $\sigma = \frac{\rho_r}{\rho}$, $\beta = \sqrt{\omega\rho/2\eta}$, a_r – радиус частиц дисперсной фазы, C_r – объемная доля дисперсной фазы, η – сдвиговая вязкость жидкости, k – волновое число, ω – угловая частота, ρ_r и ρ – плотность дисперсной фазы и жидкости соответственно.

Вообще все работы, исследующие поглощение ультразвука, направлены на выявление механизмов потерь акустической энергии и физических параметров, определяющих потери ультразвуковой энергии в гетерогенных средах. К настоящему времени решены лишь частные случаи, использующие определенные приближения и упрощения.

Рэлей моделировал гетерогенную систему в виде идеальной жидкости или газа со взвешенными абсолютно твердыми или упругими сферическими частицами. Дополнительное ослабление по сравнению со средой (6) обуславливается в данном случае рассеянием. Выражение для коэффициента рассеяния, выведенное Рэлеем, выглядит следующим образом [70]:

$$\alpha_s = N\pi R^2 \frac{7}{9} (kR)^4. \quad (13)$$

П. Эпштейн в своих работах получил коэффициент рассеяния для твердых частиц с конечными константами упругости свободно взвешенных в жидкости [71]:

$$\alpha_s = N\pi R^2 \frac{4}{3} (kR)^4 \left[\frac{1}{3} \left(1 - \frac{3\beta}{3\lambda + 2\mu} \right)^2 + \left(\frac{\gamma - 1}{\gamma + 2} \right)^2 \right], \quad (14)$$

где $\gamma = \rho/\rho_r$, β – коэффициент сжимаемости дисперсионной среды, λ и μ – коэффициенты Ламе.

В дальнейшем различные авторы пытались учитывать прочие физические эффекты, влияющие на поглощение звука. Так Севел [64] в своей теории учел вязкость дисперсной среды, Эпштейн, Кархард, Херцфельд [71, 72] – упругие свойства твердых частиц. Мандельштам, Рытов, Владимирский и Галанин указали на релаксационные процессы, протекающие в дисперсных системах. Исакович и Ратинская-Чабан показали роль теплообмена между частицами дисперсной фазы и дисперсионной средой [73, 74] Аллегра и Хавлей обобщили развитые теории для суспензий и эмульсий [75]. Учитывая факторы, вносящие влияние в суммарное поглощение, и аддитивность всех видов потерь акустической энергии при малых концентрациях частиц дисперсной фазы итоговый коэффициент поглощения будет выглядеть следующим образом:

$$\alpha = \alpha_0 + \Delta\alpha, \quad (15)$$

$$\Delta\alpha = \alpha_R + \alpha_S + \alpha_\eta + \alpha_T, \quad (16)$$

где α_0 – коэффициент поглощения для чистой жидкости (см. уравнение (6)), α_R – поглощение звука в материале частиц, α_S – коэффициент потерь за счет рассеяния, α_η и α_T – коэффициенты потерь при движении частиц относительно среды и теплообмене между частицами и средой. Схемы получения формул для расчета поправок можно посмотреть в работе [59].

В своей работе Аллегра и Хавлей [75] получили следующее выражение для дополнительного коэффициента ослабления ультразвуковых волн, распространяющихся в гетерогенных системах:

$$\Delta\alpha = -\frac{3}{2} \frac{N}{k^2 R^2} \sum_{n=0}^{\infty} (2n+1) \operatorname{Re} A_n. \quad (17)$$

В общем случае решение этого уравнения очень сложное.

Все варианты априорного предсказания поглощения ультразвука в реальных гетерогенных системах сталкиваются с множеством сложностей, обусловленных их свойствами и поведением. Прежде всего, практически всегда частицы дисперсной фазы имеют форму, отличную от простой (сфера, цилиндр и т.п.), и достаточно широко распределены по размерам. Кроме того, сложно учесть взаимодействие между частицами, которые могут образовывать флоккулы, что приведет как к изменению коэффициента вязких потерь, так и к изменению коэффициента поглощения внутри дисперсной фазы [62]. Однако для некоторых многокомпонентных систем акустические параметры удастся достаточно неплохо описать в рамках теории, предложенной

Уриком. Так расчет затухания и скорости звука в фантомах на основе гидрогелей агарозы, модифицированных включениями талька, графита и стекла, дает хорошее согласование с теорией [76]. Видимо здесь частицы модификатора практически не взаимодействуют с гелевой матрицей и ведут себя практически как в вязкой жидкости. С другой стороны, расхождение некоторых расчетных величин с теоретически предсказанными достаточно значительно.

Ультразвуковая кавитация

Необходимо упомянуть о явлении, возникающем в жидкостях под действием ультразвукового поля – кавитации, под которой понимается образование и исчезновение полостей внутри жидкости (разрыв сплошности среды с образованием паро-газовых пузырьков) [57]. После образования эти пузырьки могут расти до тех пор, пока отрицательное давление не достигнет своего максимума. В фазе сжатия сжимаются и эти пузырьки, причем некоторые из них могут полностью исчезнуть. В остальных случаях пузырьки будут осциллировать в акустическом поле.

Различают два режима кавитации – инерционный и неинерционный. Инерционная кавитация развивается при интенсивностях ультразвукового воздействия больших 10 Вт/см^2 . Кавитационные пузырьки живут до нескольких циклов акустического воздействия, а затем схлопываются, зачастую распадаясь на более мелкие пузырьки. Они, в свою очередь могут как послужить зародышами для новых кавитационных полостей, так и просто раствориться. Время жизни пузырьков достаточно мало, поэтому предполагается, что поток массы в или из пузырька, например за счет диффузии газа или процессов испарения и конденсации, несущественен. В отсутствии какого-либо сопротивления, вызванного внутренним давлением газа, пузырек схлопывается [77]. В приближении адиабатического процесса были даны теоретические оценки температуры и давления при коллапсе [78, 79, 80]:

$$T_{\max} = T_0 \left(\frac{P_m (\gamma - 1)}{P} \right), \quad (18)$$

$$P_{\max} = P \left(\frac{P_m (\gamma - 1)}{P} \right)^{\frac{\gamma}{\gamma - 1}}, \quad (19)$$

где T_0 – температура окружающей среды, γ – показатель адиабаты для газа внутри пузырька, P – давление газа в пузырьке и P_m – давление жидкости при коллапсе. Положив $P_m=200$ кПа, температуру окружающей среды $T_0=298$ К, газ в пузырьке насыщенным водяным паром ($P=3.1$ кПа), $\gamma=1.33$ получим теоретическую оценку для максимальной температуры $T_{\max}=6350$ К [81]. Такие экстремальные условия объясняют возникновение радикальных процессов, сонолюминисценции и шоковых волн при коллапсе пузырька. С другой стороны, следует понимать, что полученное значение максимальной температуры будет завышено, так как оценка не учитывает процессов теплопереноса и протекание возможных химических реакций. Экспериментальные оценки температуры коллапсирующего пузырька различными методами дали достаточно широкий интервал – 750-6000 К [82, 83, 84]. Оценка времени полного коллапса кавитационного пузырька дается следующим выражением [85]:

$$\tau_m \approx 0.915 R_{\max} \left(\frac{\rho}{P_m} \right)^{\frac{1}{2}} \left(1 + \frac{P}{P_m} \right). \quad (20)$$

Неинерционная кавитация возникает при относительно небольших интенсивностях акустического поля (1-3 Вт/см²). Размер кавитационных пузырьков, содержащих паро-газовую смесь, колеблется вокруг некоторого равновесного достаточно длительное время (много циклов акустических колебаний). За это время достаточно значимыми оказываются эффекты, связанные с переносом тепла и вещества через поверхность пузырька. Так, за счет выпрямленной диффузии газа внутрь осциллирующего пузырька происходит его рост [86, 87]. По мере роста пузырька изменяются условия окружающей его среды и акустическая обстановка. В результате он может коллапсировать. С другой стороны, пузырек может продолжить расти и в итоге всплыть на поверхность жидкости. Такое явление лежит в основе ультразвуковой дегазации. Существует выражение для колеблющихся в резонансе с действующим акустическим полем пузырьков при неинерционной кавитации, связывающее температуру и давление в них [77]:

$$\frac{T_0}{T_{\max}} = \left[1 + Q \left(\left(\frac{P_h}{P_m} \right)^{\frac{1}{3}\gamma} - 1 \right) \right]^{-3(\gamma-1)}, \quad (21)$$

где Q – соотношение резонансной и стационарной амплитуды колебания размеров кавитационного пузырька, P_h – гидростатическое давление. Расчет для пузырька,

наполненного одноатомным газом, при температуре 300 К, соотношении $P_m/P_h=3.7$ (соответствует интенсивности 2.3 Вт/см²) и $Q=2.5$ дает значение максимальной температуры в 1665 К. Превышение локального давления над гидростатическим при резонансных колебаниях может достигать 150000 раз [77].

Причина возникновения кавитации состоит в воздействии на жидкость отрицательного давления, превышающего прочность жидкости на разрыв. Порогом кавитации называется критическое давление P_k , выше которого наблюдается кавитация. В отсутствии примесей можно записать выражение для критического давления (P_k), необходимого для создания в жидкости пузырька радиуса R_e [77]:

$$P_k = -\frac{2}{3} \sqrt{\frac{(2\sigma/R_e)^3}{3(P_h + 2\sigma/R_e)}}, \quad (22)$$

где P_h – давление газа в пузырьке, σ – коэффициент поверхностного натяжения. Для воды теоретический предел прочности равняется 150 МПа. Однако максимально полученное экспериментальное значение составляет лишь 20 МПа [88] даже для ультрачистой воды.

Различные факторы оказывают значимое влияние на величину порога кавитации. К таким факторам можно отнести частоту ультразвука, температуру и вязкость среды, газосодержание и др. [89, 90]. Также на величину порога кавитации оказывает влияние наличие внесенных примесей. Так зародышами кавитации могут быть, например, поры в нано- и микрочастицах примесей или в их агрегатах. В работе [91] показано, что неидеально смачиваемая пора в частице примеси может служить зародышем кавитации (рис. 6).

Также внесение гидрофобных поверхностей может снизить порог кавитации. Энергия, необходимая для формирования пузырька в объеме жидкости и на гидрофобной поверхности, существенно различается [92]. Авторы указывают, что выигрыш в энергии при нуклеации на гидрофобной поверхности достигает полутора раз по сравнению с нуклеацией в объеме жидкости. Это приводит к преимущественному формированию кавитационных пузырьков на поверхности пластины, внесенной в жидкость, особенно на ее гидрофобизированной части. Это предположение подтверждается характером повреждений на пластине. Так, после ультразвукового воздействия разрушается именно гидрофобная часть пластины. Кроме того гидрофобная поверхность может удерживать некоторое количество нано- и микропузырьков, которые

будут расти при приложении отрицательного давления. Такое явление известно как «гетерогенная кавитация» [93].

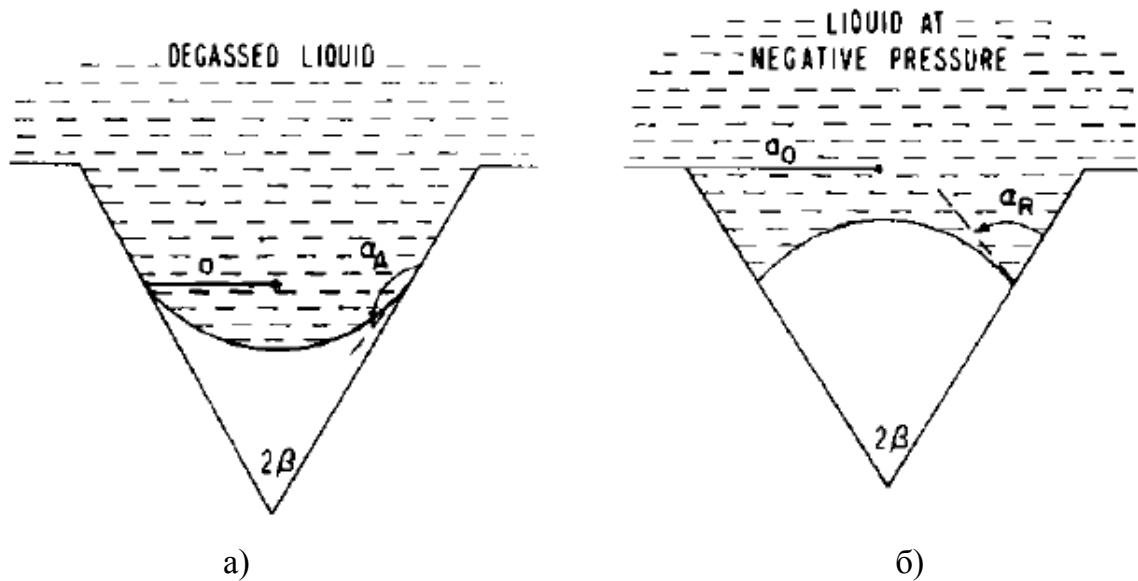


Рисунок 6. Несовершенно смачивается пора в частице примеси в двух состояниях: после дегазации (а) и при нуклеации (б). Поверхность жидкость-газ сдвигается к вершине при дегазации и от вершины при нуклеации [91].

Часто кавитацию ассоциируют именно с упомянутым выше процессом разрушения, вызванным коллапсом кавитационных пузырьков. Однако следует обратить внимание, что для суспензий различных веществ не всегда будет наблюдаться увеличение дисперсности. Так в [94] исследовали поведение состаренных суспензий монтмориллонита при ультразвуковой обработке. После длительной обработки ультразвуком концентрированной суспензии несколько увеличилось количество наиболее крупных и средних частиц, а количество частиц с размером меньше 1.5 мкм уменьшилось. В разбавленной же суспензии, количество больших и средних частиц уменьшилось, а частиц с размером менее 1.5 мкм напротив увеличилось.

Инерционный кавитационный пузырек теоретически в состоянии отделить крупные молекулы или наночастицы в суспензии от жидкости. Так, жидкость будет немного обеднена по концентрации небольших кластеров из наночастиц. С другой стороны, их концентрация будет очень высока в районе стенки пузырька в конце его коллапса. Движущей силой такого процесса является высокий градиент давления вблизи коллапсирующего пузырька. Превышение над концентрацией в остальном растворе может достигать нескольких порядков. Это увеличивает как вероятность присоединения

к этому кластеру отдельной наночастицы, так и вероятность слияния нескольких кластеров в один больший по размеру агрегат (рис. 7) [95].

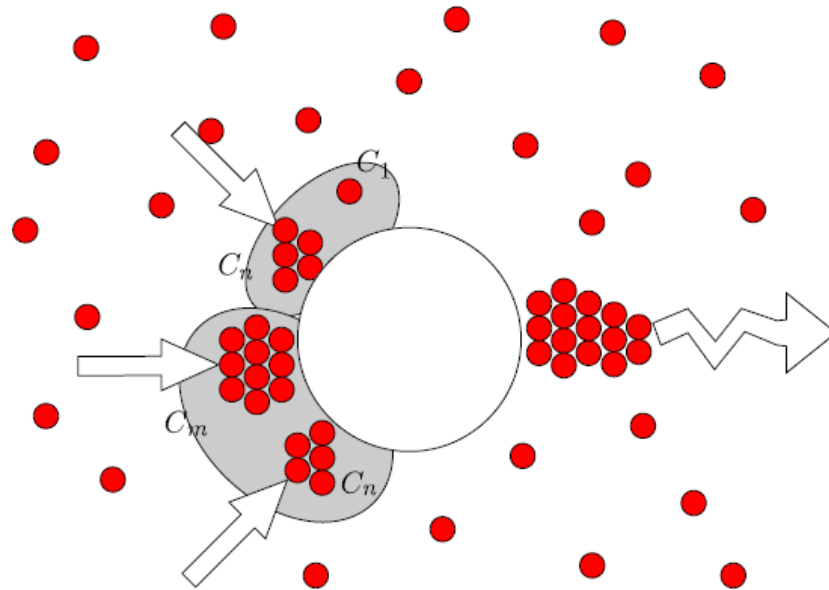


Рисунок 7. Рост кластеров в присутствии кавитационного пузырька. Из-за градиента давления кластеры среднего размера концентрируются вблизи стенки пузыря. При этом увеличивается вероятность агрегации между этими кластерами и наночастицами, а также прямой агрегации между двумя кластерами [95].

Подобные эффекты, возможно, имеют место и при сонокристаллизации. Кавитационный пузырек за счет указанного выше концентрирования небольших кластеров существенно облегчает образование критического зародыша. Это подтверждается, в частности, тем, что ультразвуковое воздействие на раствор существенно сокращает индукционный период кристаллизации [96]. На рисунке 8 показана зависимость индукционного периода от пересыщения при кристаллизации сульфата калия из водного раствора при ультразвуковом воздействии [97]. Видно, что во всех случаях ультразвуковое воздействие существенно уменьшает индукционный период, причем при низких пересыщениях кристаллизация начинается только при ультразвуковом воздействии.

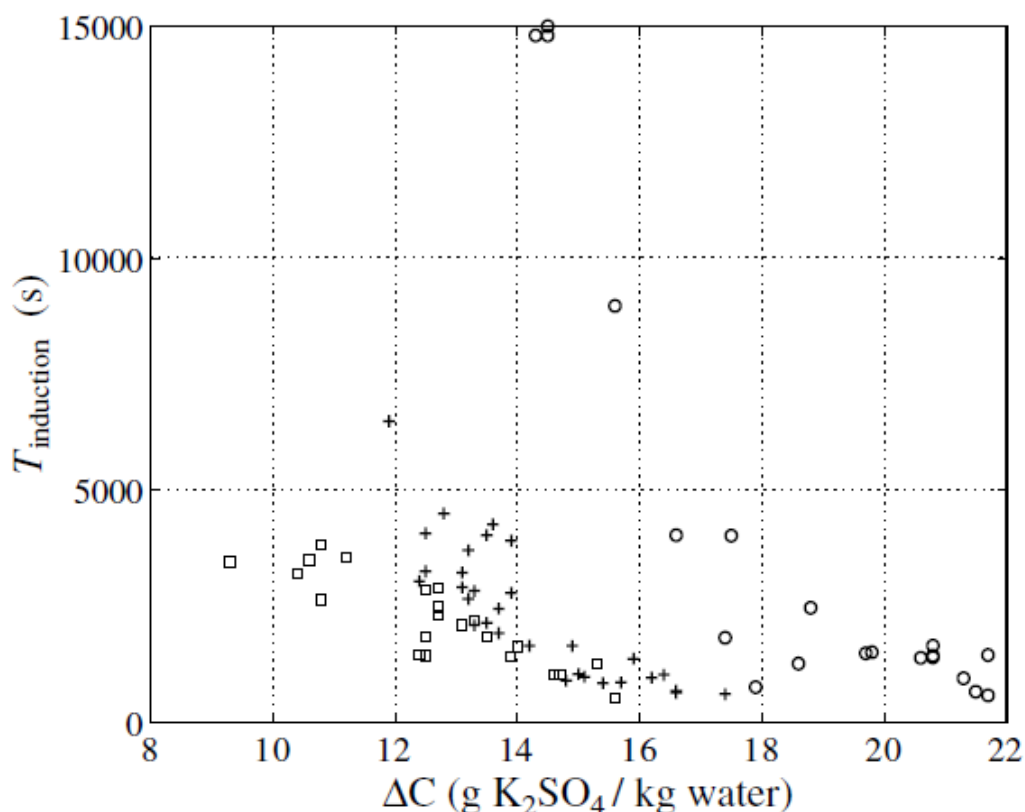


Рисунок 8. Зависимость индукционного периода от пересыщения при кристаллизации сульфата калия из воды без озвучивания (\circ) и при ультразвуковом воздействии (20 кГц) 40 Вт/кг раствора ($+$) и 120 Вт/кг раствора (\square) [97].

Кавитационные события ответственны за разрушающее действие ультразвука, в том числе в терапии онкологических заболеваний. Поэтому представляется важным контроль над такими событиями. Существует множество методов определения активности кавитации. Их можно разделить на три типа – измерение акустического излучения от кавитационных пузырьков, анализ последствий химических реакций, протекающих в среде при ультразвуковом воздействии, и непосредственное наблюдение кавитационных пузырьков [98].

Методы, регистрирующие акустическое излучение кавитационных пузырьков, основаны на том, что эти пузырьки являются вторичными источниками звука. Генерируемый в кавитационной области звуковой сигнал может быть принят с помощью гидрофона и проанализирован.

Одним из акустических индикаторов кавитационной активности является излучение субгармоники с частотой $f/2$. Амплитуда сигнала на этой частоте резко увеличивается, когда интенсивность ультразвука превышает порог инерционной

кавитации. Впервые излучение субгармоники $f/2$ кавитационными пузырьками было описано в работе [99]. Впоследствии было показано, что степень биологического повреждения клеток при ультразвуковом воздействии *in vitro* связана с интенсивностью сигнала этой субгармоники [100]. При неинерционной кавитации проявляются и другие гармоники – с частотой $2f$ и ультрагармоники $(2n+1)f/2$.

Кроме сигнала с определенными частотами (гармоники, суб- и ультрагармоники) кавитационные пузырьки генерируют широкополосный сигнал с непрерывным спектром – белый шум. Его уровень растет вместе ростом интенсивности кавитационной активности. По достижению порога инерционной кавитации уровень белого шума быстро увеличивается и далее растет пропорционально амплитуде давления ультразвука [80]. Возникновение белого шума при ультразвуковом воздействии было показано *in vitro* и *in vivo* [101, 102, 103].

Еще одним эффектом, возникающим в жидких средах при ультразвуковом воздействии, является излучение света, т.е. сонолюминесценция [104]. И хотя механизм этого явления понят еще не до конца, оно используется в качестве индикатора активности инерционной кавитации. Сонолюминесценция была зарегистрирована многими исследователями в экспериментах *in vitro* [103, 105, 106]. Применение данного метода для изучения кавитации *in vitro* и особенно *in vivo* существенно ограничивают оптические свойства сред, которые обычно мало прозрачны.

Индикатором кавитационной активности в облучаемом ультразвуком образце является протекание химических реакций. Причиной этого является образование различных ионизированных и возбужденных молекул, ионов, свободных радикалов при кавитационных событиях. Для определения активности кавитации обычно используется несколько реакций: выделение свободного йода из йодида калия [107], окисление сульфата железа (II) до сульфата железа (III), как и в дозиметрии ионизирующих излучений [108], окисление органических красителей [109] и др. Применение данного метода при изучении кавитационных процессов *in vivo* не представляется возможным.

Прямое наблюдение кавитационных пузырьков возможно с использованием методов высокоскоростной видеосъемки. Однако для высокочастотного ультразвукового воздействия визуальное обнаружение пузырьков становится затруднительным. Кроме того, как и в случае сонолюминесценции, оптические характеристики среды очень затрудняют наблюдение, делая его невозможным *in vivo*

[98]. Образование пузырьков в тканях может быть проконтролировано с помощью эхо-импульсных ультразвуковых систем визуализации. Так, была продемонстрирована регистрация образующихся в тканях животных при воздействии терапевтического ультразвука пузырьков размером более 10 мкм с помощью системы визуализации, работающей на частоте 8 МГц [110, 111].

1.3. Ультразвуковая терапия

Воздействие ультразвукового поля на биологические объекты обусловлено совместным действием целого ряда факторов, таких как механические колебания ткани, физико-химические эффекты, тепловые эффекты, обусловленные поглощением ультразвуковой энергии в тканях. Роль каждого из указанных факторов в суммарном биологическом эффекте ясна не в каждом случае [112].

При малых интенсивностях (до 2-3 Вт/см²) и на частотах порядка 10⁵-10⁶ Гц колебания частиц биологической среды производят своеобразный микромассаж тканевых элементов. Небольшой локальный нагрев тканей также способствует интенсификации процессов обмена веществ. Физико-химическое действие ультразвука может приводить к защелачиванию воспаленных тканей, что приводит к уменьшению воспалительных явлений. Влияя на диффузию, ультразвук повышает проницаемость клеточных оболочек, что может способствовать всасыванию лекарственных препаратов [113].

Перечисленные эффекты ультразвука позволяют его применение в физиотерапии. Обычно в медицинской практике пользуются частотами 0.8-2.7 МГц, а интенсивность может меняться в пределах 0.1-1.0 Вт/см² при длительностях процедур от 3 до 10 минут [114].

Ультразвуковая терапия достаточно давно применяется в медицине, в частности в терапии онкологических заболеваний. Одним из вариантов такого терапевтического воздействия является локальная ультразвуковая гипертермия. Традиционно локальная гипертермия применялась в клинической практике для увеличения эффективности радио- [115, 116] и химиотерапии [117, 118]. Различные варианты нагрева (микроволны, ультразвук и др. [119, 120, 121, 122]) обеспечивали повышение температуры целевого участка до 42-45 °С. Обоснование совместного использования гипертермии и радиотерапии состоит в следующем. Во-первых, гипертермия увеличивает

радиочувствительность пораженного участка, увеличивая радиационные повреждения в нем и препятствуя его репарации. Во-вторых, гипертермия сама по себе является цитотоксичной особенно в условиях опухоли, которые характеризуются пониженным кровоснабжением, гипоксией и пониженными значениями pH. Таким образом, сочетанное использование радиотерапии и гипертермии приводит к усилению терапевтического эффекта [115, 123]. Однако практическое применение такого подхода в клинике зачастую очень ограничено. Следует понимать, что такое усиление эффективности воздействия происходит также и в здоровых тканях. Следовательно, необходима высокая степень локализации как гипертермического, так и радиационного воздействия.

Гипертермия при умеренных температурах (41-43 °C) улучшает микроциркуляцию в тканях и проницаемость сосудов, что может быть использовано для усиления других видов терапии [124]. В частности, существуют примеры увеличения эффективности липосомальной химиотерапии [125, 126, 127].

В приведенных выше вариантах гипертермическое воздействие не приводит к необратимым изменениям тканей. С другой стороны, повышение температуры в зоне локализации воздействия выше 45 °C может их повреждать. Зависимость степени повреждения тканей от повышения температуры достаточно сложна [123, 128, 129]. Коагуляция и некроз возникают при температурах больше 50-55 °C при 1-2 минутах гипертермического воздействия. При больших температурах время сокращается. Такое воздействие обычно осуществляется с помощью высокоинтенсивного сфокусированного ультразвука (в англоязычной литературе – High-intensity focused ultrasound или HIFU, также в литературе можно встретить название «ультразвуковая хирургия»). Оно рассматривается как альтернатива к традиционной хирургии при лечении доброкачественных и злокачественных опухолей. Этот подход требует точной локализации и быстрой доставки энергии, особенно при глубокой локализации патологического очага и близком расположении критически важных здоровых органов и тканей [130].

При локализованном и контролируемом нагреве участков опухоли или здоровой ткани часто возникают различные сложности. Геометрия патологического очага зачастую достаточно сложна. Более того, его тепловые свойства, во-первых, гетерогенны и, во-вторых, изменчивы [131]. Теплопередача определяется

гетерогенность кровотока и значимыми сосудами (диаметром больше 0.1 мм), что приводит к локальным неоднородностям в распределении температуры, а также к перераспределению тепла в другие области. Это особенно характерно для больших опухолей, имеющих как области с малым кровотоком, так и хорошо васкуляризованные. В результате картина нагрева характеризуется наличием «холодных» областей с хорошей перфузией и «горячих» точек в некротизированных зонах. Характеристики кровоснабжения часто меняются во время сеанса терапии. При этом кровоснабжение может как полностью прекратиться, так и существенно усилиться в ответ на нагрев. Наличие «горячих точек» часто вызывает болевые ощущения, которые ограничивают возможность нагрева «холодных точек» до температур, необходимых для эффективного воздействия [130].

Таким образом, использование ультразвуковой хирургии во многом ограничивается необходимостью высокоточного наведения на очаг поражения, которое достаточно сложно реализовать. Для такого наведения может быть использована, например, техника МРТ, что существенно удорожает аппаратное оформление метода.

Ультразвук низкой интенсивности (меньше 5 Вт/см²) также находит применение в медицине. Спектр его применения, вероятно, даже шире, чем у высокоинтенсивного ультразвука. Так, низкоинтенсивный ультразвук совместно с различными сенсibilизаторами используется для воздействия на раковые клетки (сонодинамическая терапия). Он увеличивает активность препаратов для химиотерапии в стандартных схемах терапии и непосредственно воздействует на клетки и клеточные структуры (сонопорация) и др. Облучение новообразований низкоинтенсивным ультразвуком обычно легко осуществимо, так как оно не требует фокусировки, аппаратура для такого воздействия относительно недорога, а биологические эффекты, возникающие в здоровых тканях, незначительны. Кроме того, дополнительная локализация воздействия может осуществляться с помощью направленной доставки лекарственного препарата. Время сеанса терапии увеличиваются, по сравнению с ультразвуковой хирургией, но воздействие можно легко делить и дозировать [132].

Остановимся подробнее на сонодинамической терапии. Данный метод впервые был предложен японскими учеными [133, 134]. Его название происходит от фотодинамической терапии. Эти два метода имеют определенные общие черты. Так, терапевтический эффект возникает лишь при сочетанном действии двух факторов –

сенсibilизатора и физического воздействия (света или ультразвука). Метод сонодинамической терапии представляется очень привлекательным, так как из-за высокой проникающей способности ультразвука (до десятков сантиметров в зависимости от частоты [135]) позволяет воздействовать на глубоко локализованные опухоли, недоступные для фотодинамической терапии. Сравнение этих методов на подкожно локализованном плоскоклеточном раке у мышей показало существенное превосходство сонодинамической терапии. Это связано с ее более высокой эффективностью для глубоко локализованных участков опухоли [136].

В основе сонодинамической терапии лежит генерация активных форм кислорода при сочетанном действии низкоинтенсивного ультразвука, молекулярного кислорода и сенсibilизатора [137]. При отсутствии ультразвука сенсibilизатор не проявляет токсичности. Механизм генерации активных форм кислорода в сонодинамической терапии пока изучен не так хорошо, как в случае фотодинамической терапии [138]. Предполагается, что в основе сонодинамического эффекта лежат кавитационные события в среде, подверженной ультразвуковому воздействию. При инерционной кавитации происходит рост и последующий коллапс паро-газовых пузырьков. Коллапс сопровождается большим локальным выделением энергии, поэтому можно полагать область коллапса неким сонохимическим реактором [139]. На основе кавитационных явлений в среде были предложены два механизма активации соносенсibilизатора – сонолюминисценция и пиролиз.

Сонолюминисценция – процесс генерации света в жидкой среде, подвергаемой ультразвуковому воздействию. Предполагается, что сонолюминисценция возникает при коллапсе кавитационных пузырьков. Однако, существуют свидетельства наличия сонолюминисценции при неинерционной кавитации [140, 141]. В первых исследованиях по сонодинамической терапии было обнаружено световое излучение в солевых растворах в диапазоне 400-450 нм. Поэтому было предположено, что данное световое излучение может активировать сенсibilизаторы подобные гематопорфиру аналогично фотодинамической терапии [134]. Также существуют подтверждения возникновения сонолюминисценции не только *in vitro*, но и в модельных животных и различных тканях [142]. Не смотря на значимость данного процесса, он не может являться единственным активатором сонодинамического эффекта. Так, исследования с

использованием DPCN-P-Na(I) показали, что он обладает соносенсибилизирующим эффектом, но не является фотосенсибилизатором [143].

В литературе упоминается еще один возможный механизм активации сенсibilизатора – пиролитический. Он связан с локальными высокоэнергетическими процессами, сопровождающими коллапс кавитационного пузырька, в результате которых происходит распад сенсibilизатора с последующей генерацией свободных радикалов, реагирующих с различными эндогенными субстратами с образованием активных форм кислорода [144].

Также существуют определенные свидетельства в пользу цитотоксичности, вызванной не активными формами кислорода. Так, была показана соносенсибилизирующая активность гематопорфирина при интенсивностях ультразвука, недостаточных для развития кавитации [145]. В результате было высказано предположение, что чувствительность к ультразвуку связана с гидрофобностью сенсibilизатора, который связывается с клеточной мембраной и уменьшает ее прочность. Также было показано, что механическое разрушение мембран усиливается в присутствии производных родамина [146, 147].

В литературе упоминается целый ряд сенсibilизаторов для сонодинамической терапии. Гематопорфирин и фотофрин, производные порфирина, являются классическими сенсibilизаторами и используются для различных объектов и режимов ультразвукового воздействия [133, 134] (рис. 9). Также описаны и другие порфирины, проявляющие соносенсибилизирующую активность, в частности DPCN-P-Na(I) [143], монометилловый эфир гематопорфирина [148], протопорфирин IX [149], галлиевое производное порфирина ATX-70 [150], DEG [151] (рис. 10). В сонодинамической терапии находят применение близкие к порфиринам вещества – различные производные фталоцианинов алюминия [152], цинка [153, 154] и др.

Другим классом веществ, нашедших применение в сонодинамической терапии, являются ксантены. Ксантены это ряд красителей, который включает в себя эозин, родамин, флуоресцеин и др. Первоначально сонодинамическая активность была показана для эритрозина В [155] и бенгальского розового [156] (рис. 11). Бенгальский розовый показал себя достаточно эффективным соносенсибилизатором, но его малое накопление в опухолевой ткани очень ограничивало возможности клинического

применения. Для преодоления этой сложности были синтезированы его различные амфифильные производные [157].

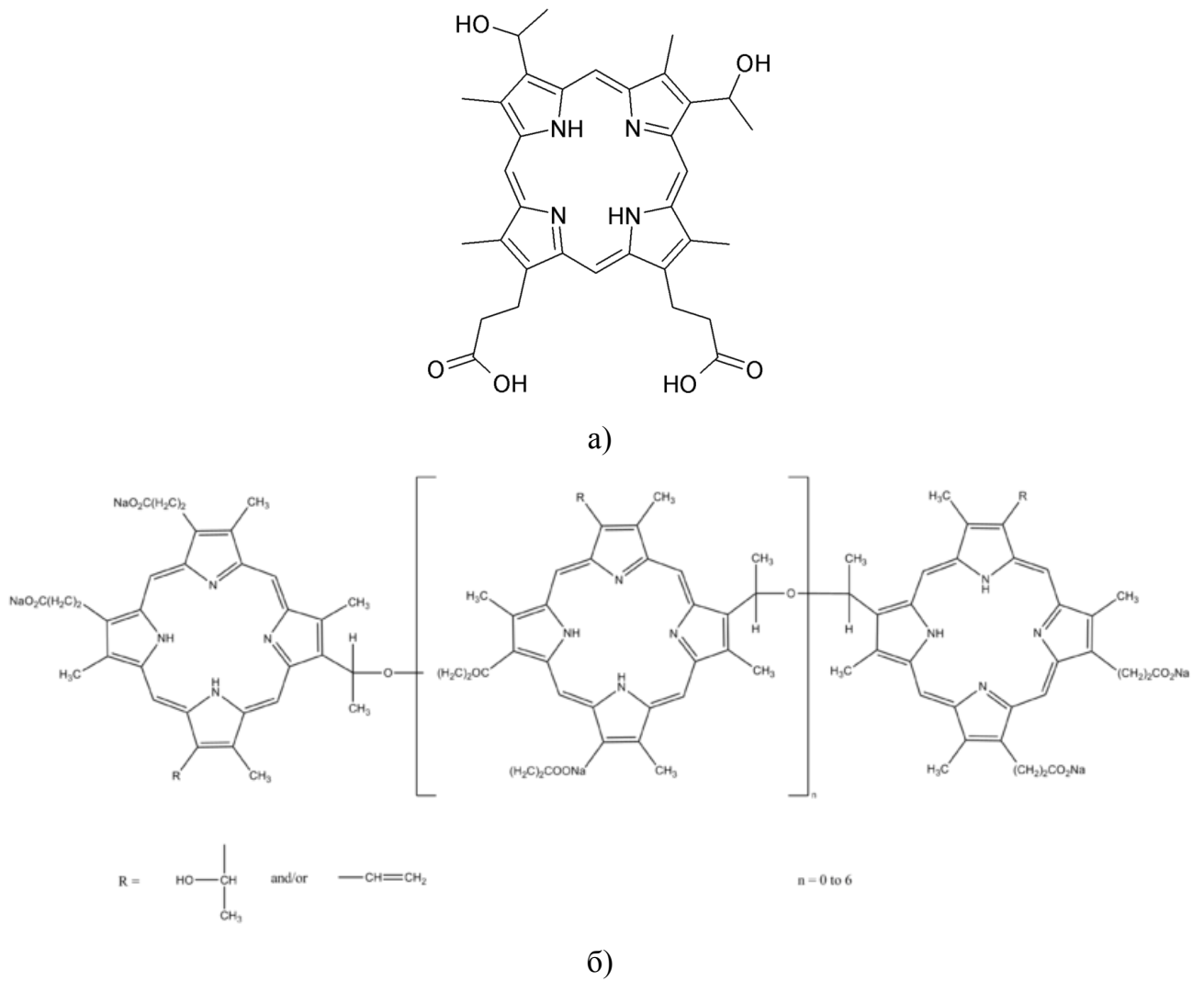


Рисунок 9. Структурные формулы гематопорфирина (а) и фотофрина (б).

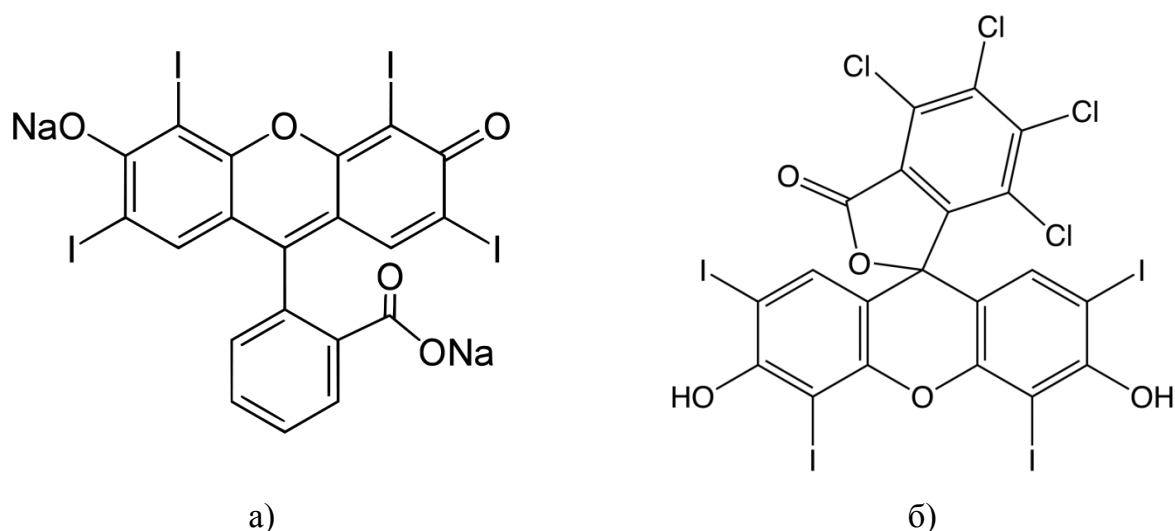


Рисунок 11. Структурные формулы эритрозина В (а) и бенгальского розового (б).

Классические противораковые препараты также проявляют соносенсибилизирующую активность. Одним из наиболее исследованных в различных схемах сонодинамической терапии цитостатических препаратов является адриамицин (доксорубицин) [158]. В различных исследованиях было установлено, что вызванная сонодинамическими эффектами активность кавитации, генерация активных форм кислорода, апоптоз клеток, повреждение ДНК усиливаются в присутствии адриабластина [159, 160]. Также была показана соносенсибилизирующая эффективность фторхинолоновых антибиотиков [161].

Особый интерес представляет использование нано- и микрочастиц в качестве соносенсибилизаторов. Многие упомянутые выше соносенсибилизаторы преимущественно накапливаются в опухолевой ткани, но небольшая часть все же попадает и в здоровые ткани. Это может вызвать нежелательные побочные эффекты. Так, часть соносенсибилизаторов проявляет также фотосенсибилизирующую активность и, следовательно, они будут вызывать повышенную светочувствительность у пациента. Также проблемой может быть низкая растворимость некоторых соносенсибилизаторов. Использование новых платформ для лекарственного транспорта может преодолеть эти сложности. Такой подход может как увеличить специфичность уже имеющихся сенсбилизаторов к опухолям, так и позволить использовать соединения, которые раньше признавались хорошими соносенсибилизаторами, но не использовались из-за незначительного удержания в опухоли. Последний недостаток характерен для бенгальского розового. Для преодоления этого недостатка в работе [162] в качестве

системы доставки были использованы микропузырьки. Традиционно они применялись как звукоконтрастные агенты [163], а позже как транспортные системы для лекарственных средств и генов [164, 165, 166]. В сонодинамической терапии система на основе липидных микропузырьков с ковалентно-пришитым бенгальским розовым показала высокий уровень генерации активных форм кислорода, усиление цитотоксичности на клеточной культуре и большее торможение роста опухоли, нежели свободный соносенсибилизатор [162].

Дополнительным фактором, влияющим на доставку наночастиц в опухоль, является отличие васкуляризации опухоли от таковой в нормальной ткани [167]. Сосуды в опухоли обладают большой пористостью. Сочетание этого с большим давлением межклеточной жидкости приводит к тому, что наночастицы с размерами 20-200 нм могут легко покидать сосуды и улавливаться в межклеточной жидкости. В англоязычной литературе этот эффект носит название «Enhanced permeability and retention effect» (EPR) – «Эффект повышенной проницаемости и удержания». Предполагается, что он может использоваться для доставки различных агентов в опухоли [168].

Следует отметить, что микро- и наночастицы могут не только обеспечивать лекарственный транспорт, но и быть соносенсибилизаторами. На роль таких частиц могут претендовать вышеупомянутые контрастные агенты на основе газовых микропузырьков. Так, в работе [169] производился анализ условий в оболочке микропузырька под воздействием ультразвука. В результате авторы сделали вывод, что можно ожидать чрезвычайно высокого напряжения оболочки и поведение сходное с кавитационным пузырьком, в том числе собственно кавитацию. Использование микропузырьков вместе с ультразвуком снижает порог кавитации, приводя к увеличению генерации свободных радикалов, что обычно связывают с гибелью клеток *in vitro* [170]. Также существует ряд работ, показывающий усиления ультразвукового гемолиза в присутствии контрастных агентов на основе микропузырьков [171, 172, 173]. Известны и другие частицы, которые можно использовать в качестве соносенсибилизаторов. Было показано, что микрометровые частицы алюминия усиливают разрушающее действие ультразвука на культуру раковых клеток [174]. Причем степень усиления зависит от размера и концентрации частиц. Однако режимы ультразвукового воздействия в данном исследовании были достаточно жесткими

(42 кГц, 70 Вт). Тем не менее в более щадящих режимах сонодинамический эффект тоже наблюдается. Так, на модельных животных было показано существенное торможение роста опухоли при совместном действии наночастиц золота и ультразвука [175]. Здесь были использованы стандартная для сонодинамической терапии интенсивность ультразвукового воздействия – 880 кГц 1 Вт/см², 2.64 МГц 2 Вт/см². Аналогичный эффект был показан и для наночастиц диоксида титана [176] и кремния [177]. Предполагается, что наличие твердофазных включений в среде приводит к увеличению интенсивности кавитационных процессов при ультразвуковом воздействии. Вторичные процессы, порожденные кавитацией, также могут активировать различные вещества. Так, в работе [178] к наночастицам золота, служащим своеобразными зародышами кавитации, пришивали протопорфирин IX, который активировался возникающей при кавитации сонолюминесценцией. Таким образом, использование нано- и микрочастиц различного строения дает ключ для создания сложной лекарственно-транспортной системы для сонодинамической или комплексной терапии онкологических заболеваний.

1.4. Ультразвуковые фантомы

Экспериментальные исследования воздействия ультразвука на животных обычно связаны с методическими трудностями и риском. Поэтому возникает потребность в различных системах, позволяющих исследовать различные эффекты ультразвукового воздействия. Таковую возможность предоставляют различные фантомы биологических тканей. Тканевые фантомы применяются для определения характеристик и калибровки систем ультразвуковой визуализации с шестидесятых годов 20 века. Фантомы также используются для сравнения эффективности различных ультразвуковых систем, для подготовки персонала, управляющего ультразвуковой техникой, при разработке новых ультразвуковых преобразователей, систем и методов диагностики. Преимуществом тканевых фантомов является то, что они могут быть изготовлены с заданными и/или хорошо определенными акустическими свойствами, размерами и внутренней структурой. Кроме того, те или иные эффекты можно исследовать в фантомах в «чистом» виде, не осложненными какими-либо затрудняющими факторами [179, 180].

Тканевые фантомы для ультразвуковых исследований должны обладать акустическими свойствами близкими к таковым у биологических тканей. Наиболее важными акустическими свойствами являются скорость звука, акустический импеданс, затухание, коэффициент обратного рассеяния и параметр нелинейности [181]. Для фантомов, используемых в отработке режимов различных вариантов термотерапии, к этим параметрам добавляются теплоемкость и теплопроводность [182]. Также важным практическим параметром является долговечность фантома, т.е. период времени, в течение которого его акустические и механические свойства остаются стабильными. Долговечность может варьироваться в широких пределах, от нескольких минут месяцев и даже лет, в зависимости от выбранных материалов и методики изготовления.

Самым очевидным материалом фантомов являются ткани различных животных (свиней, коров, птиц). Но ограниченная долговечность и сложности в регулировании акустических свойств существенно ограничивают их применение [183]. Поэтому большинство фантомов изготавливаются из синтетических материалов. К настоящему времени в качестве фантомов мягких тканей было опробовано большое количество рецептур – различные водные [184] и масляные [185] системы, гидрогели на основе желатина [186], агарозы [187], полиакриламида [188], полимеры [189], пищевые продукты [190] и др. Широкое распространение в практике получили различные гидрогелевые фантомы. Причиной этого является их дешевизна, легкость изготовления, относительная долговечность и возможность регулировать акустические свойства. Так, введение различных дисперсных добавок (графитового порошка, стеклянных шариков и др.) оказывает влияние на параметры рассеяния и затухания ультразвука в геле, а замена части воды на пропанол – на скорость звука [186]. Кроме того, фантомы на основе гидрогелей агарозы и полиакриламида из-за своей термической устойчивости хорошо подходят для различных тепловых исследований.

Отдельно следует отметить возможность создания термочувствительных фантомов на основе полиакриламидного гидрогеля с различными добавками, чувствительными к нагреву, например, альбумин, яичный белок, неионогенные ПАВ и термохромные красители.

Коагуляция альбумина или яичного белка при нагреве приводит к формированию белой непрозрачной области внутри гелевого фантома [191, 192]. Основным ограничением таких систем является необратимость коагуляции, в результате которой

данные фантомы приходят в негодность после использования. Для преодоления этого недостатка в качестве альтернативы альбумину и яичному белку были предложены неионогенные ПАВ. При повышении температуры до точки помутнения они претерпевают коллапс, сопровождающийся формированием белой непрозрачной области, а затем они возвращаются к своему первоначальному состоянию при охлаждении ниже их точки помутнения [193]. Также для создания многоцветных термочувствительных фантомов можно использовать термохромные красители. Они обычно окрашены ниже некоей пороговой температуры и теряют окраску при переходе выше нее [194].

1.5. Выбор объектов исследования и параметров ультразвукового воздействия

Выбор объектов исследования, методов синтеза и режимов ультразвукового воздействия определялся целью и задачами исследования. В данной работе основным ориентиром для выбора модельных объектов являлось приближение к условиям, близким к тем, которые используются в методе сонодинамической терапии злокачественных опухолей.

Исходя из этого, в качестве фантомов опухолевой ткани были выбраны гидрогели. Гидрогели широко используются для моделирования биологической ткани, относительно легко изготавливаются и изменяют свои акустические свойства в результате введения дисперсных добавок. Общим требованием к ним в контексте поставленных задач было различие в физико-химических свойствах и характере взаимодействия с твердофазными модификаторами, удобство акустических измерений и возможность управления массой включений. Дополнительным условием выбора являлась возможность оценки степени разрушения полимерной матрицы ультразвуковым воздействием. В результате были выбраны гидрогели на основе желатины, агарозы, полиакриламида и плюроника.

В качестве модификаторов использовали неорганические соединения, отличающиеся свойствами поверхности и морфологией: сульфат бария, гидроксид железа (III), силикагель, сажа, гидроксиапатит и кальциевая соль октакарбокситаллоцианина кобальта (терафтал). При этом терафтал и гидроксиапатит

были использованы в экспериментах на живых системах (бактерии и экспериментальные животные).

Твердофазные модификаторы синтезировали в гидрогелях двумя способами методом встречной диффузии и введением на стадии синтеза гидрогелей. Первый метод моделирует образование соносенсибилизаторов в опухолевой ткани при введении растворимых прекурсоров в кровоток, второй – введение в кровоток готовых твердофазных соносенсибилизаторов.

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.

Таким образом, объекты исследования – гидрогели, отличающиеся физико-химическими свойствами, и модификаторы с различной морфологией и свойствами поверхности в различном сочетании друг с другом – дают возможность осуществить достаточно широкий скрининг факторов, определяющих величины акустических эффектов (температурных и кавитационных) в модифицированных твёрдой фазой гидрогелях.

Эффективность совместного действия ультразвука и твердофазных включений и её корреляцию с результатами физико-химических исследований оценивали на бактериальных моделях и в экспериментах на животных.

2. Экспериментальная часть

2.1. Реактивы

Реактивы карбонат кальция, хлорид кальция, хлорид железа (III), сульфат натрия, хлорид бария, персульфат аммония, желатина («Реахим»), водный раствор аммиака, соляная кислота, фосфорная кислота («Лаверна»), акриламид («Reanal»); N,N'-метилден-бис-акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Lancaster»), плуроник F127, глицерофосфат кальция, трис(гидроксиметил)аминометан – трис (Sigma), щелочная фосфатаза (Rosche), октакарбокситфалоцианин кобальта – терафтал (НИОПИК) использовали без дополнительной очистки.

Для определения активности щелочной фосфатазы использовали набор реагентов производства фирмы «Вектор-Бест».

В работе использовалась буферная система трис-HCl с pH 9.1. Для приготовления растворов использовали 0.2 М трис и 1 М HCl из фиксанала. Итоговая концентрация по трис составляла 0.05 М.

2.2. Синтез гидрогелей

Гидрогель агарозы готовили растворением твердой агарозы в воде при нагревании до 90 °С в концентрации 1.5 и 3 масс. %. Затем раствор медленно охлаждали до 20 °С, в результате чего происходило его студнение.

Гидрогель полиакриламида получали сополимеризацией акриламида (мономер) и N,N'-метилден-бис-акриламида (сшивки) в водном растворе. Концентрации мономера и сшивки составляли 10 % и 0.5 % по массе, соответственно. В качестве инициатора использовали окислительно-восстановительную пару персульфат аммония – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Концентрации инициаторов составляли 0.25 % по массе. Перед добавлением инициаторов раствор мономера и сшивки продували аргоном в течение 20 минут для удаления кислорода.

Гидрогель желатины готовили растворением твердой желатины в воде при нагревании до 90 °С в концентрации 10 % по массе. Затем раствор медленно охлаждали до 20 °С, в результате чего происходило его студнение.

Гидрогель плюроника готовили растворением твердого плюроника F127 в воде при охлаждении до 5 °С. Образование геля происходило при нагреве полученного раствора выше критической точки.

Полиакриламидный гидрогель с иммобилизованной щелочной фосфатазой

Гель полиакриламида получали сополимеризацией акриламида (мономер) и N,N'-метилден-бис-акриламида (сшивка) в водном растворе. Концентрации мономера и сшивки составляли 20 % и 0.5 % по массе, соответственно. Концентрация фосфатазы в исходном растворе выбрана 0.5 и 5 мкг/мл. В качестве инициатора использовали окислительно-восстановительную пару персульфат аммония – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Концентрации инициаторов составляли 0.25 % по массе.

Растворяли 1 г мономера и 25 мг сшивки в 4 мл трис буфера с pH=9.1, добавляли необходимое количество фермента. Полученный раствор продували аргоном в течение 20 минут для удаления кислорода. Добавляли при перемешивании 12.5 мкл тетраметилэтилендиамин, затем 60 мкл раствора персульфата аммония с концентрацией 20 % по массе. Реакционную смесь помещали в форму и выдерживали в ней 1.5 часа.

Гидрогель агарозы с иммобилизованной щелочной фосфатазой

При нагревании на водяной бане до ~90 °С растворяли 150 мг агарозы в 10 мл трис буфера. Охлаждали полученный раствор до ~60 °С и вносили 100 мкл раствора щелочной фосфатазы (50 мкг/мл), перемешивали и охлаждали до комнатной температуры. Концентрация фосфатазы в геле составляла 0.5 мкг/мл.

2.3. Синтез твердофазных модификаторов

Синтез гидроксиапатита

Оксид кальция CaO получали с помощью термического разложения карбоната кальция CaCO₃ (квалификация «х.ч.») в печи (МИМП, Россия) при температуре 1100°С (выдерживание в течение 3 ч).



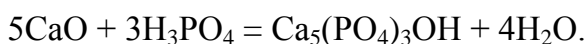
Полноту протекания разложения карбоната контролировали гравиметрически и титриметрически, определяя содержание Ca²⁺ (ЭДТА, индикатор – флуорексон).

Ортофосфорную кислоту необходимой концентрации получали разбавлением исходной фосфорной кислоты (концентрация 87%, квалификация «ос.ч.») дистиллированной водой с последующим пикнометрическим определением

концентрации раствора. В эксперименте использовали раствор кислоты с концентрацией 3.28 М.

Количество реагентов в каждом синтезе задавали таким образом, чтобы отношение Ca/P в конечном продукте составляло 1.67 ± 0.03 .

Синтез ГАП проводили по реакции CaO с ортофосфорной кислотой (H_3PO_4) в водной среде.



Навеску CaO помещали в реактор, снабжённый рН-электродами, добавляли 500 мл дистиллированной воды и гомогенизировали смесь с помощью лопастной мешалки ER-10 (Германия) до установления стабильных показателей рН. Кислоту вводили при комнатной температуре через керамический капилляр. Скорость подачи кислоты задавали с помощью специального перистальтического насоса. В ходе синтеза контролировали расход кислоты, рН и время. Реакцию останавливали при рН = 6.5-7. После этого отключали подачу кислоты и перемешивали образовавшуюся суспензию еще 5 мин.

Ферментативный синтез

Фосфаты кальция синтезировали ферментативным гидролизом глицерофосфата кальция в присутствии фермента щелочной фосфатазы. При этом варьировали концентрацию фермента, состав среды (водная, трис буфер), рН (7-10) концентрацию кальция и время реакции. Реакцию гидролиза глицерофосфата запускали добавлением раствора фермента к раствору глицерофосфата кальция, взятого в концентрации 0.02 М. Рабочие концентрации фермента находились в интервале 0.02-0.5 мкг/мл. В результате гидролиза в раствор начинал поступать фосфат-ион и происходило образование нерастворимого осадка фосфата кальция. В зависимости от условий, реакция проводилась от нескольких часов до нескольких суток. Для дальнейшего исследования осадок отделяли фильтрованием на ядерном фильтре, промывали водой и высушивали на воздухе.

2.4. Синтез модифицированных гидрогелей

Модификация методом встречной диффузии

Данным методом модифицировали гидрогели агарозы и полиакриламида. Модификацию проводили последовательной пропиткой 20 г готового гидрогеля сначала

в 1 л раствора реагента *A* (табл.), а затем в 1 л раствора реагента *B* (табл. 1). Пропитка каждым из растворов проводилась 48 часов. После пропитки вторым реагентом модифицированные гидрогели отмывали большим количеством воды в течение 72 часов.

Таблица 1. Концентрации реагентов при модифицировании гидрогелей методом встречной диффузии. TF – октанатриевая соль октакарбокситфталоцианина кобальта (терафтал), CaTF – кальциевая соль октакарбокситфталоцианина кобальта

Реагент <i>A</i>	Концентрация, М	Реагент <i>B</i>	Концентрация, М	Модификатор	Массовая доля, %
FeCl ₃	0.1	NH ₃	4	FeOOH	1
FeCl ₃	0.2	NH ₃	4	FeOOH	2
BaCl ₂	0.04	Na ₂ SO ₄	1	BaSO ₄	1
BaCl ₂	0.08	Na ₂ SO ₄	1	BaSO ₄	2
TF	2·10 ⁻³	CaCl ₂	1	CaTF	2

Модификация агарозного гидрогеля методом механического смешения

Гель агарозы готовили растворением твердой агарозы в воде при нагревании до 90 °С в концентрации 1.5 и 3 масс. % с последующим введением в полученный раствор рассчитанного количества твердого модификатора. Раствор охлаждали до 50 °С при перемешивании, а затем перемешивание снимали и продолжали охлаждение до 20 °С, в результате чего происходило образование гидрогеля.

Модификация гидрогеля пльороника методом механического смешения

Сначала растворяли твердый пльороник F127 в воде при охлаждении до 5 °С. В полученный раствор вводили рассчитанное количество твердого модификатора. При перемешивании нагревали полученную суспензию до 15 °С. Затем перемешивание снимали и нагревали смесь выше критической точки. При этом происходило образование геля.

Определение активности фосфатазы

Определение активности фосфатазы проводили по «конечной точке». Для этого к 1 мл рабочего раствора, содержащего диэтаноламин (1 М), п-нитрофенилфосфат (5 мМ) и хлорид магния (0.5 мМ), добавляли раствор фермента. Реакционную смесь

выдерживали в термостате при 36 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0.5 М раствора гидроксида натрия. Концентрацию продукта определяли спектрофотометрически на длине волны 405 нм.

Минерализация гидрогелей ферментативным способом

Образцы полученных гидрогелей с иммобилизованной щелочной фосфатазой помещали в емкости с 50 мл раствора глицерофосфата кальция 0.02 М в трис буфере (рН=9.1) и оставляли на 7 суток. Через 1 неделю образцы гидрогелей извлекали из растворов и помещали в дистиллированную воду. Кинетические и адсорбционные измерения, относящиеся к включению щелочной фосфатазы в гидрогели, выходом её из гидрогелей в среду и связыванием с поверхностью твёрдой фазы, оценивали по активности фермента.

2.5. Измерение температурных эффектов

Дистанционное измерение температуры

Температурные эффекты влияния акустического поля на модифицированные гелевые тела оценивали с помощью пирометра С-300.3 «Фотон» (рис. 12а). Ультразвук вводили в модифицированный гелевый образец цилиндрической формы (диаметр 2.5 см, высота 2 см) через контактную среду снизу, а замер температуры проводили сверху, с торца, находящегося в контакте с воздухом, с площади $\sim 5 \text{ мм}^2$. При оценке температурных эффектов акустического поля использовали ультразвук с частотой 2.64 МГц и интенсивностью до 5 Вт/см^2 . Расстояние от излучателя до гелевого образца составляло 10 см.

Контактное измерение температуры

Измерение температуры проводили с помощью термопары (рис. 12б). В термостат с дистиллированной водой помещали гелевый образец цилиндрической формы. При этом ось симметрии образца располагали горизонтально. Соосно образцу размещали ультразвуковой излучатель на расстоянии 10 см от образца. В центр образца по его оси вводили игольчатую термопару, ориентированную вдоль акустического поля. Показания с термопары считывали при помощи цифрового мультиметра АРРА-107N. При оценке температурных эффектов акустического поля использовали ультразвук с частотой 2.64 МГц и интенсивностью до 5 Вт/см^2 .

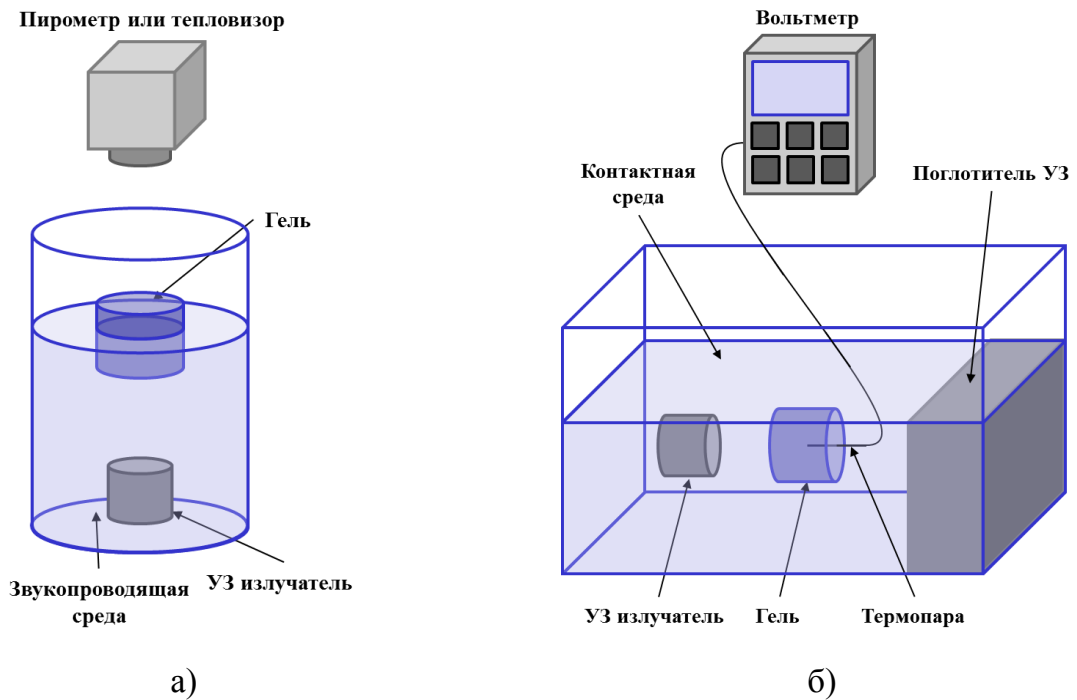


Рисунок 12. Схема для бесконтактного (а) и контактного (б) измерения температурных эффектов акустического воздействия, возникающих в гидрогелевых системах.

2.6. Измерение кавитационных эффектов

Акустические измерения в ближнем поле

Схема установки для акустических измерений приведена на рисунке 13. Цилиндрический гидрогелевый образец (диаметр 2.5 см, высота 2 см) помещали в непосредственный контакт с ультразвуковым излучателем (диаметр 2 см), находящимся в дегазированной дистиллированной воде. Широкополосный гидрофон с диаметром чувствительного элемента 2 мм располагали в непосредственной близости от боковой поверхности образца. Сравнительную оценку кавитационных свойств различных гидрогелей проводили с помощью индикатора кавитации IS-3MS, разработанного в Белорусском государственном университете информатики и радиоэлектроники. Принцип действия прибора основан на регистрации уровня рассеянного шума в полосе частот от 2 МГц до 10 МГц, принимаемого широкополосным гидрофоном. При оценке кавитационных эффектов акустического поля использовали ультразвук с частотой 0.88 МГц и интенсивностью до 3 Вт/см^2 .

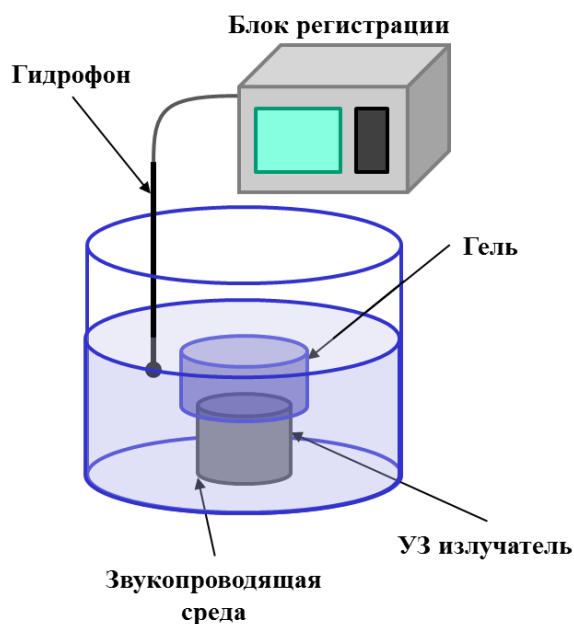


Рисунок 13. Схема установки для измерения акустических шумов в гидрогеле, находящемся в ближнем поле ультразвукового излучателя.

Акустические измерения в дальнем поле

Эксперименты проводили совместно с отделом медицинской акустики и биоакустики АКИН им. Н.Н.Андреева. Ультразвуковое воздействие на образец осуществлялось с помощью фокусирующего излучателя (частота $f = 0.969$ МГц, диаметр пластины 62 мм, фокусное расстояние 70 мм) (рис. 14). При этом расчётные значения фокальной области составляли: диаметр 4.4 мм, длина 16 мм. Измерения проводились в частично заглушенном резервуаре с отстоявшейся водой. Размер резервуара: $20 \times 56 \times 28$ см³. Излучатель (1) крепился к штанге координатного устройства, позволявшего перемещать его в трёх взаимно перпендикулярных направлениях, а также изменять контролируемым образом угол наклона оси излучателя. С целью минимизации возможности возникновения кавитационных явлений по пути распространения ультразвукового пучка в воде на излучатель надевали согласующий конус, выходное отверстие которого затягивалось звукопрозрачной плёнкой, и заполняли дегазированной водой. Образец (2), «мягко» закреплённый на специальной подставке, располагался в центре резервуара, соосно оси излучателя, и торец его, перпендикулярный оси звукового пучка, прижимался к выходному отверстию согласующего конуса. При этом вся фокальная область излучателя была полностью погружена в образец (центр её был заглублён, приблизительно, на 15 мм от торца).

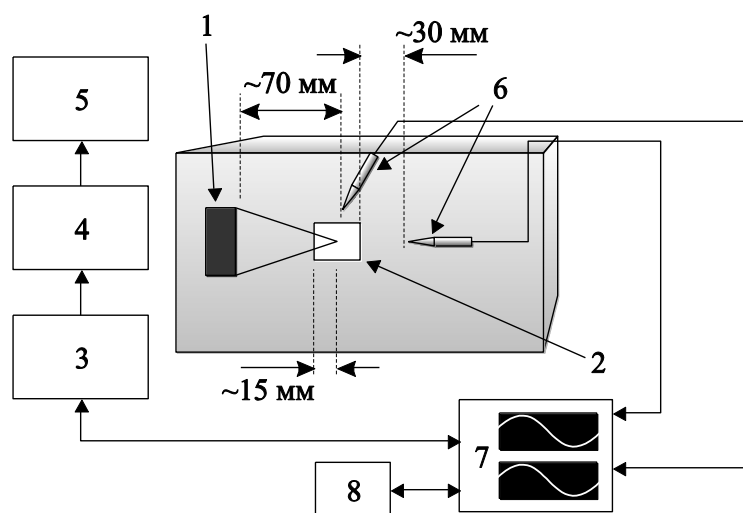


Рисунок 14. Схема экспериментальной установки: 1 – пьезоэлектрический фокусирующий излучатель ($f = 0.969$ МГц, $\varnothing 62$ мм, $F70$ мм), 2 – образец, 3 – задающий прецизионный генератор (ГЗ-110), 4 – усилитель мощности (УЗГМ 50-dB), 5 – контрольный милливольтметр, 6 – гидрофоны, 7 – цифровой осциллограф ЛА-н4USB, 8 – персональный компьютер.

Воздействие осуществлялось одиночными прямоугольными импульсами длительностью 60 мс, следовавшими один за другим с фиксированным интервалом (15, 20, 30, 60 и 120 мс), с пошаговым увеличением мощности падающей волны на 1 дБ. Общая акустическая мощность излучателя, определявшаяся предварительно в воде методом измерения радиационной силы, варьировалась в пределах от 0.02 до 87 Вт. Этим значениям соответствовало изменение амплитуды от 22 дБ до 55 дБ. Соответственно, расчетное значение интенсивности ультразвука, усреднённое по сечению фокального пятна, изменялось в интервале от 0.1 до 466 Вт/см^2 . В качестве приёмников акустического сигнала использовались два гидрофона (6), которые представляли собой миниатюрные пьезокерамические цилиндрики, вклеенные в металлические трубочки (внешний диаметр 2 мм). Приёмники размещались в воде: один на оси ультразвукового пучка на расстоянии 45 мм от фокуса, другой – в фокальной плоскости в 15 мм над фокусом. Сигнал с гидрофонов поступал на вход двухканального 8-разрядного аналого-цифрового преобразователя ЛА-н4USB, соединённого с персональным компьютером через USB порт. Полоса пропускания измерительного канала 100 МГц, чувствительность по входу ± 0.125 В, частота дискретизации 15.625 МГц. Сигналы визуализировались на экране монитора компьютера и

записывались в память в виде WAV-файлов. На стадии обработки данных проводился спектральный анализ сигналов, измерялись значения амплитуды основной гармоники f , а также спектральных компонент на частотах $f/2$ и $3/2f$, усреднённые за время действия ультразвукового импульса, уровень шума составлял -85 дБ.

Сонолюминесценция

Эксперименты по сонолюминесценции проводили совместно с лабораторией ультразвуковых технологий и оборудования БГУИР на установке, схема которой представлена на рисунке 15. Рабочая ёмкость выполнена в виде цилиндра из нержавеющей стали с полыми охлаждаемыми водой стенками внутренним диаметром 120 мм и высотой 180 мм. Пьезокерамический вогнутый излучатель диаметром 65 мм и фокусным расстоянием 100 мм. (1) вмонтирован в днище ёмкости. Резонансная частота пьезоэлемента $f_0 = 720$ кГц. На уровне фокального пятна (2) излучателя в боковой поверхности ёмкости выполнено окно диаметром 2 см, в котором размещён световод фотоумножителя (4) – Philips XP 1110.

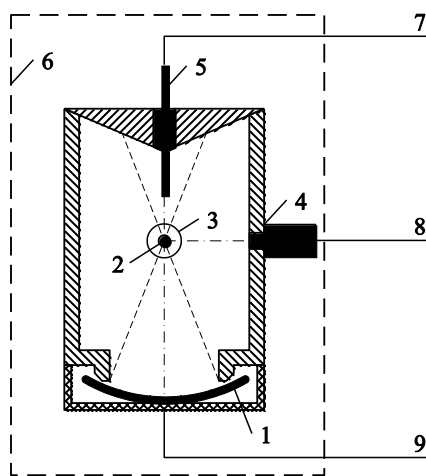


Рисунок 15. Схема экспериментальной ячейки: 1 – излучатель, 2 – фокальное пятно, 3 – кавитационная область, 4 – фотоумножитель, 5 – гидрофон, 6 – светонепроницаемый короб, 7, 8 – на осциллограф, 9 – от генератора.

Торец ёмкости, противоположный излучателю, снабжён конической крышкой, покрытой изнутри поглощающим материалом, что обеспечивает режим, близкий к режиму бегущей волны. Гидрофон (5) вмонтирован через крышку ёмкости таким образом, что его приёмный пьезокерамический элемент диаметром 2 мм и толщиной 0.25 мм находится за фокальным пятном излучателя на расстоянии 25 мм от него.

Методика проведения экспериментов состояла в следующем. Ячейку заполняли дистиллированной водой и отстаивали в течение двух суток. Затем жидкость дегазировали под действием ультразвука в течение 20 мин при напряжении на излучателе 170 В (~ 10 Вт/см²). Предварительная частичная дегазация жидкости существенно повышает воспроизводимость результатов [195]. После дегазации емкость закрывали герметично крышкой.

В экспериментах напряжение на излучателе увеличивали со скоростью 2 В/с до момента возникновения сонолюминесценции. Результат оценивали по значению величины минимального (порогового) напряжения на излучателе $U_{\text{пор}}$, при котором возникает сонолюминесценция. Исследовались зависимости этого параметра от концентрации наночастиц для различных скважностей импульса ультразвукового поля $N=T/\tau$, где T – период следования импульсов ультразвука, τ – длительность импульсов. Температура поддерживалась равной 21°C с точностью $\pm 1.5^\circ\text{C}$.

Ультразвуковая деструкция полимеров

Нагретые до 35 °С гели плуроника с твердофазными включениями подвергали ультразвуковому воздействию. Параметры ультразвука – частота 0.88 МГц, интенсивность 1 Вт/см². После озвучивания гели охлаждали, полученные при этом растворы разбавляли водой и отделяли твердофазные соносенсибилизаторы центрифугированием и фильтрованием через ядерный фильтр (диаметр пор 0.2 мкм). Небольшие порции полученных растворов (1 мл) высушивали на установке для лиофильной сушки и определяли молекулярно-массовые характеристики полимеров.

Молекулярно-массовые характеристики полимеров определяли методом гельпроникающей хроматографии в тетрагидрофуране при 35 °С с рефрактометрическим детектором и колонками, наполненными ультрасиликагелем с размерами пор 10^3 , 10^5 Å, и линейной колонкой.

Калибровочная зависимость определяется по полидисперсным этиленгликолям фирмы «Sigma».

2.7. Бактериальная модель

В качестве объектов исследования были выбраны бактерии *Escherichia coli* (*Enterobacteriaceae*), которые являются постоянным компонентом кишечной микрофлоры и бактерии *Enterococcus spp.*, также приспособленные к существованию в

условиях человеческого организма. Культуру *E. coli* выращивали на среде Mac Conkey, культуру *Enterococcus spp.* выращивали на среде PCA (Standard Methods agar) в чашках Петри при 37 °С. Эксперименты с ультразвуковым воздействием проводили на суспензии микроорганизмов. Для приготовления суспензии бактериальные клетки смывали с поверхности среды физиологическим раствором pH 7.1. Концентрация бактерий в суспензии составляла 2000-4000 клеток на 1 мл рабочего раствора.

Оценка воздействия ультразвука на суспензию бактерий

В суспензию бактерий добавляли терафтала в концентрации 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М, время инкубации составляло 10 минут. После инкубации суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут. Ультразвуковую обработку проводили в термостатируемой ячейке при температуре 37 °С. Объект располагался на расстоянии 1 см от излучателя (ближнее поле), частота 0.88 МГц, интенсивность воздействия варьировали в интервале 1-3 Вт/см².

Эффективность воздействия оценивали по числу клеток выживших после этого воздействия, используя принцип Коха – способность каждой бактериальной клетки образовывать колонию на гелевой среде. Сопоставляли количества колониеобразующих единиц бактерий у следующих образцов – контрольная суспензия (без обработки), суспензия после обработки ультразвуком, суспензия с добавлением терафтала и суспензия с добавлением терафтала, обработанная ультразвуком. Для этого из каждого образца отбирали стандартную пробу (1 мл), которую переносили на среду для культивирования микроорганизмов в чашку Петри. Чашки с бактериями термостатировали при 37 °С в течение суток, после чего производили подсчет выросших колоний. Итоговый результат воздействия оценивали в процентном соотношении количества колониеобразующих единиц бактерий контроль/опыт.

2.8. Экспериментальные животные

Все эксперименты на животных проводили в институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, в лаборатории комбинированной терапии опухолей.

В опытах использовали мышей обоего пола BDF1 массой тела не менее 21-23 г из разведения РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, которых содержали в виварии РОНЦ РАМН на брикетированных кормах. Перед опытами мышей ранжировали по группам ($n=6-10$).

Опухолевые модели

Опыты проводили на прогностически значимых развившихся в мышцах (в/м) лапки мышей перевиваемой меланоме В16. Трансплантацию выполняли по 20 мг взвеси опухолевой ткани в 0.1 мл питательной среды 199. Средний объем (V_{cp}) опухолевых узлов к началу лечения (6-9-е сутки после трансплантации, экспоненциальная фаза роста) составил $V_0=1.05\pm 0.05$ см³, в группах мышей ($n=6-10$) ранжировали так, чтобы разброс по объему не превышал 10%.

Локальная ультразвуковая терапия in vivo

Воздействие осуществляли с помощью разработанной нами оригинальной ультразвуковой установки УСДТ-м (рис. 16). Установка состоит из блоков автономных излучателей-генераторов, блока питания и специального штатива для крепления экспериментальных животных. Рабочий режим обеспечивался одновременным воздействием ультразвука двух частот – 0.88 МГц 1 Вт/см² и 2.64 МГц 2 Вт/см². Температуру в опухоли контролировали с помощью термодпары, введенной в опухоль. В качестве контактной среды для ультразвука использовали термостатируемую дегазированную воду. Требуемое значение температуры в опухоли получали вариацией температуры контактной среды в интервале 37-40 °С. Время выхода на заданный температурный режим составляло 30 с.

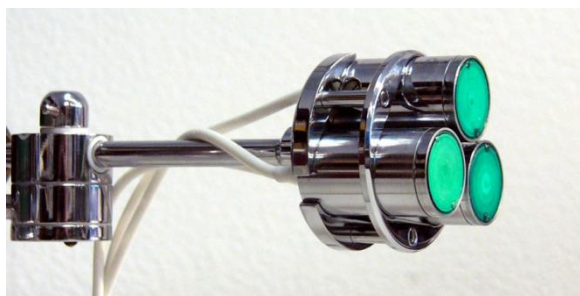
Оценка эффективности лечения

Об эффективности судили по динамике размеров опухолевых узлов, рассчитанной по соотношению средних объемов до и после лечения (V_t / V_0).

Первоначально определяли время удвоения объема («τ»), затем вычисляли коэффициент (K) усиления противоопухолевого эффекта комбинированного воздействия как соотношение «τ» в опыте к «τ» в контроле ($n=6-10$). Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного метода Фишера-Стьюдента.



а)



б)



в)

Рисунок 16. Установка для локальной ультразвуковой терапии опухолей УСДТ-м: а) автономный облучатель, б) рабочий блок излучателей, в) установка в сборе.

2.9. Мессбауэровская спектроскопия

Измерения мессбауэровских спектров проводились на установке электродинамического типа с постоянным ускорением МС 1101 производства компании MosTec (НИИ физики РГУ, Ростов-на-Дону, Россия). В качестве стандартного источника γ -квантов использовался ^{57}Co на родии. Величины изомерных сдвигов приведены относительно $\alpha\text{-Fe}$. Обработка экспериментальных спектров велась методом наименьших квадратов с помощью программы Univem MS v2.02beta1 (MosTec, НИИ физики РГУ, Ростов-на-Дону, Россия).

2.10. Сканирующая электронная микроскопия

Подготовка образцов гидрогелей

Образцы гидрогелей размером $\sim 1 \times 1 \times 1$ мм помещали на 30 с в жидкий пропан, затем переносили в охлажденный до -95 °С ацетон. Постепенно повышали температуру

ацетона с образцом до комнатной. Материал высушивали в установке сушки в критической точке (HSP-2, Hitachi) в атмосфере CO₂.

Подготовка образцов бактериальных культур

Образцы бактериальных культур на мембранном фильтре (размер пор 200 нм) помещали на 30 с в жидкий пропан, затем переносили в охлажденный до –95 °С ацетон. Постепенно повышали температуру ацетона с образцом до комнатной. Материал высушивали в установке сушки в критической точке (HSP-2, Hitachi) в атмосфере CO₂.

Подготовка дисперсных твердых образцов

Небольшую порцию сухого образца суспендировали в 1 мл воды на вортексе и озвучивали в ультразвуковой ванне в течение 30 с (параметры ультразвука: частота 22 кГц, мощность 50 Вт). Полученную суспензию отфильтровывали под вакуумом на ядерном фильтре с диаметром пор 100 нм, промывали водой, спиртом, а затем высушивали на воздухе. От полученного фильтра отрезали участок с осадком размером ~3×3 мм и наклеивали на электронно-микроскопический столик.

Просмотр образцов

Образцы напыляли золотом (толщина слоя 10 нм) в ионно-напылительной установке IB-3 (EIKO). Материалы просматривали в микроскопе JEOL JSM-6380LA или CamScan-4 при ускоряющем напряжении 15 кВ.

2.11. Трансмиссионная электронная микроскопия

Бактериальные образцы

Фиксацию клеток после проводили 2% раствором глутарового альдегида на 0.05 молярном фосфатном буфере. Часть материала фиксировали 1% раствором четырехокси осмия. Начальное обезвоживание проводили в серии спиртов восходящей концентрации, затем дополнительно контрастировали уранилацетатом в 70% спирте (1 сутки), далее еще раз обезвоживали и заливали в эпоксидные смолы. Срезы контрастировали по Рейнолдсу и затем просматривали в электронном микроскопе TEM Jeol.

Дисперсные твердые образцы

Водную суспензию твердых частиц разводили до концентрации 0.01-0.05 %. Каплю полученной суспензий наносили на сетку, покрытую формваром, и затем

высушивали на воздухе. Полученные образцы просматривали в электронном микроскопе TEM Jeol.

2.12. Рентгенографический фазовый анализ

Для рентгенофазового анализа порошковые образцы наносились на приборное стекло и фиксировались лаком, не имеющим собственных структурных отражений.

Рентгеновские дифрактограммы получали на автоматизированном рентгеновском дифрактометре ДРОН-3, сфокусированном по Брэггу-Бретано, с графитовым монохроматором на дифрагированном пучке, управляемом с помощью компьютерной программы EXPRESS. В основе работы программы EXPRESS лежит измерение интенсивности в каждой точке углового интервала съемки и построение зависимости интенсивности от величины угла $I = f(2\theta)$. Кроме того, в программе предусмотрен текущий контроль стабильности работы аппарата, поэтому погрешность в определении интенсивности излучения составляет не более 1.5-2.5%.

Измерения проводили на Cu-K $_{\alpha}$ (длина волны излучения 0.154178 нм) или Co-K $_{\alpha}$ (длина волны излучения 0.1788965 нм) в режиме пошагового сканирования с шагом 0.1-0.05°. Время экспозиции на одну точку 3-5 с. Обработка дифрактограмм проводилась с использованием программ PHAN и PHAN% для качественного и количественного рентгенофазового анализов.

Размеры кристаллитов (блоков) D оценивались по формуле Шеррера [196]:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta},$$

где K – безразмерный коэффициент формы частиц, λ – длина волны, β – интегральная полуширина линии, равная площади пика, деленной на интенсивность в максимуме.

2.13. Адсорбционные измерения

Адсорбционные измерения проводили на автоматическом сорбтометре ASAP 2000 Micromeritics. Перед измерением все образцы вакуумировали при заданной температуре (100 °С) и давлении 10^{-3} мм рт.ст. в течение 4-6 часов. Расчет удельной поверхности по БЭТ осуществляли с помощью пакета программ фирмы Micromeritics, входящего в комплектацию прибора.

3. Результаты и обсуждения

3.1. Кристаллизация в гидрогелевых средах

Важной представляется информация о локализации отдельных кристаллов или агрегатов относительно матрицы гидрогеля. В зависимости от химической природы гидрогеля и кристаллизующегося модификатора можно ожидать формирование различных вариантов локализации. Так, наличие центров гетерогенной нуклеации в матрице гидрогеля может привести к формированию локализованных кристаллов и агрегатов твердой фазы (рис. 17в). В условиях формирования множества частиц нанометрового размера такой тип локализации может меняться на равномерное распределение модификатора по нитям матрицы носителя (рис. 17б). В случае гомогенной нуклеации и роста относительно небольших кристаллов и агрегатов твердой фазы модификатор будет локализован преимущественно в поровом пространстве гелевой матрицы (рис. 17г). При дальнейшем росте твердая фаза неизбежно будет захватывать нити матрицы носителя, и будет реализовываться какой-либо смешанный тип локализации. В литературных источниках редко удается определить, какой тип локализации твердой фазы реализуется при минерализации гидрогелей. В настоящей работе была предпринята попытка оценить влияние полимерной матрицы гидрогеля на кристаллизацию твердофазного модификатора и, в частности, определить реализующийся в том или ином случае тип локализации модификатора.

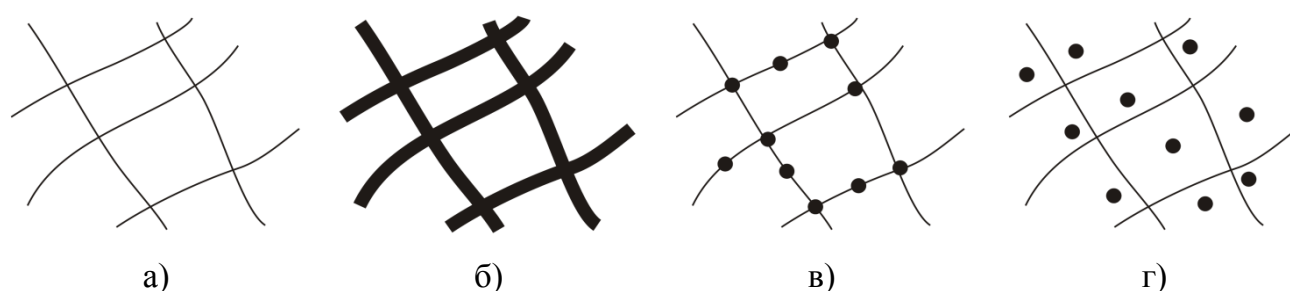


Рисунок 17. Схема различных типов локализации твердофазных модификаторов в гидрогелевой матрице. Полимерная основа матрицы (а), равномерное распределение модификатора по нитям матрицы (б), локализация твердофазного модификатора на отдельных центрах нитей матрицы (в), локализация модификатора в поровом пространстве матрицы (г).

На рисунке 18 представлена электронная микрофотография агарозного гидрогеля, модифицированного сульфатом бария. Синтез образцов проводили последовательной пропиткой гидрогелей растворами реагентов. Такой вариант синтеза в определенной степени имитирует условия формирования твердофазных модификаторов в опухолевой ткани в условиях сонодинамической терапии. Модификатор формирует достаточно крупные кристаллы твердой фазы длиной ~ 3 мкм. Нуклеация в данном случае может происходить как в поровом растворе, так и на полимерной матрице гидрогеля. В процессе роста кристаллы превосходят по размеру поры гидрогеля и захватывают нити матрицы. Таким образом, в данном случае реализуется смешанный тип локализации модификатора – мелкие частицы модификатора находятся в поровом пространстве, а более крупные связываются с матрицей гидрогеля.

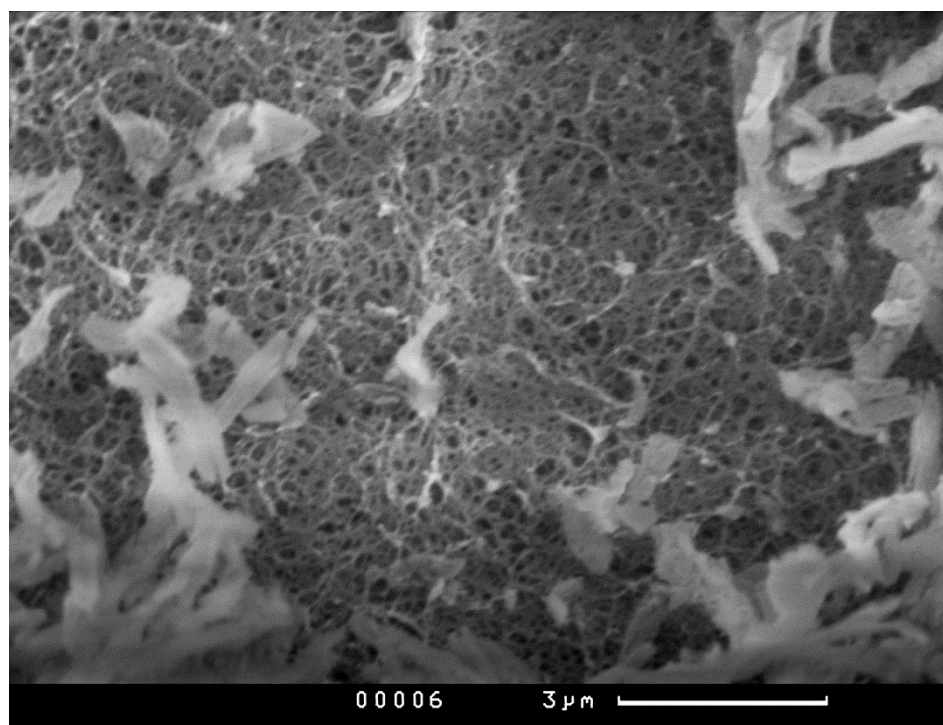


Рисунок 18. Электронные микрофотографии агарозного геля, модифицированного сульфатом бария.

Рентгеновские дифрактограммы для синтезированных в данном случае образцов представлены на рисунке 19. Структура осажденной твердой фазы соответствует структуре барита. В образцах присутствует сильное рентгеновское отражение углу 2Θ с межплоскостным расстоянием 4.676 \AA , которое относится к полиэтиленовой пленке, которой фиксировались образцы в дифрактометре.

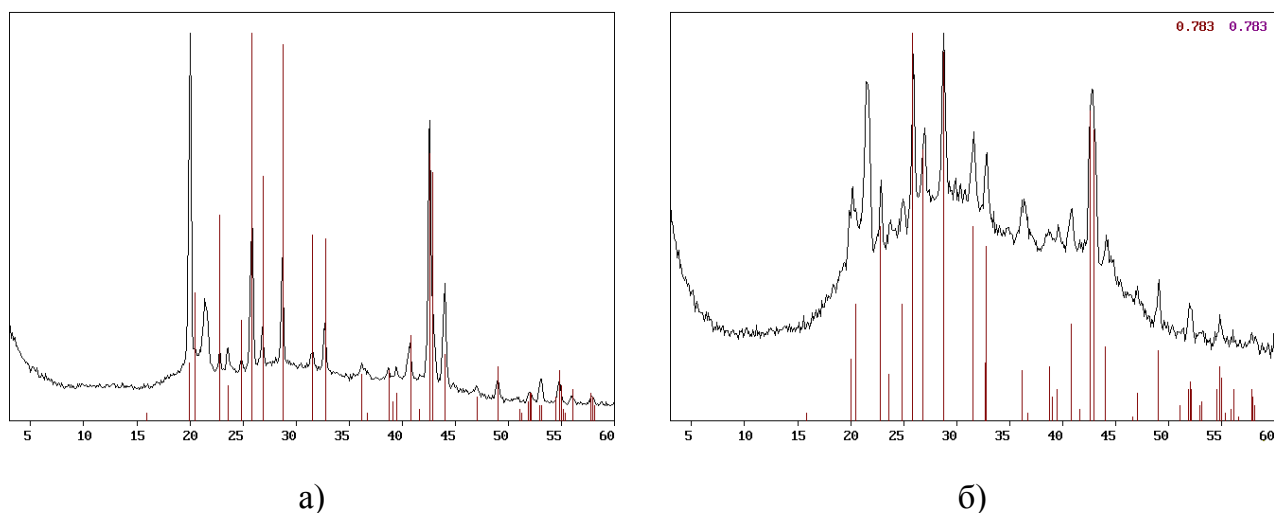


Рисунок 19. Рентгеновские дифрактограммы образцов сульфата бария, осажденного в порках агарозном (а) и полиакриламидном (б) гидрогелях.

Также были исследованы образцы различных гидрогелей, модифицированные кальциевой солью октакарбокситфалоцианина кобальта (терафтал). Терафтал – лекарственное вещество, применяемое в некоторых схемах терапии онкологических заболеваний. Его структурная формула приведена на рисунке 20. Терафтал хорошо растворим в воде. В присутствии ионов кальция или в кислой среде происходит образование нерастворимых кальциевых или кислых форм. Предполагается, что именно образование таких форм в условиях опухолевой ткани отвечает за сонодинамический эффект терафтал в условиях ультразвуковой терапии онкологических заболеваний.

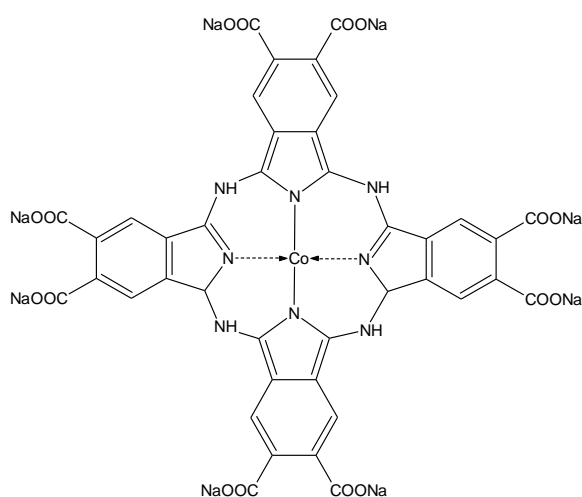
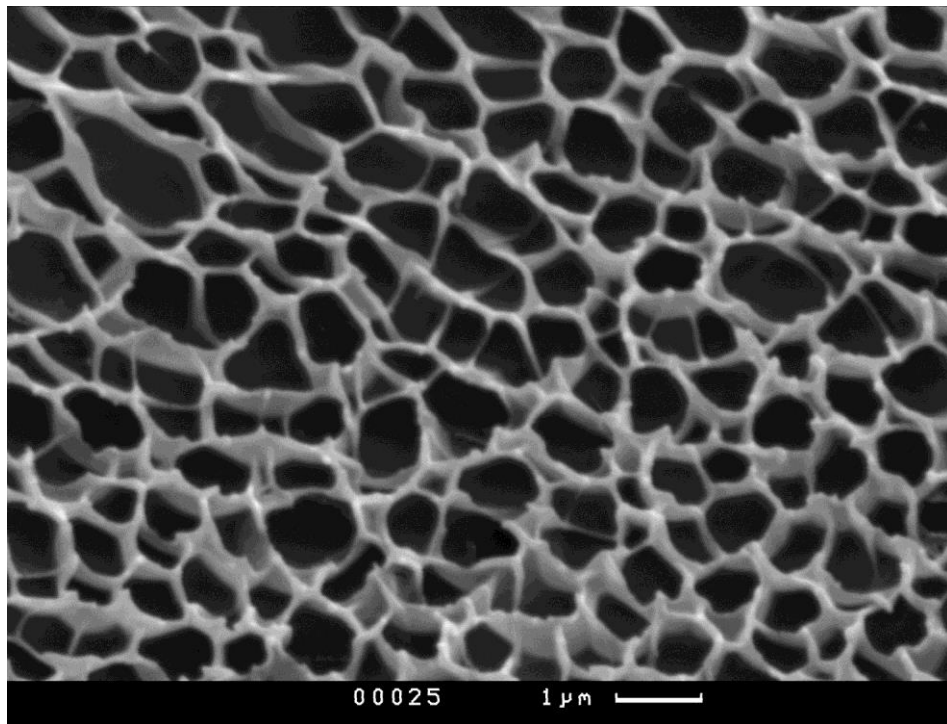
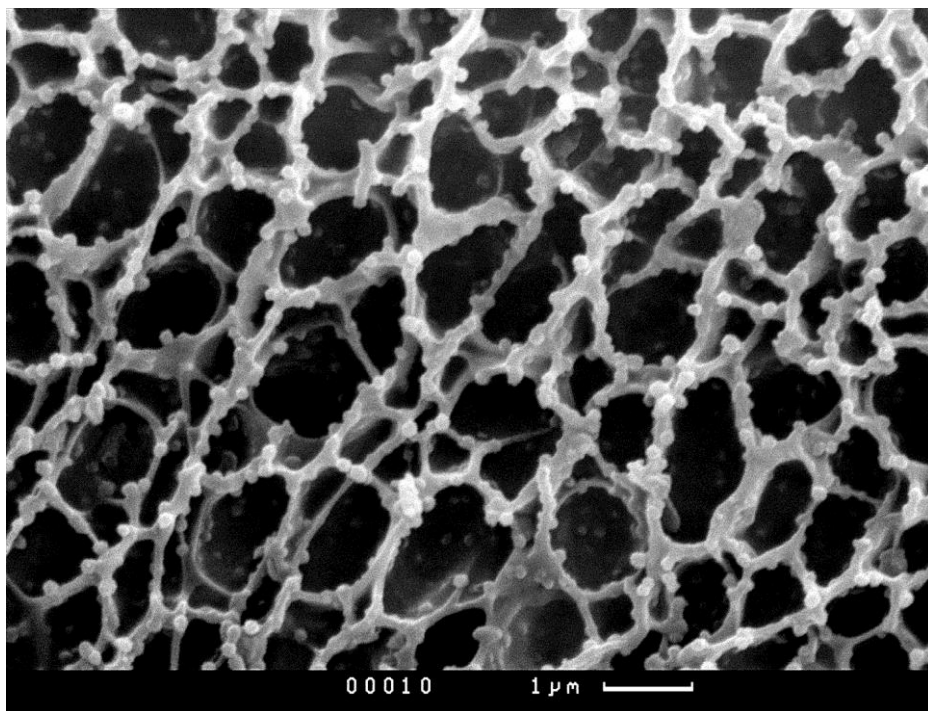


Рисунок 20. Структурная формула терафтал.

На рисунке 21 представлены данные по локализации твердой фазы кальциевой соли терафтала в матрице полиакриламидного гидрогеля. Сопоставление электронно-микроскопических изображений немодифицированного и модифицированного геля дает основание сделать заключение о локализации модификатора на отдельных центрах полимерных нитей. Основной структурный элемент кальциевой соли терафтала имеет форму, близкую к сферической, и размер примерно 100 нм. Аналогичная картина наблюдается и в случае агарозного гидрогеля (рис. 22). В этом случае, как и в описанном ранее для полиакриламида, мы можем говорить о дисперсной фазе соли терафтала, локализованной на отдельных центрах нитей матрицы-носителя. Форма частиц модификатора также близка к сферической, а их размер составляет примерно 500 нм. Такой вариант локализации в этих двух случаях может объясняться координацией гидроксильных и карбоксильных групп полимерных нитей с ионами кальция. Такая координация, вероятно, возникает на этапе нуклеации.

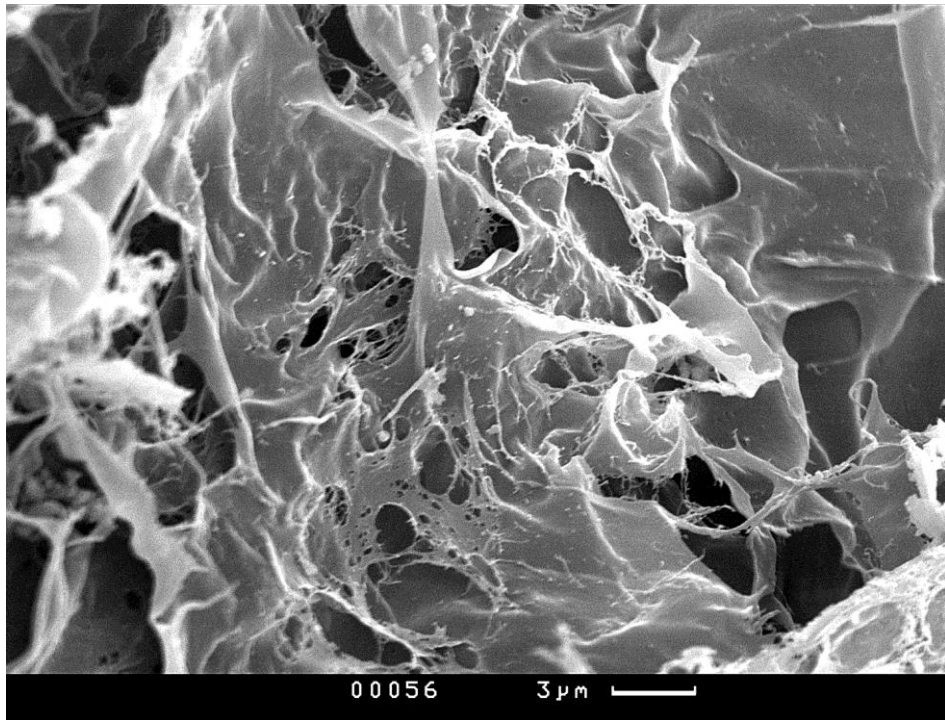


а)

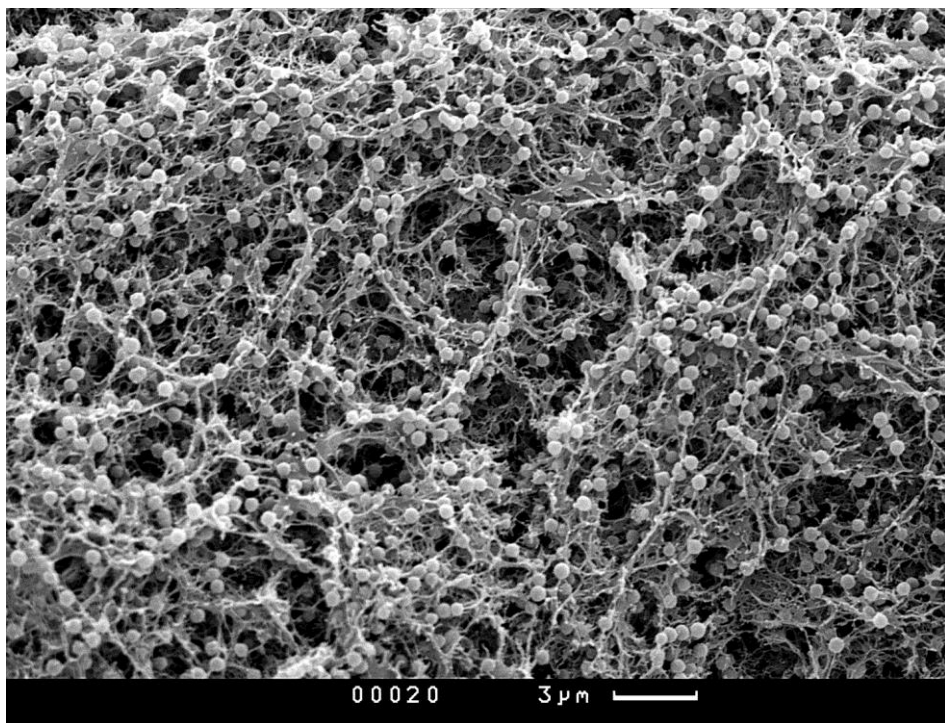


б)

Рисунок 21. Электронные микрофотографии полиакриламидного геля (а) и полиакриламидного геля, модифицированного кальциевой солью терефталата (б).



а)

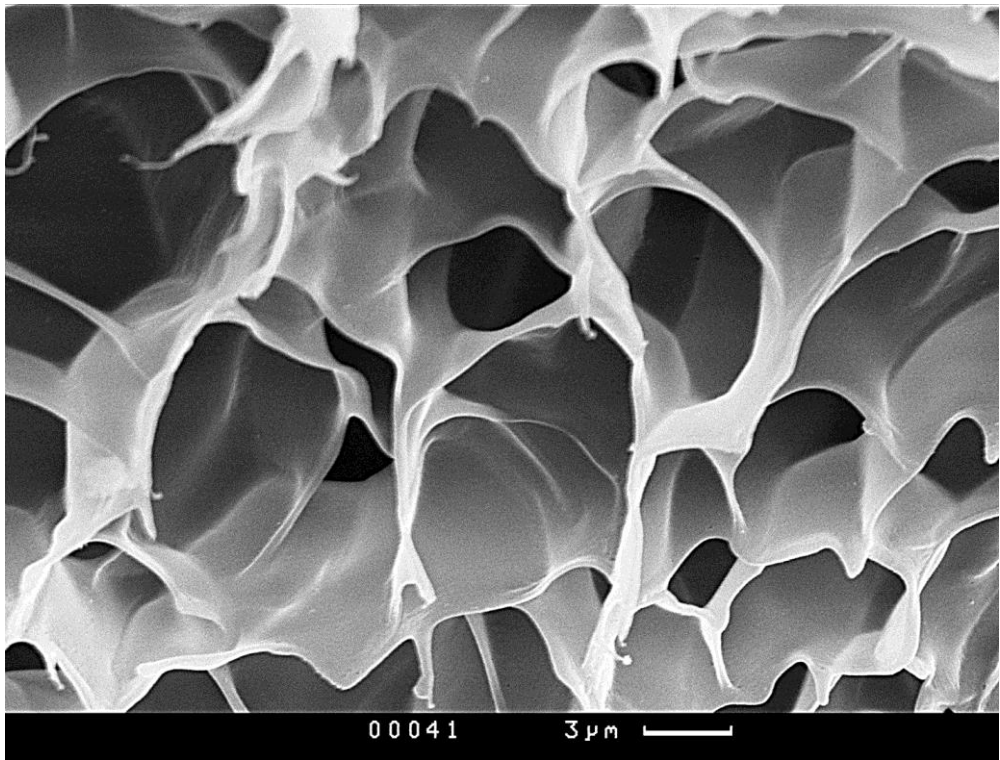


б)

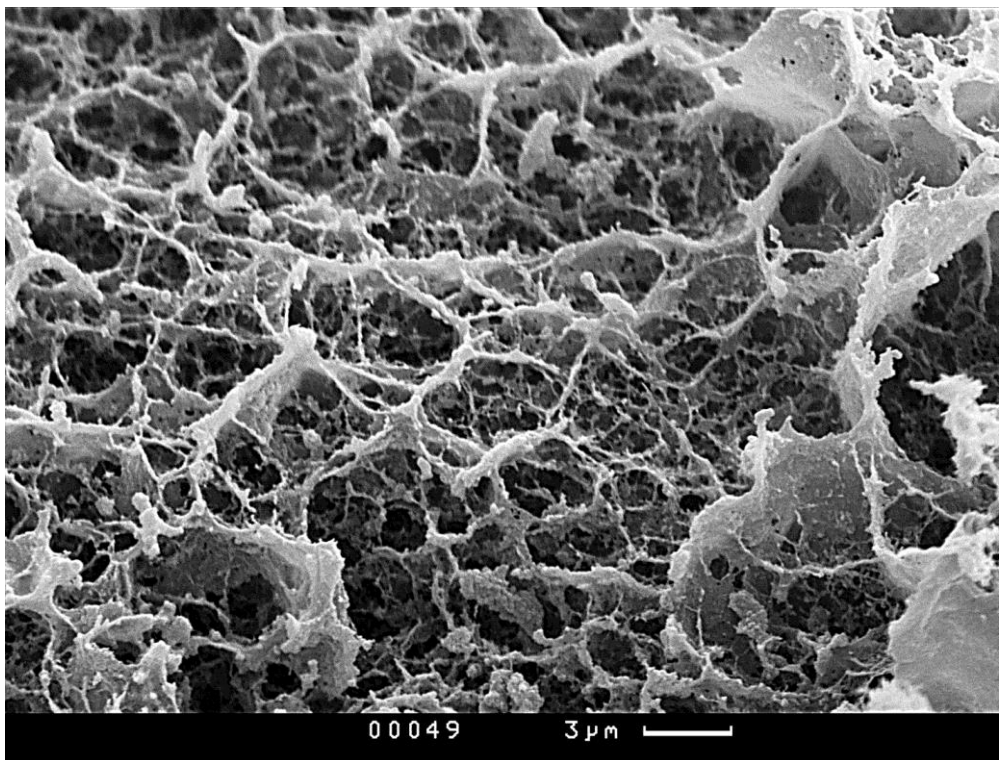
Рисунок 22. Электронные микрофотографии агарозного геля (а) и агарозного геля, модифицированного кальциевой солью тарафала (б).

Для желатины наблюдается качественно иная картина (рис. 23). На фотографиях не видны структурно различимые фазы включений. Первоначальная матрица представляется достаточно сильно искаженной. В данном случае можно говорить о варианте локализации с равномерным распределением множества наночастиц модификатора по нитям матрицы-носителя. Столь существенное отличие от гелей агарозы и полиакриламида скорее всего объясняется более сильным взаимодействием между полимерной основой гидрогеля и образующейся твердой фазой. В данном случае оно, вероятно, обусловлено дополнительным взаимодействием между белковой матрицей и комплексным анионом терефталата, а также наличием большего количества координационных центров в такой матрице. Наличие большого количества центров координации как катионов, так и анионов приводит к формированию большого количества центров нуклеации и в результате этого к формированию множества наночастиц модификатора, связанных с полимерной матрицей.

На рисунке 24 и 25 представлены микрофотографии гидрогелей полиакриламида и агарозы, модифицированных гидроксидом железа (III). В обоих случаях наблюдается равномерное распределение высокодисперсного модификатора по нитям матрицы и места преимущественной локализации твердой фазы не видны (рис. 24 и 25). Такой вариант локализации можно объяснить формированием множества наночастиц гидроксида железа. Наиболее вероятно, что связь образующихся частиц с матрицей гидрогеля обеспечивается за счет координации гидроксильных и карбоксильных групп полимерных нитей с ионами железа. Такая координация, вероятно, возникает на этапе нуклеации.



a)



б)

Рисунок 23. Электронные микрофотографии геля желатины (а) и геля желатины, модифицированного кальциевой солью терефталата (б).

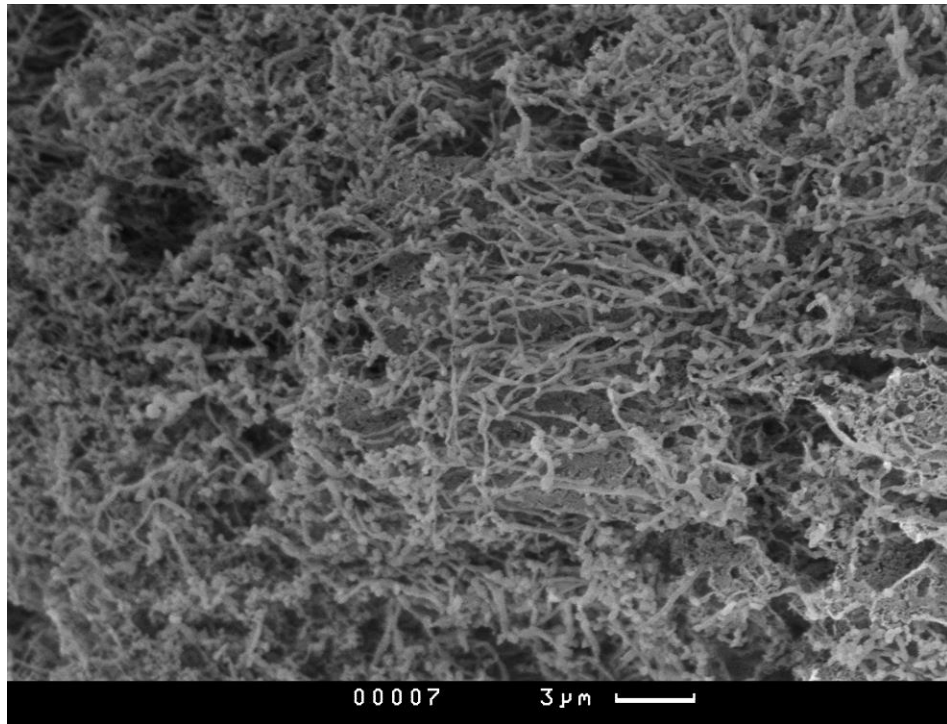


Рисунок 24. Электронные микрофотографии агарозного геля, модифицированного гидроксидом железа (III).

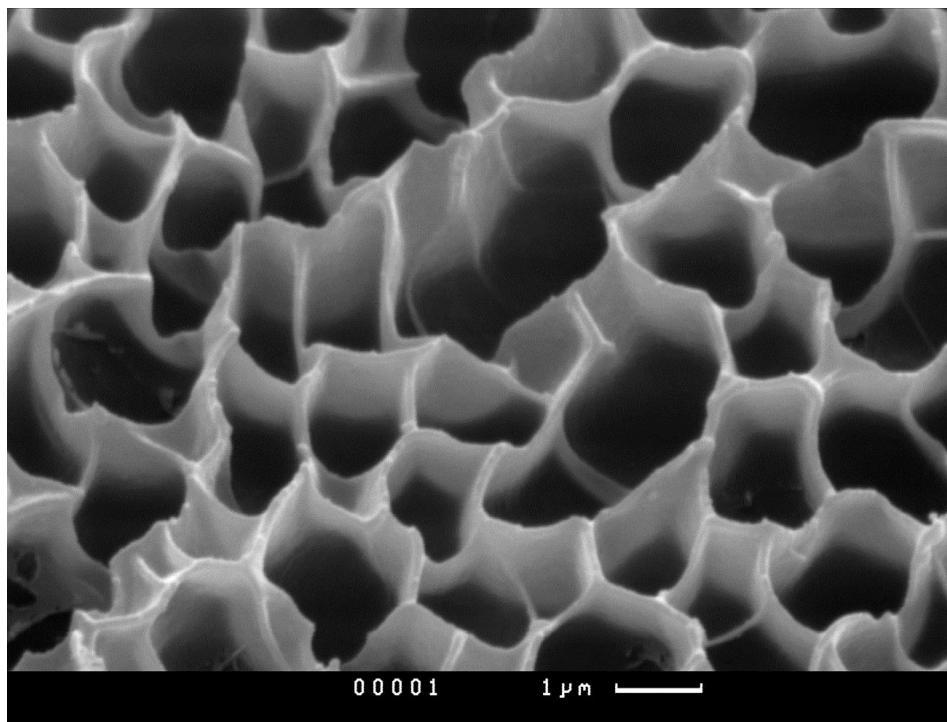


Рисунок 25. Электронные микрофотографии полиакриламидного геля, модифицированного гидроксидом железа (III).

Предположение о формировании множества мелких частиц фазы гидроксида железа косвенно подтверждается данными рентгенофазового анализа (рис. 26). Как в случае агарозного, так и в случае полиакриламидного гидрогеля осажденная неорганическая фаза рентгеноаморфна, что подтверждают отсутствие кристаллитов гидроксида железа (III) заметных размеров. Здесь, как и в случае образцов сульфата бария, присутствует пик, относящийся к пленке, фиксирующей образцы.

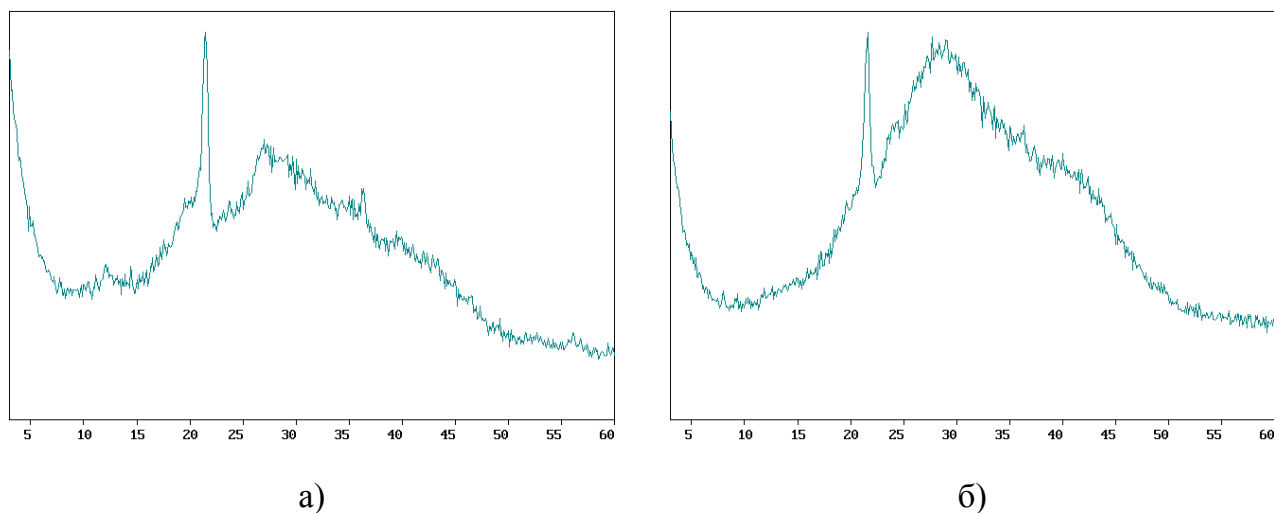


Рисунок 26. Рентгеновские дифрактограммы образцов гидроксида железа (III), осажденного в агарозном (а) и полиакриламидном (б) гидрогелях.

Полученные данные свидетельствуют о реализации различных типов локализации кристаллизующейся в гидрогелях твердой фазы (равномерное распределение модификатора по нитям матрицы, локализация твердофазного модификатора на отдельных центрах нитей матрицы, в поровом пространстве матрицы и смешанный тип), вероятность реализации каждого из них определяется природой полимерной матрицы и модификатора [197]. Наличие нескольких типов локализации модификатора позволяет предположить, что и эффекты, возникающие при ультразвуковом воздействии на такие системы, могут существенно различаться.

Дополнительно влияние полимерной матрицы на формирование осадка гидроксида железа (III) в различных гидрогелях исследовали методом мессбауэровской спектроскопии. Данный метод чувствителен к химическому окружению атомов железа, что может дать информацию о таком влиянии особенно на начальных этапах фазообразования.

В качестве полимерной матрицы были выбраны полиакриламид и желатина. Гидроксид железа (III) осаждали в гелях при взаимодействии водных растворов хлорида железа (III) и аммиака методом встречной диффузии.

Список синтезированных образцов приведен в таблице 2. Параметры спектров приведены в таблице 3. Спектры практически всех образцов (рис. 27) состоят из двух линий практически одинаковой интенсивности. Однако по параметру χ^2 (сумма квадратов отклонений экспериментального спектра от аналитического представления спектра совокупностью лоренцовских линий) лучше описываются двумя дублетами, чем одним (табл. 3). Такая модель используется для анализа спектров оксигидроксидов железа [198]. Введение третьего дублета также дает разумное по параметрам разложение спектра (табл. 3, образец 1). Дальнейшее увеличение числа дублетов ведет к схлопыванию четвертого дублета.

Таблица 2. Синтезированные образцы гидроксида железа (III)

Образец	Среда синтеза	Время от окончания синтеза до снятия спектра
1	Вода	1 сутки
2	Гель полиакриламида	1 сутки
3	Гель желатины	1 сутки
4	Гель полиакриламида	120 дней
5	Гель желатины	120 дней

Химическая формула и структура оксигидроксида железа или известного в природе ферригидрита остаются предметом обсуждения. Ему приписывают различные формулы: $\text{Fe}_5(\text{HO})_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ и др. [198] и различают по степени кристалличности от аморфного до окристаллизованного. Из последнего выделяют слабоокристаллизованный, показывающий две широкие линии рентгеновской дифракции, двухпиковый ферригидрит, и более окристаллизованный, дающий шесть линий, шестипиковый ферригидрит. Главное различие между ними заключается в размере когерентно рассеивающих доменов.

Таблица 3. Параметры мессбауэровских спектров гидроксидов железа (80 К)

Образец	Форма Fe ³⁺	δ , мм/с	Δ , мм/с	Γ_{exp} , мм/с	S, % (± 3 %)	H, кЭ	χ^2
1	1	0.442(1)	0.687(2)	0.44(1)	100		2.1
	1	0.45(1)	0.91(2)	0.37(1)	39		1.1
	2	0.45(1)	0.56(1)	0.36(1)	61		
	1	0.45(1)	0.78(3)	0.32(11)	40		1.0
	2	0.45(1)	0.50(4)	0.34(3)	46		
3	0.44(1)	1.12(8)	0.32(8)	14			
2	1	0.48(1)	0.92(4)	0.44(2)	41		1.1
	2	0.48(1)	0.57(2)	0.38(2)	59		
3	1	0.48(1)	0.85(5)	0.43(42)	55		1.1
	2	0.46(1)	0.50(8)	0.44(6)	45		
4	1	0.47(1)	0.92(1)	0.41(1)	48		1.6
	2	0.48(1)	0.58(1)	0.35(1)	52		
5	1	0.49(1)	0.93(5)	0.38(3)	37		1.0
	2	0.49(1)	0.57(3)	0.37(2)	63		

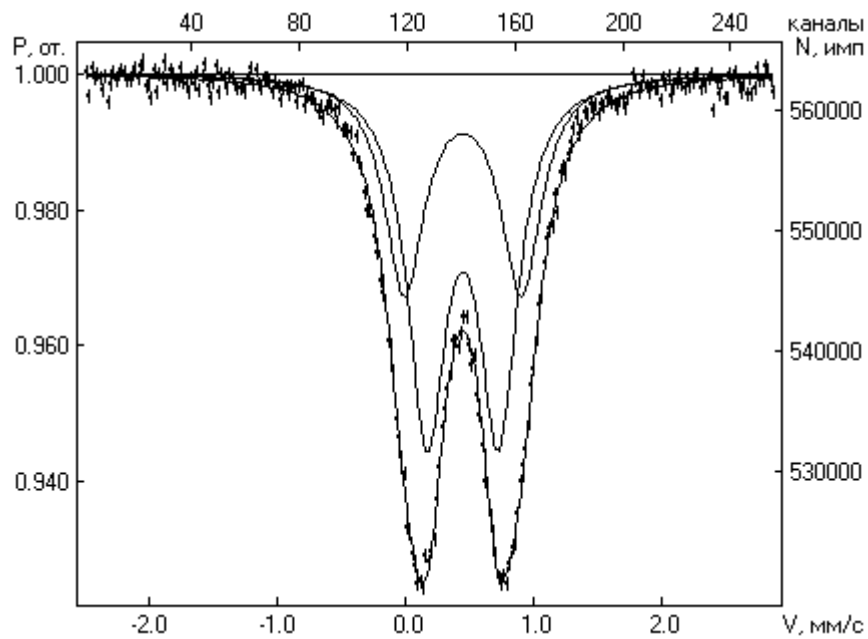


Рисунок 27. Мессбауэровский спектр гидроксида железа, осажденного из водного раствора.

По изомерному сдвигу дублетов (0.44-0.45 мм/с, табл. 3) в мессбауэровских спектрах можно определенно сказать, что ионы железа $+3$ находятся в нем в октаэдрическом окружении [199]. Кристаллическая слоистая структура ферригидрита описывается сосуществованием в ней двух фрагментов, бездефектного и дефектного [200, 201]. Бездефектный фрагмент (рис. 28а) представляет собой анионную плотнейшую упаковку с нормальным чередованием слоев анионов АВАСА..., в которой атомы железа находятся в двойном слое октаэдров. Дефектный фрагмент (рис. 28б) представляет собой слои анионов с последовательностью АВАВ... или АСАС... Железосодержащие октаэдры образуют в них монослои. Октаэдры имеют тригональное искажение, сильнее выраженное в монослоях [202].

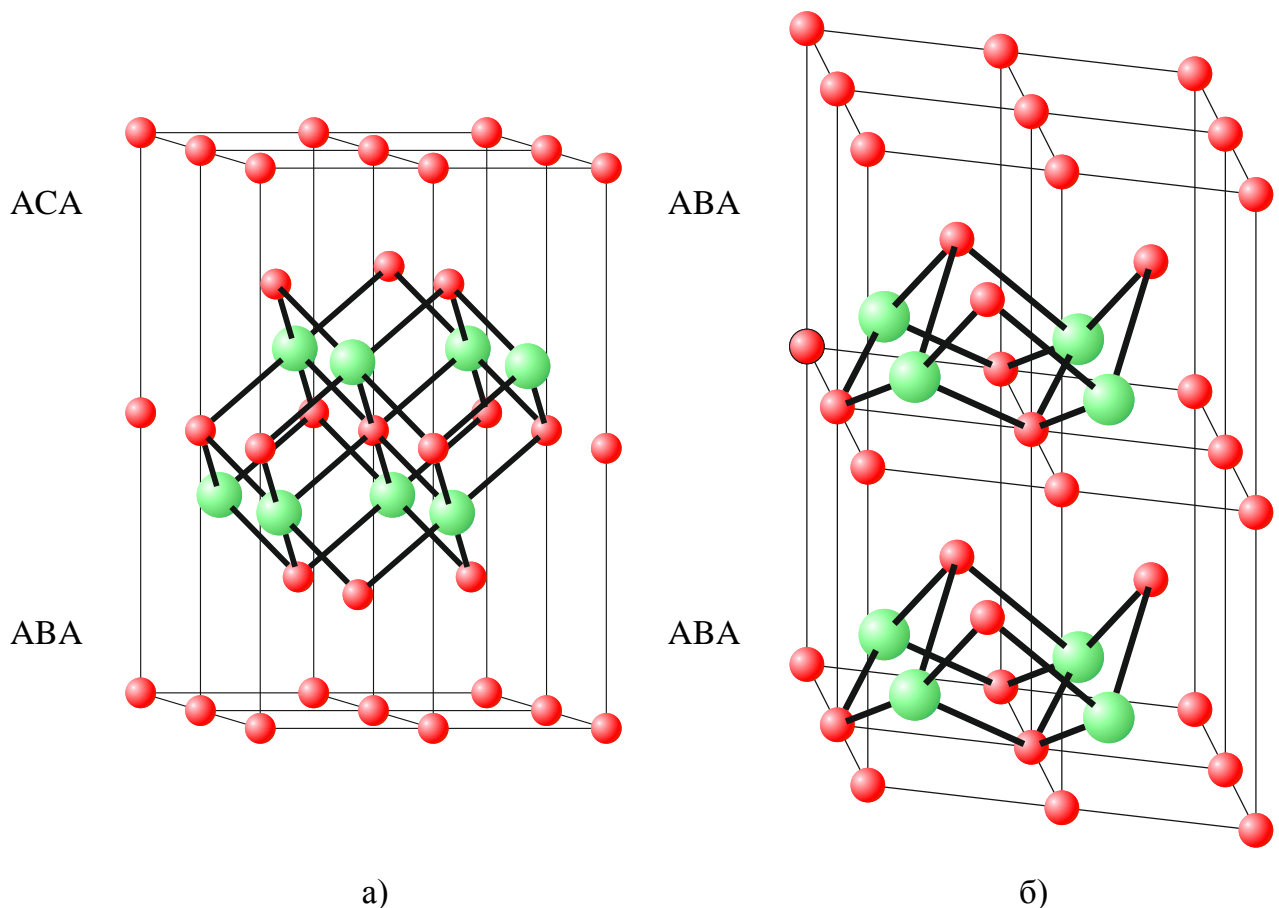


Рисунок 28. Схема бездефектной АВАСА (а) и дефектной АВАВА (б) структур ферригидрита [202].

В соответствии с таким представлением две формы железа, наблюдаемые в спектрах, относятся к дефектным и бездефектным фрагментам структуры ферригидрита. Наименьший (третий) по вкладу дублет может принадлежать к суперпарамагнитным

гетиту или гематиту, которые являются в зависимости от условий возникновения (обычно при нагревании) конечными продуктами превращения ферригидрита. Незначительный вклад этого дублета позволяет не учитывать его при дальнейших обработках спектров. Все образцы были рентгеноаморфны. Поэтому можно полагать, что образующиеся гидроксиды являются предшественниками двухлинейчатых или шестилинейчатых ферригидритов. Параметры этого гидроксида совпадают с известными данными для двухпикового ферригидрита (0.45 мм/с для δ и 0.73 мм/с для Δ в представлении спектра одним дублетом [203]), что и дает основание считать синтезированные образцы предшественниками рентгеночувствительных образцов.

Характер спектров не меняется для образцов ферригидритов, полученных в полиакриламидном геле и желатине. Однако, для геля желатина наблюдается изменение в мессбауэровских параметрах δ и Δ (табл. 3, образец 2, 3). Соотношение двух форм железа также изменяется. Из таблицы 3 видно, что для полиакриламида (образец 2) содержание формы 1 в пределах ошибки не меняется по сравнению с осадком, полученным в чистой воде (образец 1), а для желатина увеличивается (образец 3).

Эти результаты свидетельствуют, что химический состав полимерной основы гидрогеля может влиять на соотношение дефектных и бездефектных фрагментов в ферригидрите.

После выдерживания модифицированных гидроксидом железа (III) гидрогелей 4 месяца в дистиллированной воде (табл. 3, образцы 4, 5) происходит изменение спектров, связанное с переходом одной формы ферригидрита в другую.

Таким образом, при осаждении гидроксида железа (III) в реакции между хлоридом железа и гидроксидом аммония происходит образование ферригидрита в виде двух форм – дефектной и бездефектной [204]. Соотношение этих форм зависит от среды проведения реакции (вода или гидрогель). При старении образцов происходит переход одной формы ферригидрита в другую. Причем кинетика этого перехода также зависит от природы полимерной матрицы гидрогеля.

3.2. Температурные эффекты ультразвукового воздействия

Как уже было отмечено ранее, возникающие в тканях при ультразвуковом воздействии температурные эффекты являются важным фактором при ультразвуковой терапии онкологических заболеваний. В некоторых случаях нагрев сам по себе способен

обеспечить уничтожение патологического очага [123, 128, 129]. Коагуляция и некроз возникают при относительно больших температурах (50-55 °С) гипертермического воздействия в течение 1-2 минут. Увеличение температуры приводит к сокращению этого времени. Обычно такие гипертермические режимы реализуются с помощью фокусированного ультразвука высокой интенсивности. Но даже небольшое повышение температуры способно повысить терапевтическую эффективность воздействия за счет сочетания различных факторов, например увеличения проницаемости клеточных мембран по отношению к лекарственным препаратам, снижения резистентности к ультразвуковому воздействию, что существенно повышает терапевтический потенциал комбинированных методов лечения. Основной задачей при этом является локализация эффекта повышения температуры в очаге поражения.

Дополнительный нагрев опухолевой ткани при ультразвуковом воздействии при сохранении дозовой нагрузки можно обеспечить за счет введения в нее ультразвуковых ловушек, которыми могут выступать кристаллы и агрегаты твердофазных соносенсибилизаторов.

Задачей данной части работы являлось выявление на модельных гидрогелевых системах различных факторов, определяющих величину локального усиления поглощения ультразвука в гидрогелевых телах, связанного с введением в них твердофазных соносенсибилизаторов разной природы.

В качестве этих факторов были выбраны – характер взаимодействия соносенсибилизатора с полимерной матрицей, величина собственного поглощения ультразвука гидрогелем, интенсивность ультразвукового воздействия, концентрация твердофазного включения, способ иммобилизации твердофазных соносенсибилизаторов в гидрогеле. Выбор этих факторов определялся, как результатами собственных исследований (см. главу 3.1), так и литературными данными [59].

Выбор методики измерения температурных эффектов определялся удобством решения конкретной задачи. Так влияние на ультразвуковые температурные эффекты характера взаимодействия модификатора с матрицей исследовался контактным методом с использованием термопары (рис. 12б). Подобный метод используется для измерения температуры внутри тела пациента и может быть применим для глубоко залегающих опухолей. Синтез твердофазных соносенсибилизаторов в них может быть реализован введением растворимых прекурсоров в кровотоки.

Зависимость температурных эффектов от массы (концентрации) уже готовых твердофазных соносенсибилизаторов исследовалось бесконтактным методом с помощью пирометра (рис. 12а). Этот метод лишён недостатков, связанных с возникновением вязких сил между термопарой и окружающей средой в результате их перемещения друг относительно друга под действием ультразвука [205]. В то же время, определяя температуру на поверхности озвучиваемого гидрогелевого образца, он подходит для измерения зависимости температуры от массы, введённого твердофазного соносенсибилизатора. Такой подход может быть использован для определения температуры поверхностных опухолей. Для них относительно легко реализуется внутритканевое введение препарата, которое позволяет существенно повысить точность дозирования массы соносенсибилизатора в очаге поражения.

Для кальциевой соли терафталата, сравнивались два способа ее введения в агарозный гидрогель – синтез методом встречной диффузии и внесение готовых твердых частиц соли на этапе приготовления гидрогеля.

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. Вариация позиционирования гидрогеля относительно излучателя в 1-2 мм не приводила к регистрируемому изменению температурных эффектов.

Влияние взаимодействия модификатор – гидрогелевая матрица на величину ультразвуковых температурных эффектов

Возникающие при ультразвуковом воздействии температурные эффекты исследовались на модельных гидрогелевых системах. Твердофазные модификаторы синтезировали в гидрогелях последовательной пропиткой растворами реагентов. Такой метод имитирует синтез твердофазных соносенсибилизаторов в опухолевой ткани при введении растворимых прекурсоров в кровотоки.

В качестве модельных систем использовали гидрогели на основе полиакриламида (5 и 10 % по массе) и агарозы (1.5 и 3 % по массе). Модификаторами служили сульфат бария и гидроксид железа (III) (1 и 2 % по массе). Эти модификаторы обладают разной

локализацией частиц твердой фазы на полимерной матрице, что может приводить к отличиям в температурных эффектах акустического воздействия.

Между термопарой и гидрогелевым образцом в результате их перемещения друг относительно друга под действием ультразвука возникают вязкие силы [205]. Это приводит к скачку температуры в первые секунды после приложения ультразвукового воздействия. Далее наблюдается плавное повышение температуры образца. На рисунке 29 представлены типичные кривые динамики роста температуры гидрогелевых образцов, помещенных в акустическое поле, после скачка на начальном этапе нагрева. В дальнейшем сравнивались именно такие зависимости.

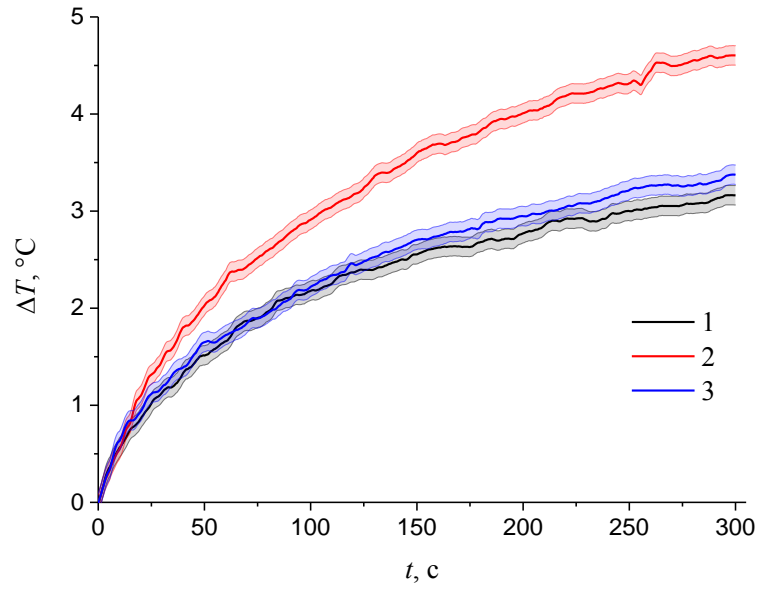
Для сравнительного анализа величин нагрева в акустических полях зависимости роста температуры от времени были аппроксимированы следующей функцией:

$$\Delta T = A[1 - \exp(-Bt)].$$

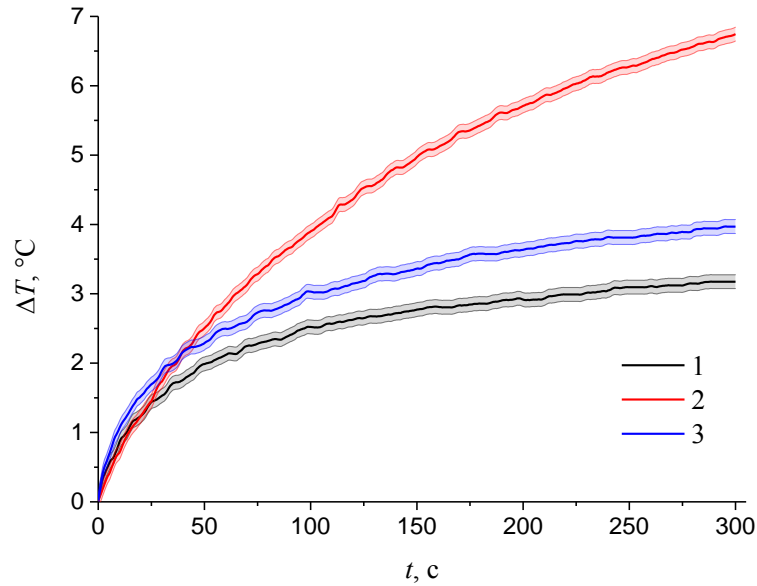
Эта зависимость может быть получена из условий теплового баланса в приближении равномерного распределения температуры по объему образца. При этом коэффициент A пропорционален поглощаемой мощности и обратно пропорционален коэффициенту теплоотдачи. Физический смысл этого параметра представляет собой максимально достижимую (стационарную) температуру в данных условиях поглощения энергии и теплоотдачи. Этот параметр играет определяющую роль в разработке методики локальной ультразвуковой термотерапии злокачественных опухолей.

Отношение стационарной температуры для модифицированного геля (A_M) отнесенное к стационарной температуре немодифицированного геля (A_0) показывает изменение поглощаемой гелем акустической мощности в результате введения модификатора $K = A_M / A_0$.

В таблице 4 приведены значения параметров стационарных температур (A). Изменения поглощаемой акустической мощности (K) для модифицированных гидрогелевых систем приведены на рисунке 30 и 31.



а)



б)

Рисунок 29. 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.

Таблица 4. Вычисленные стационарные температуры (A) в гидрогелях

Образец	Мощность излучателя, Вт	A , °C			
		Агароза		Полиакриламид	
		1.5%	3%	5%	10%
Без модификатора	3	0.7±0.1	1.3±0.1	0.5±0.1	1.6±0.1
	6	2.0±0.1	3.1±0.1	1.6±0.1	3.1±0.1
	9	3.5±0.1	5.4±0.1	2.7±0.1	5.3±0.1
BaSO ₄ 1%	3	1.8±0.1	2.5±0.1	1.6±0.1	1.9±0.1
	6	4.1±0.1	5.4±0.1	3.9±0.1	4.8±0.1
	9	6.9±0.1	9.1±0.1	7.3±0.1	7.2±0.1
BaSO ₄ 2%	3	1.9±0.1	3.4±0.1	1.8±0.1	2.3±0.1
	6	5.1±0.1	7.4±0.1	5.7±0.1	4.8±0.1
	9	8.1±0.1	12.5±0.1	9.5±0.1	8.1±0.1
FeOOH 1%	3	1.0±0.1	1.2±0.1	0.6±0.1	1.2±0.1
	6	2.2±0.1	3.2±0.1	2.6±0.1	3.0±0.1
	9	3.8±0.1	5.4±0.1	3.6±0.1	4.8±0.1
FeOOH 2%	3	1.2±0.1	1.5±0.1	0.4±0.1	1.4±0.1
	6	2.9±0.1	3.4±0.1	2.1±0.1	3.4±0.1
	9	4.9±0.1	4.7±0.1	3.2±0.1	4.2±0.1

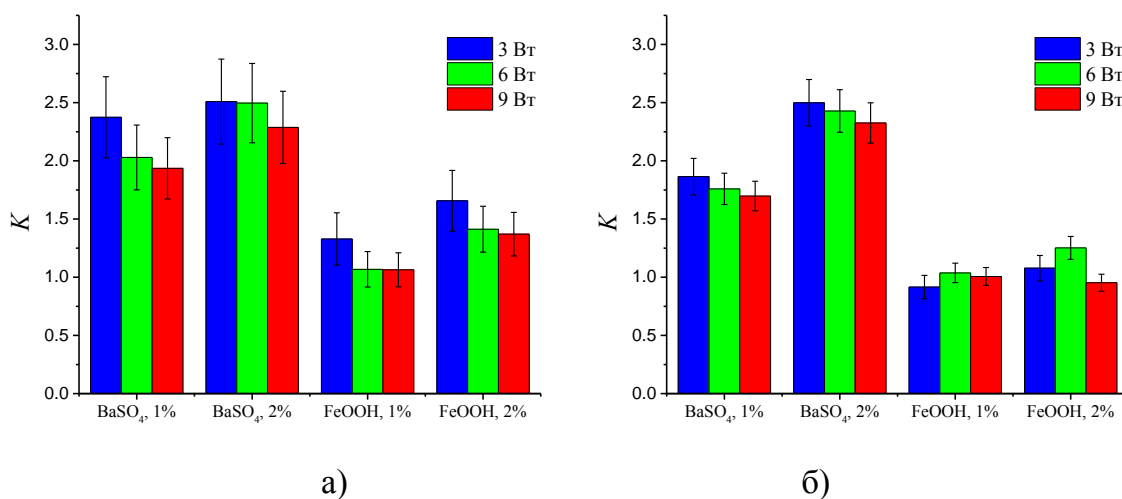


Рисунок 30. Повышение поглощаемой акустической мощности (K) в модифицированных агарозных гидрогелях: а) 1.5 % агарозы, б) 3 % агарозы.

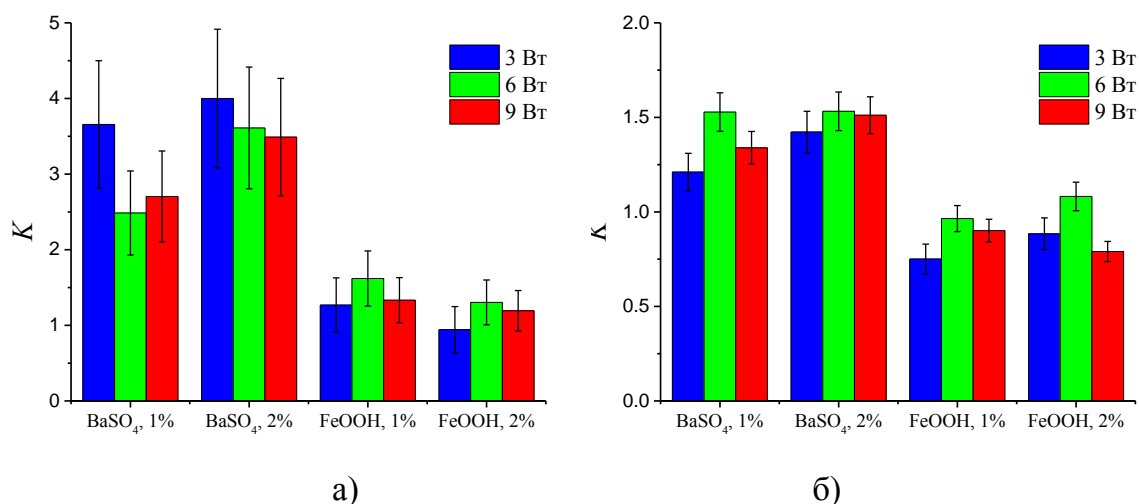


Рисунок 31. Повышение поглощаемой акустической мощности (K) в модифицированных полиакриламидных гидрогелях: а) 5 % полиакриламида, б) 10 % полиакриламида.

Из рисунков 30 и 31 видно, что температурные эффекты для образцов, модифицированных сульфатом бария и гидроксидом железа (III) существенно различаются. 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), в некоторых случаях наблюдается уменьшение поглощения ультразвука. Это может быть связано с изменением механических характеристик сетки матрицы, которая в случае этих образцов инкрустируется модификатором, что в свою очередь приводит к изменению вязкоупругих характеристик образца. Максимальное увеличение поглощаемой мощности достигается в случае 5% полиакриламидного геля, модифицированного 1% сульфата бария [197].

При увеличении концентрации полимерной основы гидрогеля происходит увеличение его собственного звукопоглощения. На этом фоне усиление температурных эффектов ультразвуковых воздействий становится несколько менее выраженным. Это особенно заметно для образцов полиакриламидного гидрогеля, модифицированного сульфатом бария (рис. 30 и 31).

Увеличение интенсивности ультразвукового воздействия приводит к возрастанию стационарных температур для всех представленных гидрогелевых систем. Это связано с увеличением вводимой в гель мощности при неизменности условий теплоотвода. Однако

значения коэффициентов K практически не меняются, что объясняется достаточно высокой стабильностью модифицированных гидрогелевых систем в выбранных условиях ультразвукового воздействия.

Таким образом, полученные данные, указывают на важную роль в проявлении акустических температурных эффектов характера взаимодействия и распределения модификатора в матрице гидрогелей, который определяется химической природой модификатора и полимерной матрицы. Причем большим эффектом обладают системы с модификаторами, локализованными на отдельных элементах объема матрицы.

Зависимость температурных эффектов от концентрации твердофазных соносенсибилизаторов

Для данных измерений использовали агарозные гидрогели (1.5 % по массе). Модификаторами служили гидроксиапатит и сульфат бария. Готовые модификаторы вносились в гидрогель на этапе студнения. Зависимости роста температуры от времени также аппроксимировались функцией $\Delta T = A[1 - \exp(-Bt)]$. На рисунке 32 представлены графики зависимости максимально достижимой (стационарной) температуры от массовой доли модификатора (гидроксиапатит и сульфат бария).

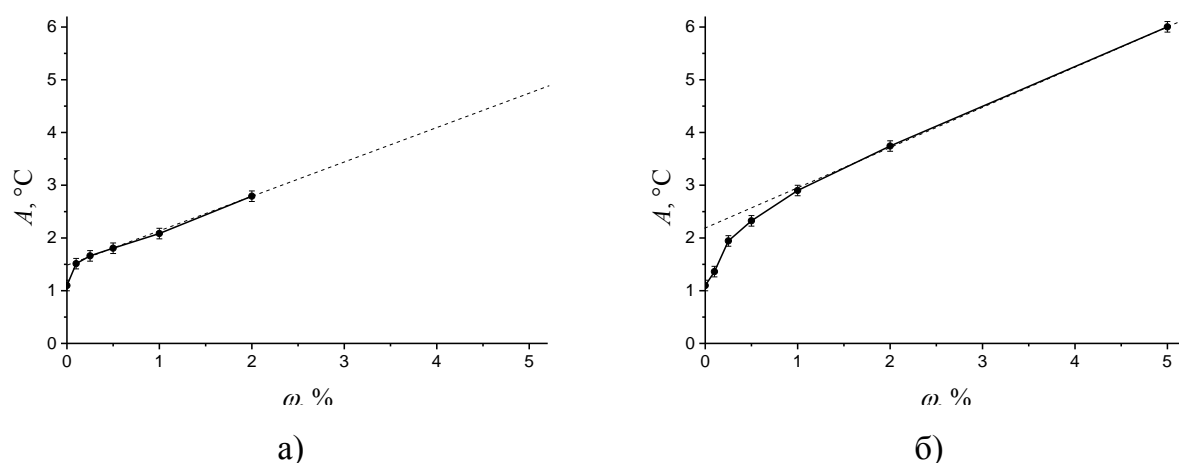


Рисунок 32. Зависимость максимально достижимой (стационарной) температуры агарозного гидрогеля от массовой доли модификатора: а) гидроксиапатит, б) сульфат бария.

Видно, что зависимость стационарной температуры от массовой доли модификатора линейна начиная с некоторого значения – 0.1 % для гидроксиапатита и 1 % для сульфата бария. Вероятно, нелинейность при более низких содержаниях модификатора связана с заполнением неких элементов полимерной матрицы гидрогеля вводимыми кристаллами. При этом происходит сильное связывание модификатора с матрицей-носителем, приводящее к увеличению звукопоглощения и, следовательно, усилению возникающих температурных эффектов. Дальнейшее увеличение содержания твердофазного модификатора приводит к заполнению в основном порового пространства гидрогеля и линейному росту температурных эффектов. Существенное отличие в содержании различных модификаторов, при котором происходит переход к линейному росту тепловыделения, по-видимому, связан с размерами кристаллов модификатора. Так, кристаллы гидроксиапатита имеют средний размер ~ 100 нм (рис. 33) и быстро заполняют все особые центры матрицы. Кристаллы сульфата бария существенно крупнее (их средний размер составляет ~ 2 мкм, рис. 34), поэтому заполнение особых центров происходит существенно медленнее [206].

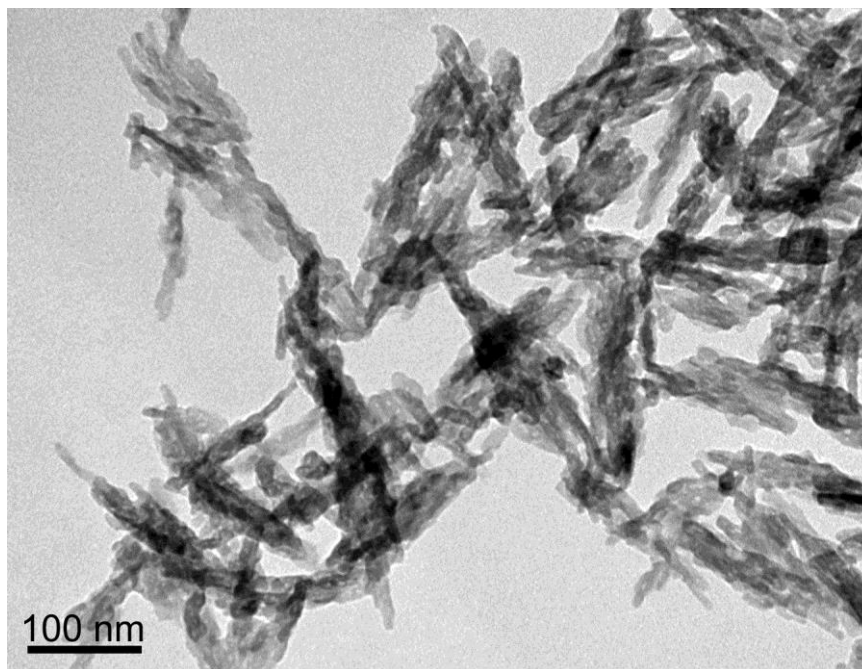


Рисунок 33. Электронная микрофотография частиц гидроксиапатита.

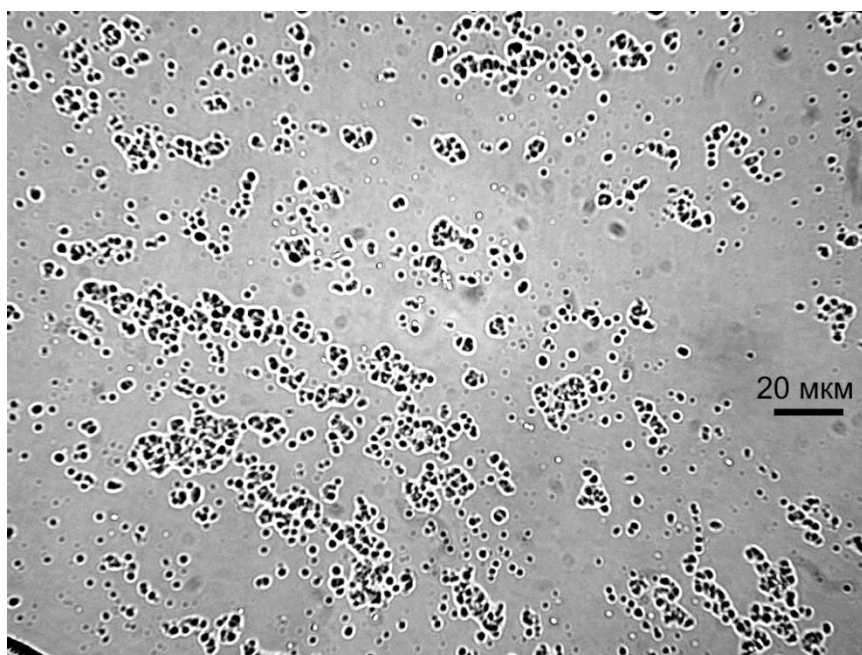


Рисунок 34. Оптическая микрофотография частиц сульфата бария.

Полученные данные демонстрируют важную роль взаимодействия модификатора с матрицей гидрогеля в возникающих температурных эффектах. Причем это влияние прослеживается даже для образцов, полученных механическим введением твердой фазы в гидрогель.

Влияние способа введения модификатора в матрицу гидрогеля на ультразвуковые температурные эффекты

На примере кальциевой соли терефталата была предпринята попытка сравнительной оценки влияния способа введения модификатора в гидрогелевую матрицу на температурные эффекты ультразвукового воздействия. Кальциевую соль терефталата вводили в агарозный гидрогель (1.5 % по массе) в концентрации 1 % по массе двумя методами – синтезом внутри геля методом встречной диффузии и внесение готовых твердых частиц на стадии изготовления гидрогеля.

На рисунке 35 представлены кривые динамики роста температуры гидрогелевых образцов, модифицированных кальциевой солью терефталата, помещенных в акустическое поле. Видно, что температурный эффект зависит от способа введения твердой фазы в гель. Так образец кальциевой соли терефталата, введенный в гель методом смешения, дает значительно меньшие изменения температуры по сравнению с методом

встречной диффузии. Изменение поглощения гелем акустической мощности составляют в этих случаях 1.3 ± 0.1 и 1.8 ± 0.2 , соответственно [206].

Как было показано (см. главу 3.1) при модифицировании образца методом встречной диффузии твёрдая фаза терафтала зарождается на нитях матрицы. При введении кальциевой соли терафтала в гель на стадии студнения характер взаимодействия твёрдой фазы иной и определяется особенностями структурной организации агарозной сетки. Это указывает на важную роль характера взаимодействия и распределения модификатора в матрице гидрогелей при воздействии на них ультразвукового поля в возникающих температурных эффектах.

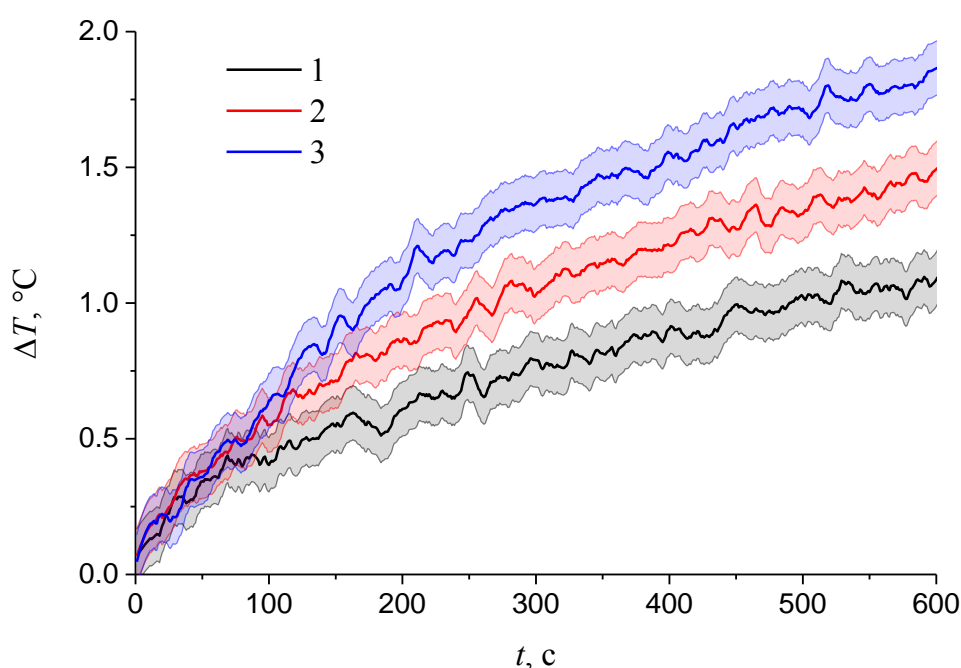


Рисунок 35. Динамика роста температуры при воздействии акустического поля на агарозный гидрогель (1.5 % по массе), модифицированный кальциевой солью терафтала (1 % по массе): 1 – немодифицированный гидрогель, 2 – гидрогель, модифицированный методом смешения ($K=1.3 \pm 0.1$), 3 – гидрогель, модифицированный методом встречной диффузии ($K=1.8 \pm 0.2$).

3.3. Кавитационные эффекты ультразвукового воздействия

Основным разрушающим фактором воздействия на опухоль в сонодинамической терапии злокачественных заболеваний обычно полагают кавитационные события, возникающие в результате ультразвукового воздействия. Кавитация является наиболее эффективным инструментом ультразвуковой деструкции. В то же время, её применение

в терапии связано с рядом трудностей, определяемых её физической природой. Это вероятностный характер возникновения, слабая воспроизводимость, плохо контролируемая локализация и форма разрушения, зависимость интенсивности от состояния (газосодержание, гетерогенность) и геометрии среды и пр. К этому следует добавить отсутствие универсальных методов регистрации интенсивности кавитации и отсутствие понятия «единица кавитации». Каждый из перечисленных в обзоре методов регистрации обладает определённым недостатком, который не позволяет ему претендовать на универсальность.

Химические методы чувствительны к составу среды и удобны в основном для калибровки. Применение сонолюминесценции ограничено прозрачностью среды. Методы, основанные на акустическом излучении кавитационной области, не имеют этих ограничений, но обладают своими особенностями. Так гармоники $(2n+1)f/2$ чувствительна к порогам неинерционной и инерционной кавитации, но их амплитуда связана с интенсивностью основной частоты сложным, неоднозначным образом. Белый шум, интенсивность которого, в определённых пределах, пропорциональна увеличению интенсивности основной частоты, мало чувствителен к величине порога кавитации.

В том случае, если интерес представляет изменение в строении участка среды в результате кавитационных событий, методы оценки интенсивности кавитации, очевидно, должны опираться на степень изменения его структуры.

Таким образом, уверенное отнесение изменения в исследуемом объекте (фантоме) 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, выявление качественных закономерностей этого процесса. При этом режимы ультразвукового воздействия соответствовали оптимальным для каждой методики и не всегда совпадали с теми, которые предполагается использовать в реальной схеме терапии. В качестве гидрогелевых образцов использовали агарозу и плуроник F127.

На основании литературных данных [91] по зарождению зародышей кавитации в трещинах массивного твёрдого тела, в качестве объектов, включаемых в гелевые образцы, были выбраны соединения отличающихся природой поверхности.

В результате, для исследования влияния наночастиц на кавитационную активность в водных средах использовали метод сонолюминесценции а в гелевых – акустические методы и методики, позволяющие оценить вклад твердофазных соносенсибилизаторов в ультразвуковую деструкцию гидрогелевой матрицы.

В качестве соединений включаемых в гидрогели использовали гидрофобную графитированную сажу, фталоцианин железа, модифицированный пальмитиновой кислотой силикагель, гидрофильные гидроксид железа (III), сульфат бария и силикагель. Эти соединения являлись модельными для данного исследования и не предполагались к использованию в медицинских целях. В качестве соединения, реально используемого в методе сонодинамической терапии в роли соносенсибилизатора, на кавитационную активность в гидрогеле проверялась кальциевая соль октакарбокситфалоцианина кобальта (терафтала).

Водные среды

Влияние ультразвукового поля и наночастиц магнетита на активность кавитации в водных средах исследовалась методом сонолюминесценции. Результаты экспериментов представлены в таблице 5.

Таблица 5. Зависимость порогового напряжения $U_{\text{пор}}$ на излучателе от концентрации наночастиц C в импульсном ультразвуковом поле при $T=100$ мс. $N=T/\tau$ – скважность импульса ультразвукового поля, T – период следования импульсов ультразвука, τ – длительность импульсов

Параметр	$U_{\text{пор}}, \text{В}$							
	0	0.03	0.1	0.3	0.5	1	3	5
C мг/мл								
$N=100$	267	230	195	170	158	142	130	126
$N=30$	180	160	153	142	140	129	121	117
$N=3$	125	120	116	98	99	87	88	95

Из приведенных данных следует, что пороговое напряжение, при котором возникает кавитация, уменьшается при увеличении концентрации частиц.

Незначительное увеличение наблюдается при $N=3$ и высоких концентрациях $C > 3$ мг/мл. Наиболее сильное снижение порога (более чем в два раза) наблюдается при большей скважности импульсов ультразвукового поля ($N=100$).

Введение наночастиц в жидкость снижает порог кавитации, очевидно, вследствие увеличения концентрации зародышей кавитации и их размеров. Происходит это по двум причинам. Во-первых, каждая из частиц может являться зародышем кавитации, поскольку на границе твердое тело–жидкость прочность жидкости уменьшается. Во-вторых, зародышами могут служить микропузырьки воздуха, адсорбированные на поверхности частиц или вносимые в жидкость вместе с их агломератами. И даже если размеры этих зародышей намного меньше резонансного, увеличение их количества, вероятно, приводит к тому, что скорость образования полостей с размерами выше порогового сильно увеличивается.

На рисунке 36 представлены результаты регистрации изменений во времени интенсивности сонолюминесценции для различных концентраций наночастиц C . При этом параметры поля выбраны такими, что в жидкости без частиц (рис. 36а) свечение возникает со значительной задержкой во времени по отношению к моменту включения ультразвука $t=0$. По мере увеличения концентрации частиц время экспозиции под действием ультразвука до возникновения сонолюминесценции уменьшается, а скорость роста интенсивности сонолюминесценции и ее предельное значение интенсивность свечения увеличивается (рис. 36б и рис. 36в).

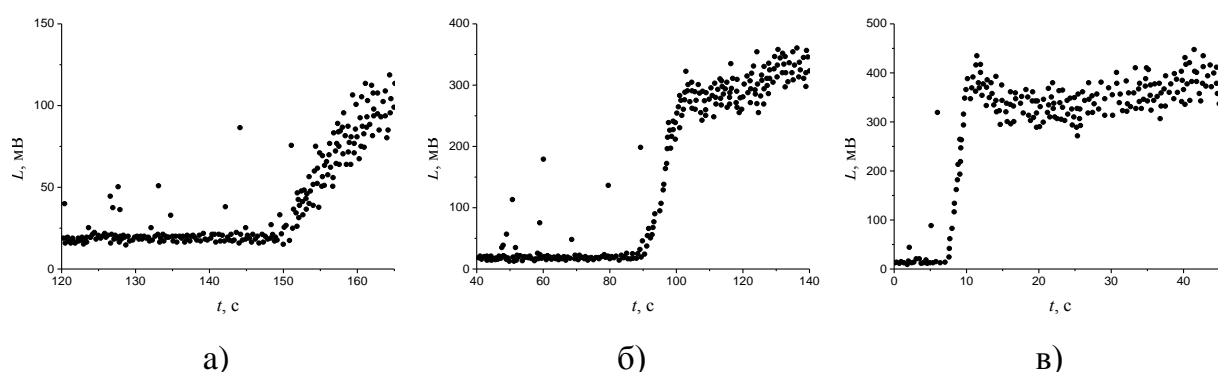


Рисунок 36. Эволюция во времени выходного сигнала фотоумножителя для различных концентраций наночастиц в дистиллированной воде. $T = 30$ мс, $\tau = 3$ мс, $U = 75$ В, $C = 0$ (а), 0.1 (б) и 0.8 мг/мл (в).

Механизм задержки свечения по отношению к началу озвучивания связан, по-видимому, с тем, что стабильные зародыши кавитации, находящиеся в среде, имеют (для данных условий озвучивания) допороговые размеры и на таких зародышах интенсивная кавитация не возникает. По мере экспозиции зародышей в звуковом поле они увеличивают свои размеры за счёт выпрямленной диффузии и коалесценции, достигая критических размеров, при которых начинается интенсивное захлопывание пузырьков. Начиная с этого момента времени число пузырьков растёт лавинообразно, что и приводит к скачкообразному увеличению интенсивности сонолюминесценции. Введение наночастиц приводит к увеличению числа зародышей и скорости их роста, в частности, за счет коалесценции, что и обеспечивает снижение времени задержки [207].

Из полученных результатов следует вывод, что в условиях импульсного модулирования ультразвукового поля в водной среде, динамикой развития кавитационной области можно управлять внесением в среду гетерогенных включений. При этом эффект пропорционален концентрации включений и проявляется тем сильнее, чем выше уровень порога кавитации, для используемых режимов ультразвукового воздействия.

Гелевые среды

Акустические методы исследования кавитации

В ультразвуковом поле наблюдаются три фазы состояния геля каждая из которых характеризуется своим набором акустических эффектов. В начальной стадии при относительно малых интенсивностях, меньших $I_0 \approx 10 \text{ Вт/см}^2$, распространение ультразвуковых волн во всех образцах имеет линейный характер. При превышении порогового значения I_0 , которое несколько различается для чистого агарозного геля и модифицированных образцов, начинают проявляться нелинейные эффекты. А именно, наблюдается появление гармоник на частотах $1/2f$ и $3/2f$, а также сплошного шума в определённых спектральных областях.

Эти явления, как правило, связывают с акустической кавитацией. Кроме того, в зависимости амплитуды прошедшего сигнала от величины амплитуды падающей волны возникает отклонение от линейного закона. Можно также наблюдать появление слабо выраженной модуляции амплитуды прошедшей и рассеянной волн. При дальнейшем увеличении интенсивности ультразвука наступает третья стадия, которая

характеризуется большой глубиной модуляции в прошедшей и рассеянной волне, появлением широкополосного шума в спектре сигналов. При этом амплитуда рассеянной волны может достигать величин, сравнимых с амплитудой прошедшей волны (до 25% от прошедшей).

На рисунках 37 и 38 изображены зависимости амплитуды гармоник в принятых сигналах в агарозном геле, модифицированном, соответственно, сажеей и фталоцианином железа, и, для сравнения – в чистой агарозе (интервал между импульсами 2 минуты).

Следует отметить, что поведение зависимостей, вплоть до численных значений, на обеих частотах ($f/2$ и $3f/2$), практически, тождественно. Видно, что в образце геля, модифицированного сажеей (рис. 37) обнаруживается существенное снижение уровня амплитуды ультразвука, при котором становятся наблюдаемыми гармоники указанных частот. Снижение можно оценить величиной $\sim 6-8$ дБ. При этом важной особенностью кривых является их «непороговый» характер. На графиках, приведенных в двойном логарифмическом масштабе, монотонный подъем амплитуды происходит по закону, близкому к степенному закону с показателем степени 2. В образцах агарозы с внедрёнными частицами фталоцианина железа наблюдался четко выраженный пороговый характер кривых, соответствующих сигналам на частотах $f/2$ и $3f/2$. Характерная величина порога заметно ниже, чем в образцах чистой агарозы – на величину $\sim 3-6$ дБ. Обращает на себя внимание довольно высокая степень регулярности зависимости, с относительно небольшими случайными отклонениями. Кроме этого было замечено, что если на одном и том же образце проводилось несколько серий измерений, то каждая следующая серия, проведённая через время, большее 1 часа, заметно изменяла характер кривой. В образце с сажеей каждая следующая серия демонстрирует тип кривой, все в большей степени имеющий пороговый характер (рис. 39). Сами пороги генерации гармоник увеличиваются в обоих образцах, стремясь к значениям, типичным для чистого агарозного геля.

В образцах агарозного геля с гидрофильными примесями – гидроксид железа и сульфат бария – снижение уровня порога появления гармоник не наблюдалось (рис. 40).

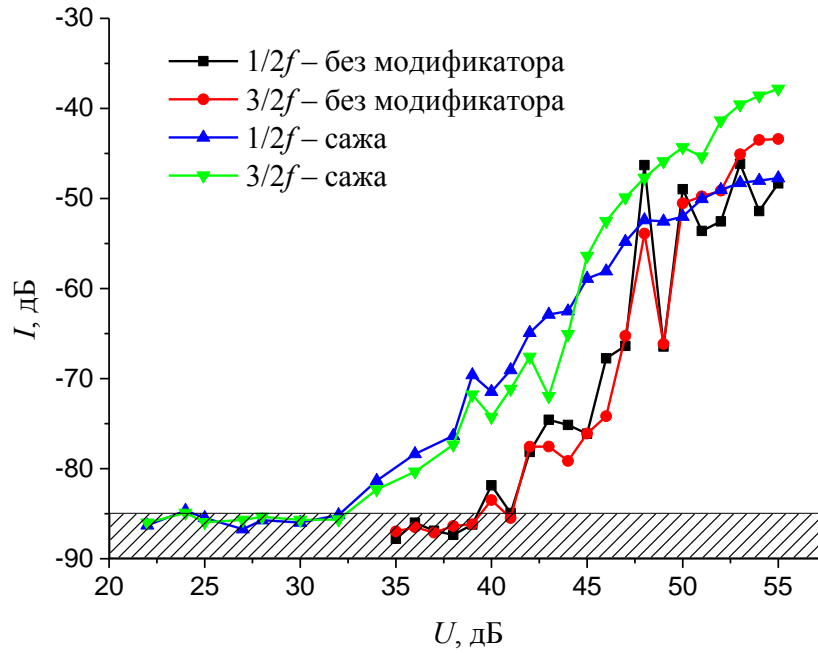


Рисунок 37. Сравнение сигналов частот $f/2$ и $3f/2$ в образцах агарозного гидрогеля и агарозного гидрогеля, модифицированного сажей. Штриховкой обозначена докавитационная зона.

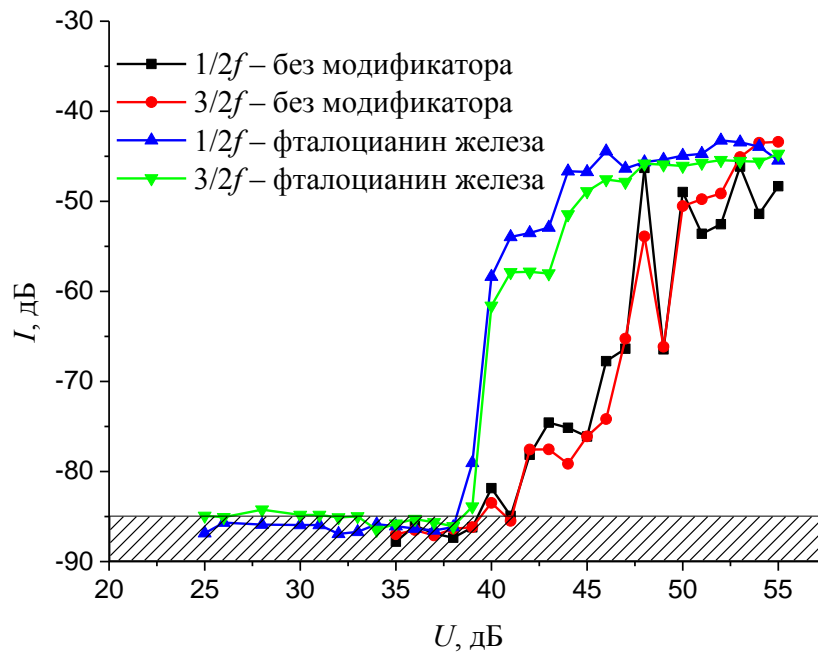


Рисунок 38. Сравнение сигналов частот $f/2$ и $3f/2$ в образцах агарозного гидрогеля и агарозного гидрогеля, модифицированного фталоцианином железа (II).

Штриховкой обозначена докавитационная зона.

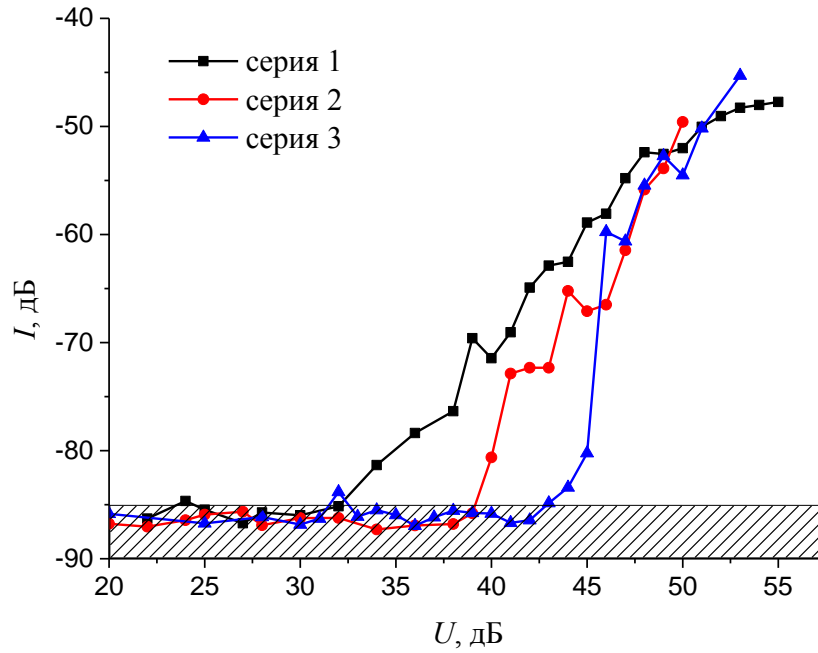


Рисунок 39. Динамика изменения зависимости сигнала на частоте $f/2$ от амплитуды действующего сигнала в образце геля, модифицированного сажой, от серии к серии.

Штриховкой обозначена докавитационная зона.

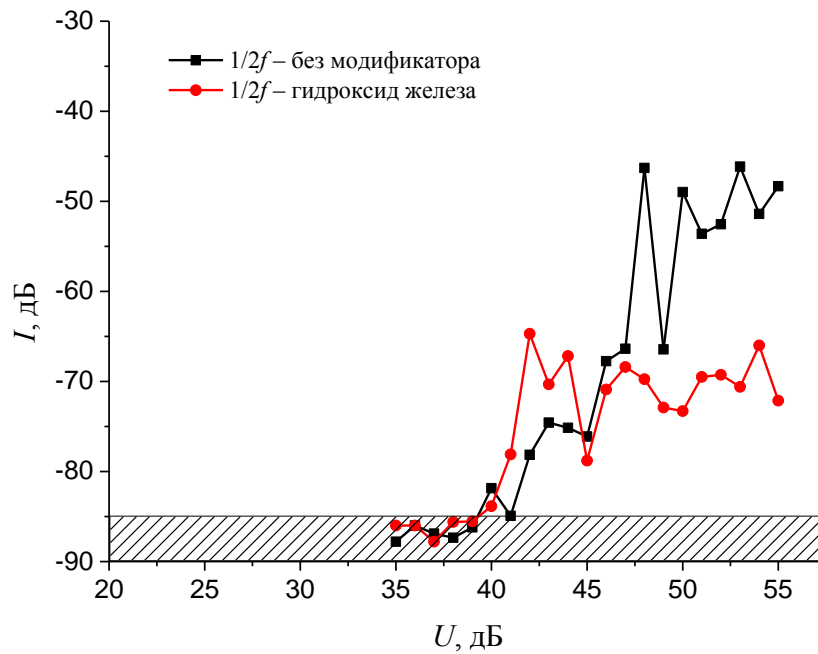


Рисунок 40. Динамика изменения зависимости сигнала на частоте $f/2$ от амплитуды действующего сигнала в образце геля, модифицированного гидроксидом железа (III).

Штриховкой обозначена докавитационная зона.

Основные результаты исследований по ультразвуковым эффектам в модифицированных агарозных гелях можно сформулировать следующим образом.

Во всех образцах геля при превышении интенсивности определённого уровня (для чистой агарозы в первой серии это $\sim 16 \text{ Вт/см}^2$) в спектре сигнала появляются составляющие на частотах $f/2$ и $3f/2$.

При введении примесей среда демонстрирует два типа поведения. В одном случае нет явно выраженного порога по интенсивности, как в случае с сажей. В чистом агарозном гидрогеле и в других гелях с модификаторами порог, как правило, явно выражен. При этом его величина в модифицированных системах с гидрофобными примесями существенно ниже (на 6-8 дБ), чем в среде без примесей или с гидрофильными примесями.

При амплитудах действующего сигнала больших 45 дБ (соответствует значению интенсивности, усреднённой по сечению фокальной области более 46 Вт/см^2), по косвенным признакам (сильное рассеяние и модуляция прошедшей волны, возникновение характерной несимметрии в спектре вблизи основной частоты) можно судить о возникающем разрушении гелевой среды. При многократных озвучиваниях в агарозном геле с примесью сажи происходит изменение типа зависимости амплитуды субгармоники. Степенная зависимость, близкая к квадратичной, преобразуется в кривую порогового типа, того же вида, как в чистой агарозе. Такую трансформацию можно объяснить «выносом» частиц сажи (или зародышевых пузырьков) из фокальной области на периферию среды и образованием локализованной области, лишенной зародышей кавитации. Это объяснение предполагает возникновение локальных течений в гелеобразных средах при соответствующих интенсивностях звука, что находится в согласии с другими признаками появившегося течения – характерной модуляцией амплитуды прошедшей волны и несимметрией (наличием доплеровски сдвинутого участка) спектра прошедшей волны. Косвенным выводом из полученных результатов может быть заключение о локализации кавитационных эффектов в месте нахождения твердофазных включений.

Анализ полученных результатов допускает наличие иного механизма генерации гармоник, не связанного с кавитацией. Альтернативным механизмом, так же имеющим строго пороговый характер, может быть комбинированный процесс, на первом этапе которого происходит параметрическая генерация сдвиговых волн высокой амплитуды

половинной частоты $f/2$. В работе [208] предположено, что сдвиговые волны большой амплитуды могут являться причиной разрушения структуры мягкой среды. Неоднородности, введенные в среду, могут изменять условия параметрической генерации сдвиговых волн. На втором этапе возможно нелинейное взаимодействие сдвиговых волн высокой амплитуды с волной накачки, приводящее в звуковом поле к генерации продольных волн комбинационных частот $f \pm f/2$.

Основной же вывод, непосредственно относящийся к проблеме твердофазной соносенсибилизации, заключается в том, что модифицирование агарозного геля нано и микрочастицами гидрофобного типа позволяет существенно снизить порог появления субгармоники, а, следовательно, и порог разрушения мягкого материала [207].

Влияние кальциевой соли терефталата на активность кавитации в агарозе

Как уже упоминалось, терефталат, образующий в опухоли нерастворимую кальциевую соль, используется в качестве соносенсибилизатора в реальных схемах сонодинамической терапии в доклинических и клинических исследованиях. При этом режимы ультразвукового воздействия существенно мягче, чем те, которые были оптимальными при исследованиях, описанных в предыдущем разделе. Поэтому при исследовании влияния нерастворимого производного терефталата использовались режимы близкие к реально используемым в медицинской практике – частота 0.88 МГц и интенсивность до 3 Вт/см². В качестве величины, характеризующей интенсивность кавитации, была выбрана величина сигнала кавитометра, пропорциональная амплитуде белого шума.

На рисунке 41 показана зависимость уровня шума от интенсивности ультразвука. Видно, что уровень сигнала, зарегистрированного при интенсивности 2 Вт/см² в модифицированном образце гидрогеля (U_1), существенно (более чем в 4 раза) превышает соответствующую величину в геле без модификатора (U_2). Поскольку обе кривые не носят явно выраженного порогового характера, типичного для возникновения и развития инерционной кавитации, можно предположить, что регистрируемые сигналы характеризуют не кавитацию в традиционном понимании, а активность изначально присутствующих в геле микроскопических газовых пузырьков, осциллирующих под действием ультразвука. Такие пузырьки, по-видимому, неизбежно присутствуют в гидрогелях, несмотря на предпринятые меры по их дегазации в процессе приготовления.

Вероятно, концентрация таких пузырьков в гелях с модификатором существенно выше за счет их стабилизации на твердотельных частицах субмикронного и микронного размера.

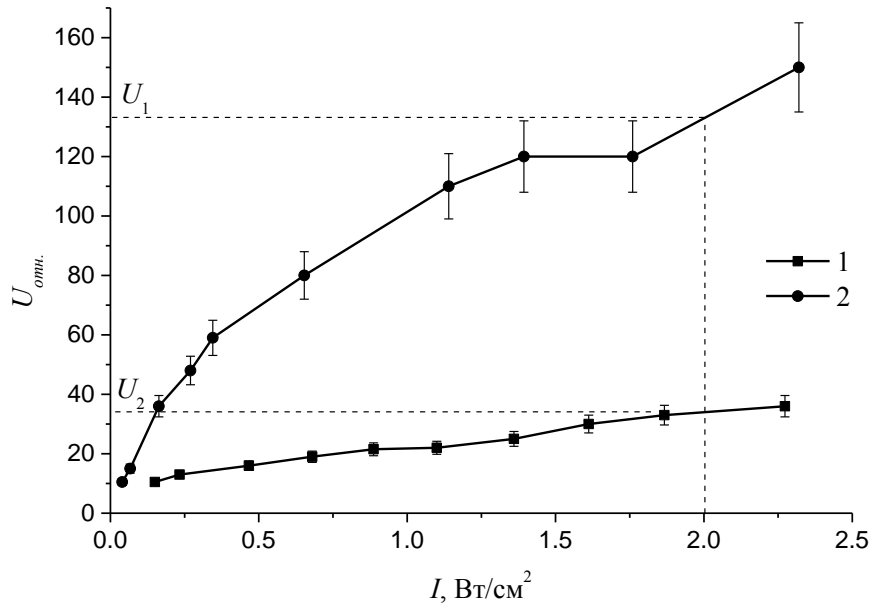


Рисунок 41. Сравнительная оценка уровня широкополосного шума, зарегистрированного в полосе частот 2-10 МГц при воздействии ультразвука с частотой 0.88 МГц на модифицированные и немодифицированные образцы агарозного геля в зависимости от интенсивности ультразвука. 1 – немодифицированный гель. 2 – гель, модифицированный кальциевой солью терефталата.

Таким образом, график на рисунке 41, если и не дает количественной информации о величине кавитационных порогов в модифицированных и немодифицированных гелях, то, по крайней мере, свидетельствует в пользу того, что условия для возникновения и развития кавитации в модифицированных гелях значительно более благоприятны. Если же исходить из часто встречающегося определения кавитации как явления, под которым понимается любая активность газовых пузырьков как созданных ультразвуком, так и существовавших в среде прежде ультразвукового воздействия, то эти результаты можно интерпретировать как данные, характеризующие в какой-то мере вероятность возникновения кавитационных явлений в гелях с включениями и без них [175].

Сонодеструкция полимерного гидрогеля

Разрушающий потенциал ультразвукового воздействия можно оценить непосредственно по сравнению степени деструкции модифицированных и не модифицированных модельных полимерных систем в ультразвуковом поле. В качестве такой модели был выбран гель плюроники F127. Его физико-химические свойства (гель при температуре выше нижней критической температуры смешения и жидкость ниже этой температуры) дают возможность при охлаждении системы ниже критической точки отделить твердофазные включения оценить изменение в молекулярно-массовом распределении полимера, произошедшее в результате ультразвукового воздействия на гель.

Степень ультразвуковой деструкции полимерных молекул оценивали по изменению их молекулярно-массового распределения. Для этого методом гелепроникающей хроматографии определяли среднечисловую M_n и средневесовую M_w молекулярные массы полимеров. Результаты определения молекулярных масс полимеров приведены в таблице 6.

Таблица 6. Влияние ультразвука на молекулярно-массовое распределение плюроники F127 (M_n – среднечисловая и M_w – средневесовая молекулярные массы). Параметры ультразвука: частота 0.88 МГц, интенсивность 1 Вт/см². Содержание плюроники в геле – 20 %. Содержание силикагеля в образце – 1 %

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

* – поверхность образца силикагеля гидрофобизована пальмитиновой кислотой

Соотношение средневесовой и среднечисловой молекулярных масс (M_w/M_n) характеризует дисперсию функции молекулярно-массового распределения – так называемую степень полидисперсности. Чем оно больше, тем больше дисперсия. Видно, что введение твердофазных сосносенсибилизаторов в гидрогель при ультразвуковом

воздействии приводит к уширению молекулярно-массового распределения. При этом уменьшение средних молекулярных масс (M_n и M_w) свидетельствует о том, что такое уширение произошло в результате появления относительно низкомолекулярной фракции (с молекулярными массами меньшими, чем в исходном образце полимера). Появление этой фракции указывает на кавитационную деструкцию молекул полимера. В то же время, молекулярно-массовое распределение немодифицированного полимера после ультразвукового воздействия практически не изменяется. Эти результаты свидетельствуют в пользу усиления влияния кавитации в гелях в присутствии твердофазных сосносенсибилизаторов [175].

Из данных таблицы 6 следует также, что разрушающее действие кавитации в геле связано со степенью гидрофобности поверхности твердофазных сосносенсибилизаторов – чем выше гидрофобность, тем в большей степени проявляются кавитационные эффекты. Эта закономерность связана, по-видимому, как со снижением поверхностного натяжения воды на границе раздела частица-среда, так и со способностью гидрофобных включений образовывать в водной среде агрегаты. Они, в силу своей внутренней структуры (система подвижных пор и криволинейных контактов, особое состояние среды внутри), в условиях ультразвукового воздействия могут являться генераторами кавитационных зародышей. Возможен также и альтернативный механизм, связанный с генерацией сдвиговых волн высокой амплитуды.

Об увеличении интенсивности кавитационных процессов в присутствии твердофазных включений свидетельствуют также данные о дисперсности модификаторов, осажденных в гидрогеле при ультразвуковом воздействии. На рисунке 42 представлены данные по синтезу кальциевой соли терафтала в матрице агарозного геля ультразвуковом поле (0.88 МГц, 1 Вт/см², 30 минут). Видно, что дисперсность осадка кальциевой соли терафтала, синтезированной в ультразвуковом поле, существенно выше, чем при его отсутствии (рис. 42б) – средний размер частиц твердой фазы уменьшился с 470 нм до 130 нм. Вероятно, увеличение дисперсности твердой фазы при синтезе в ультразвуковом поле связано с кавитацией. Возникновение кавитационных событий при достаточно низкой интенсивности ультразвукового воздействия в данном случае может быть связано с началом формирования твердой фазы, которая может облегчать формирование зародышей кавитации [175].

Таким образом, интенсивностью кавитационных процессов, а также локализацией кавитационного кластера и процессов сонодеструкции, по-видимому, можно управлять введением в систему твердофазных соносенсибилизаторов с гидрофобной поверхностью.

Дальнейшее развитие работ в этом направлении предполагает выявление закономерностей связывающих параметры, характеризующих природу гетерогенных включений, концентрацию, распределение по размерам частиц и их агрегатов с интенсивностью кавитационных процессов и самое главное, с целевым результатом акустического воздействия.

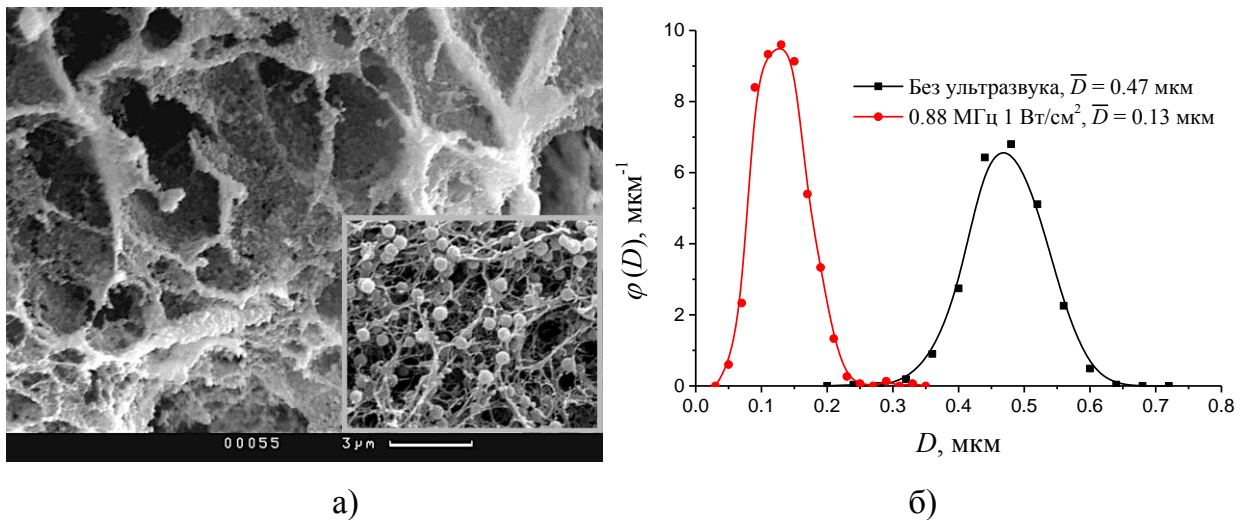


Рисунок 42. Электронная микрофотография агарозного геля, модифицированного кальциевой солью терафтала при ультразвуковом воздействии (а). На врезке справа внизу микрофотография агарозного геля, модифицированного кальциевой солью терафтала без ультразвукового воздействия. Функции распределения по диаметру частиц кальциевой соли терафтала, осажденной в агарозном гидрогеле (б).

3.4. Ферментативный синтез твердофазных соносенсибилизаторов

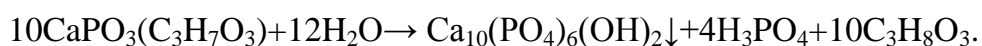
Введение соносенсибилизатора в виде растворимого прекурсора, который в условиях опухоли формирует твердую фазу не всегда может быть достаточно эффективным. Это может быть связано как с недостаточностью накопления соносенсибилизатора в опухоли, так и с формированием слишком маленьких частиц твердой фазы. Так, для некоторых вариантов терапии возникает потребность в относительно крупных частицах гидроксиапатита. Они могут использоваться, в качестве

носителей лекарственных средств при эмболизации сосудов в очаге поражения, соносенсибилизаторов 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 (использован) ферментативный метод синтеза биосовместимых соносенсибилизаторов на основе фосфатов кальция. Суть метода ферментативного фазообразования заключается в образовании нерастворимых фосфатов кальция путем ферментативного гидролиза его растворимых 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. Предполагалось, что метод должен обеспечить заданную локализацию фосфатов в гелях, определяемую локализацией иммобилизованного в ней фермента.

Анализ литературы [209-216] указывает на ряд преимуществ ферментативного метода синтеза полимерных композитов на базе гидрокситапатита, предназначенных для использования в медицине. В качестве таковых, приводятся более равномерное наполнение гидрогеля твердой фазой, меньшие размеры кристаллов и лучшие механические свойства композитов. Однако к настоящему времени, подход только начинает разрабатываться и литература по данному вопросу не охватывает всего спектра задач, связанных с этой проблемой. В связи с этим нашей задачей являлось исследование динамики процесса фазообразования как в растворе, так и в различных гелях, а также влияние физико-химических параметров гелевой матрицы на структуру, морфологию и размер образующихся осадков в аспекте применения, синтезированных таким способом фосфатов кальция, в сонодинамической терапии.

Основным процессом предлагаемого метода является ферментативный гидролиз глицерофосфата кальция с последующим выделением гидроксиапатита:



Исследование зависимости активности используемой щелочной фосфатазы от pH в интервале значений 8.6-10.5 показало, что она не имеет резко выраженного максимума (рис. 43).

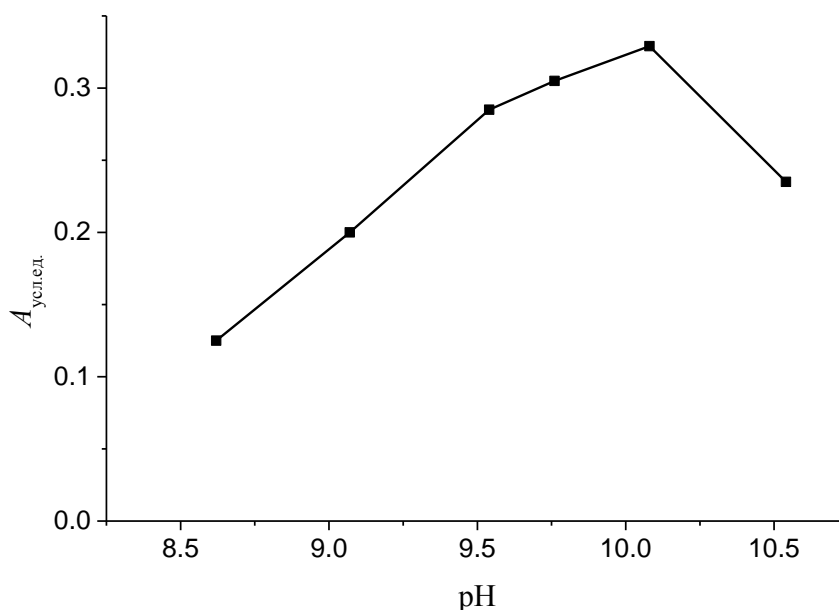


Рисунок 43. Зависимость активности щелочной фосфатазы от pH среды.

В качестве рабочих условий для синтеза были выбраны водный раствор и трис-буфер с pH=9.1. В этих условиях фермент достаточно активен и устойчив, а pH соответствует условиям образования гидроксиапатита. Рабочая концентрация глицерофосфата была близка к его растворимости и составляла $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. pH такого водного раствора составляет 8.8, что является значением близким к оптимальному для щелочной фосфатазы. Концентрация фермента выбиралась с помощью предварительных экспериментов с использованием стандартной реакции ферментативного гидролиза п-нитрофенилфосфата натрия. Выбор интервала концентраций делался с таким расчётом, чтобы реакция гидролиза не была бы слишком быстрой. Рабочие концентрации фермента находились в интервале 0.02-0.5 мкг/мл.

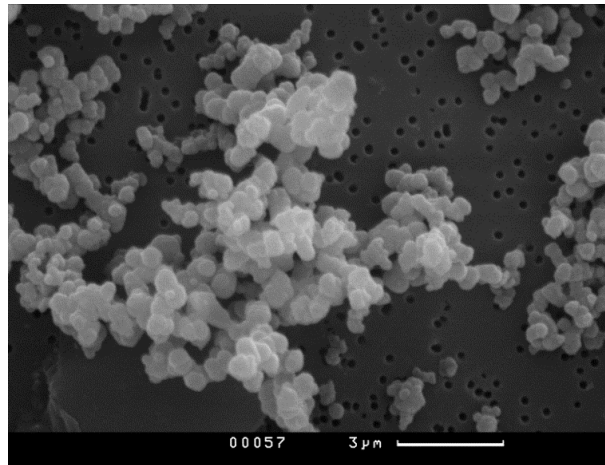
Другими важными характеристиками состояния фермента являются его устойчивость в реакционной среде и адсорбция образующейся твёрдой фазой. Предварительные эксперименты по адсорбции щелочной фосфатазы на гидроксиапатите показали, что при pH 6-7, в водных растворах за сутки адсорбция (в выбранных соотношениях навеска гидроксиапатита – концентрация фермента – объём раствора), происходит практически нацело а в буферных средах, при повышении pH, щелочная фосфатаза полностью десорбируется.

Таким образом, можно полагать, что в ходе реакции фазообразования фермент не будет связываться с выпадающей твёрдой фазой. Это предположение подтверждается сохранением общей активности раствора фосфатазы в ходе формирования осадка.

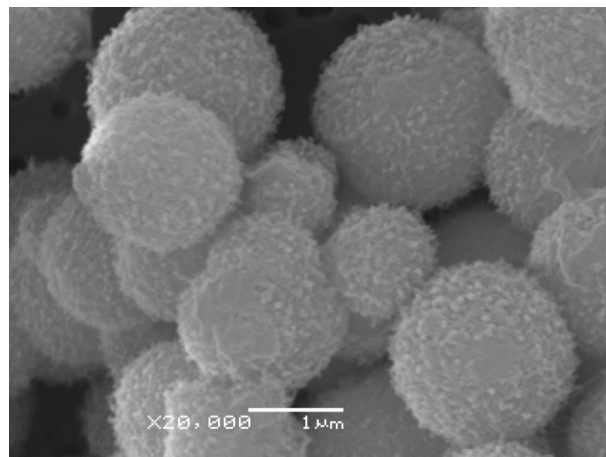
Синтез в растворе

В работе исследовалась динамика ферментативного фазообразования в различных условиях. 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 буферных системах и в водной среде [217].

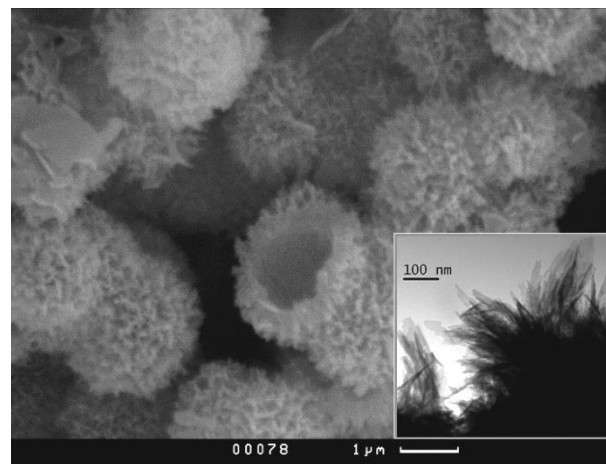
Данные сканирующей электронной микроскопии, рентгенофазового анализа и функции распределения частиц по размеру для образцов, отличающихся продолжительностью синтеза представлены на рисунках 44-46. Синтез проводили из раствора глицерофосфата кальция в трис буфере, при концентрации щелочной фосфатазы 0.5 мкг/мл. Общей для всех случаев является шарообразная форма агрегатов твёрдой фазы. На первом этапе образуются рентгеноаморфные образования шарообразной формы (рис. 44а), с гладкой поверхностью, со средним размером частиц 0.5 мкм (рис. 46). Величина их удельной поверхности близка к видимой, поры отсутствуют. Через сутки, агрегаты остаются рентгеноаморфными (рис. 45), увеличиваясь в размере до 1.5 мкм (рис. 46). Наблюдается формирование рельефа поверхности. Удельная поверхность возрастает до 25 м²/г, объём пор – 0.05 см³/г. На 7 сутки степень кристалличности твёрдой фазы заметно повышается. В данном случае можно говорить о формировании частично аморфизованной фазы гидроксиапатита Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Удельная поверхность увеличивается, достигая 270 м²/г, средний размер частиц возрастает до 2.7 мкм (рис. 46), объём пор составляет 0.6 см³/г.



а)



б)



в)

Рисунок 44. Данные сканирующей электронной микроскопии образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (рН=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.

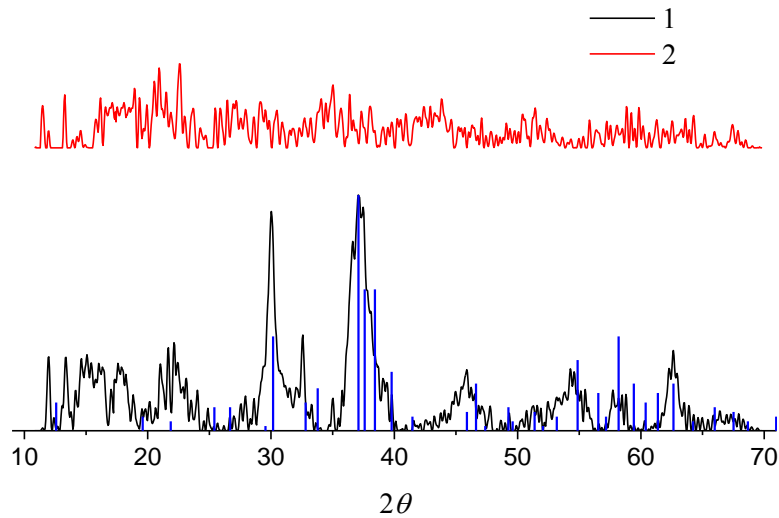


Рисунок 45. Данные рентгенофазового анализа образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (pH=9.1) при концентрации щелочной фосфатазы 0.5 мкг/мл через 1 день (1) и 7 дней (2) после начала реакции. Вертикальными штрихами нанесено положение пиков для гидроксиапатита по данным [218].

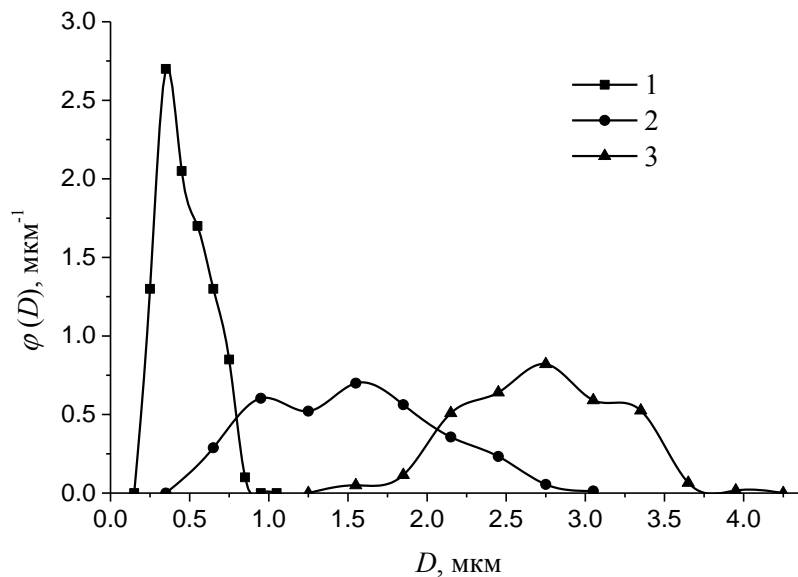


Рисунок 46. Дифференциальные функции распределения по диаметру частиц образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (pH=9.1) при концентрации щелочной фосфатазы 0.5 мкг/мл через 1 час (1), 1 день (2) и 7 дней (3) после начала реакции.

Постепенное формирование рельефа поверхности агрегатов, увеличение кристалличности, возрастание удельной поверхности и появление пористой структуры (табл. 7), может быть объяснено постепенной перекристаллизацией аморфных наночастиц фосфатов кальция в нанокристаллы гидроксиапатита, которая проходит от периферии образца к его центру так, как у поверхности агрегата реализуется максимальное пересыщение. Образование крупных полостей в частицах может быть связано с изменением плотности твердой фазы при такой перекристаллизации. Гипотетический механизм этого процесса представлен на схеме (рис. 47).

Таблица 7. Параметры частиц образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (рН=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

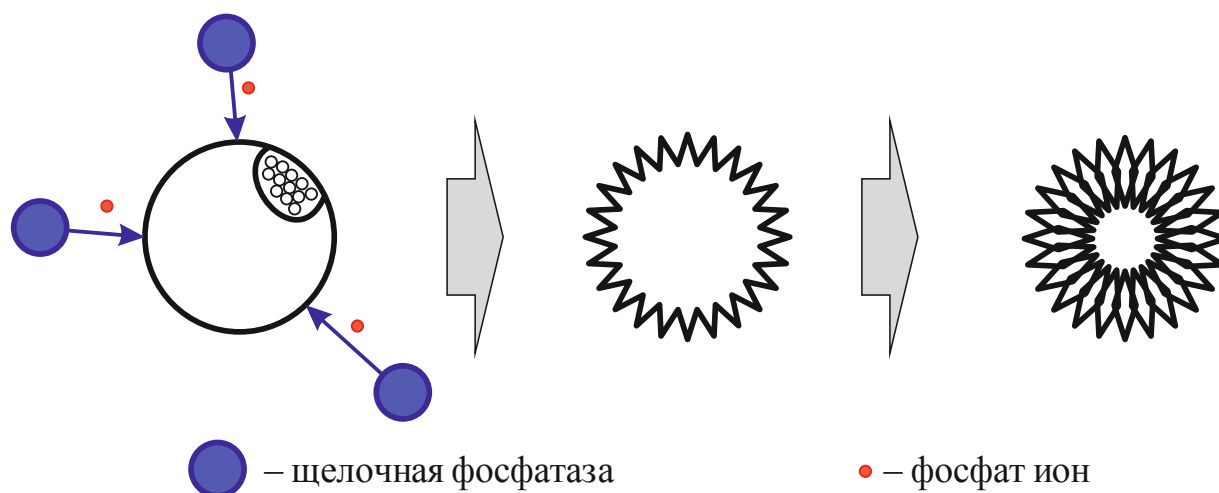


Рисунок 47. Схема формирования рельефа поверхности частиц и полостей в них при ферментативном синтезе гидроксиапатита.

Уменьшение рабочей концентрации фермента до 0.02 мкг/мл при прочих равных условиях замедляет процессы формирования рельефа, перекристаллизации и роста частиц (рис. 48).

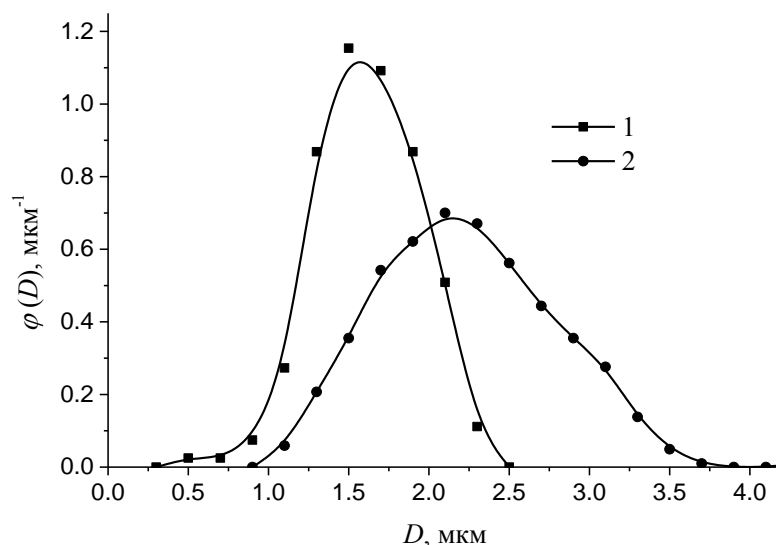


Рисунок 48. Дифференциальная функция распределения по диаметру микрочастиц образца, синтезированного в трис буфере (рН=9.1) при добавлении щелочной фосфатазы в концентрации: 1) 0.02 мкг/мл (средний размер частиц 1.6 мкм) и 2) 0.1 мкг/мл (средний размер частиц 2.2 мкм). 7 дней после начала реакции.

Замена буфера на водный раствор глицерофосфата, имеющего рН 8.8 не приводит к принципиальным изменениям в характере формирования твёрдой фазы (рис. 49). Удельная поверхность оказалась равной 300 м²/г и наблюдалось широкое распределение пор по размерам (2-300 нм, рис. 50). В этом случае реакция тормозилась, падением активности щелочной фосфатазы, вызванным падением рН, связанным с образованием гидроксиапатита.

Размеры кристаллитов, в образцах, имеющих кристаллическую структуру, оценивались по формуле Шеррера по линии соответствующей 26° (Cu-Kα). Их размер составил 12-14 нм для всех образцов, независимо от условий получения.

Таким образом, с помощью ферментативного гидролиза глицерофосфата кальция, при определенных условиях можно получить гидроксиапатит, отличающийся по своим свойствам, от получаемых другими методами. Отличительной особенностью такого гидроксиапатита является его сферическая форма, высокая удельная поверхность при относительно крупных размерах (рис. 45 и 48) и порозность. Сферы гидроксиапатита в

некоторых случаях являются полыми. Нанометровый размер кристаллитов 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.

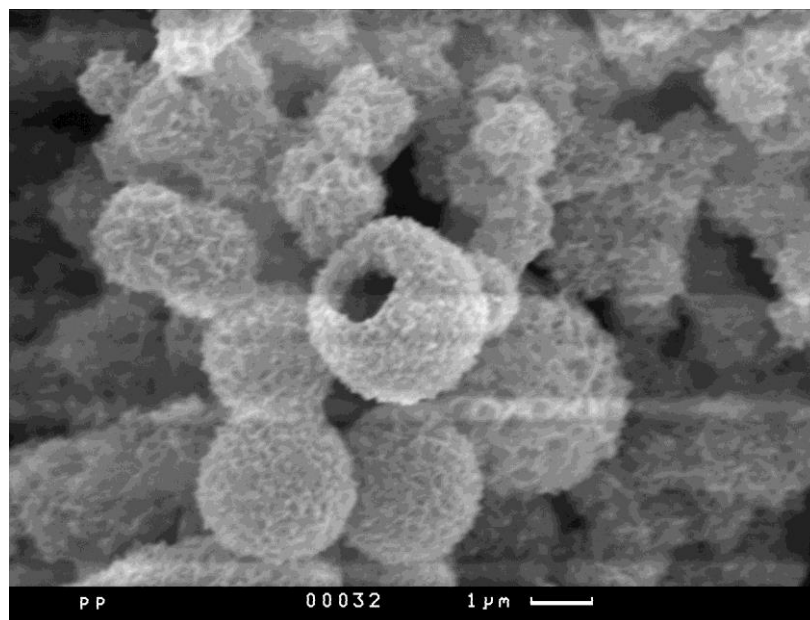


Рисунок 49. Данные сканирующей электронной микроскопии образца, синтезированного из водного раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) при концентрации щелочной фосфатазы 0.1 мкг/мл.

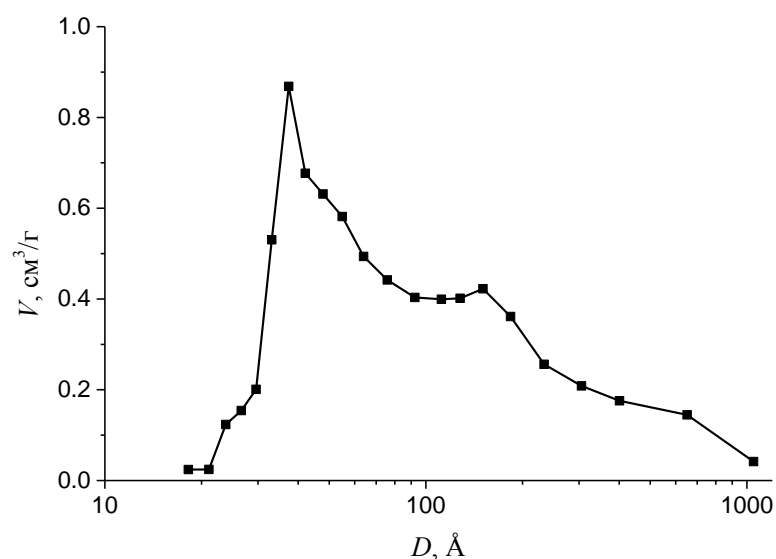


Рисунок 50. Распределение по размерам пор в образце гидроксиапатита, синтезированного из раствора глицерофосфата кальция при концентрации фермента 0.1 мкг/мл.

Ферментативный синтез фосфатов в гидрогелях

Для синтеза гидрогелевых композитов ферментативным методом 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, близкий к биоминерализации может имитировать минерализацию патологического очага. В данном процессе использовали гель агарозы (1.5 % по массе) и полиакриламида (20 % по массе) [219].

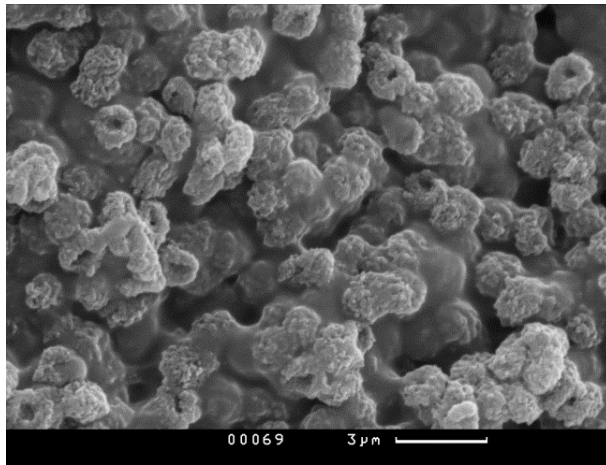
Следует отметить, что часть осадка образовалась в растворе. Возможной причиной может быть выход различных компонентов из объема геля. Наиболее вероятно такими компонентами являются щелочная фосфатаза или фосфат-ионы, избыток которых образуется в ходе реакции гидролиза. Было показано, что в случае геля полиакриламида выход фосфатазы за время синтеза твердой фазы составляет 10%, а в для гидрогеля агарозы – 90%. Это может быть связано с большим размером пор в геле агарозы. Таким образом, процесс формирования фосфатов кальция в растворе может быть связан с выходом обоих вышеуказанных компонентов, причем степень значимости каждого из них зависит от химической природы геля.

Было показано, что локализация образующейся твердой фазы зависит от природы геля и концентрации щелочной фосфатазы в нем. Так, в случае гидрогеля полиакриламида с концентрацией фосфатазы 5 мкг/мл образование осадка произошло только на периферии. Снижение концентрации фосфатазы до 0.5 мкг/мл приводит к более равномерному распределению твердой фазы внутри геля, хотя и в данном случае основная часть осадка локализована на периферии образца. Наиболее равномерное заполнение наблюдается для агарозного гидрогеля. Локализация осадка определяется двумя факторами – диффузией субстрата и кинетикой его гидролиза в присутствии щелочной фосфатазы. В случае плотного полиакриламидного геля с высоким содержанием фермента субстрат не успевает проникнуть в центральную зону образца, что приводит к формированию узкой зоны минерализации на периферии. Уменьшение концентрации фосфатазы и снижение диффузионных осложнений дают возможность реализовать более равномерное заполнение осадком, что мы можем наблюдать в случае агарозного гидрогеля.

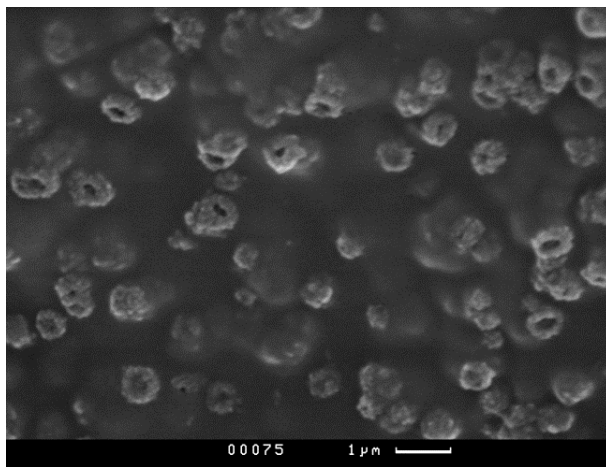
На рисунке 51 приведены микрофотографии фосфата кальция, полученного гидролизом раствора глицерофосфата кальция в трис буфере (pH=9.1) внутри гидрогелей полиакриламида и агарозы. Форма частиц во всех случаях близка к сферической. Однако в случае полиакриламидного гидрогеля частицы сильно деформированы. Это может быть связано с высокой плотностью геля, что мешает свободному росту частиц осадка. Во всех случаях наблюдается ярко выраженный рельеф поверхности, что может свидетельствовать о кристалличности образцов. Как и в случае фосфатов кальция, синтезированных из растворов, можно найти частицы с крупными полостями, что может указывать на начало перекристаллизации аморфных фосфатов кальция в нанокристаллический гидроксиапатит. Эти предположения подтверждаются данными рентгенофазового анализа (рис. 52).

На рисунке 53 представлена дифференциальная функция распределения по диаметру частиц образца, синтезированного из раствора глицерофосфата кальция в объеме гидрогеля агарозы. Средний размер частиц составляет 1 мкм. Видно, что полученные частицы существенно меньше, чем синтезированные в растворе. Кроме того, функция распределения частиц, полученных внутри агарозного гидрогеля, очень узкая. Это может объясняться ограничением, которое накладывает на рост частиц поровое пространство.

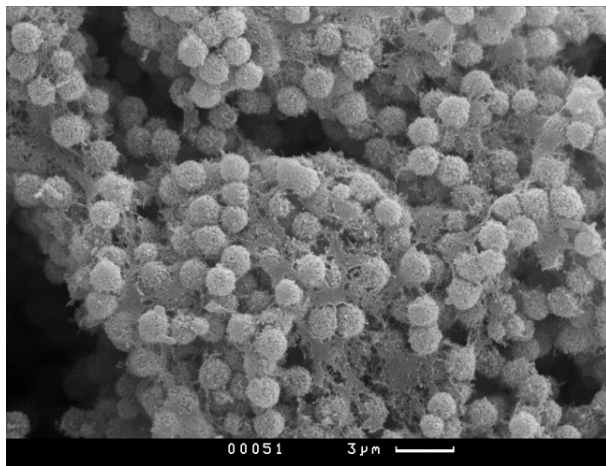
Формирование достаточно крупных, взаимодействующих с полимерной матрицей, агрегатов гидроксиапатита при ферментативной минерализации гелей дает основание предполагать, что тепловой эффект ультразвукового воздействия на такие минерализованные системы будет значительным. Для проверки этого предположения была проведена ферментативная минерализация двух образцов агарозного гидрогеля с содержанием щелочной фосфатазы в них 0.5 и 1 мкг/мл. Измерения тепловых эффектов проводили бесконтактным методом. Параметры ультразвукового воздействия: частота 2.64 МГц, интенсивность 1 Вт/см². Графики динамики изменения температуры образцов, помещенных в акустическое поле, приведены на рисунке 54. Видно, что ферментативная минерализация приводит к существенному усилению тепловых эффектов. Так, в случае концентрации щелочной 0.5 мкг/мл коэффициент усиления составляет 2.3 ± 0.2 , а при концентрации 1 мкг/мл – 2.9 ± 0.3 .



а)



б)



в)

Рисунок 51. Данные сканирующей электронной микроскопии образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (рН=9.1) в объеме гидрогелей полиакриламида (а) и (б) и агарозы (в). Концентрация щелочной фосфатазы в гелях составляла 5 мкг/мл (а) и 0.5 мкг/мл (б) и (в).

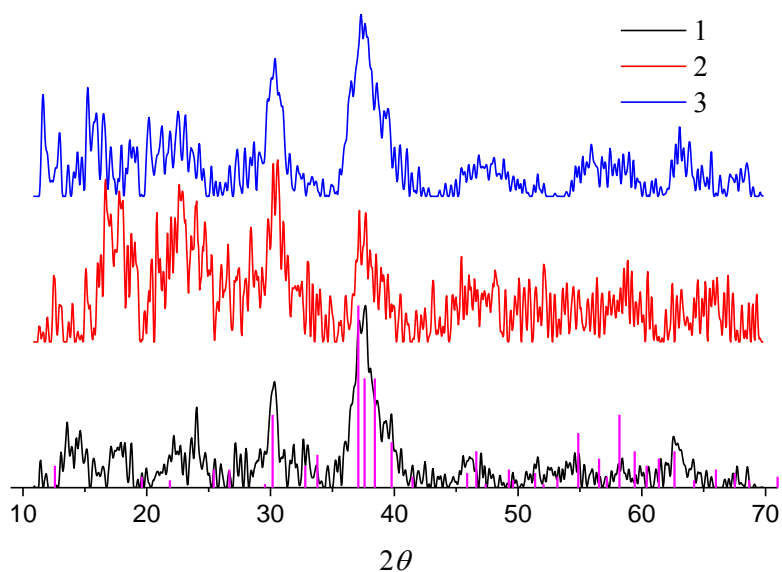


Рисунок 52. Данные рентгенофазового анализа образцов, синтезированных из раствора глицерофосфата кальция (0,02 моль/л) в трис буфере (рН=9.1) в объеме гидрогелей полиакриламида (1), (2) и агарозы (3). Концентрация щелочной фосфатазы в гелях составляла 5 мкг/мл (1) и 0.5 мкг/мл (2), (3). Вертикальными штрихами нанесено положение пиков для гидроксиапатита по данным [218].

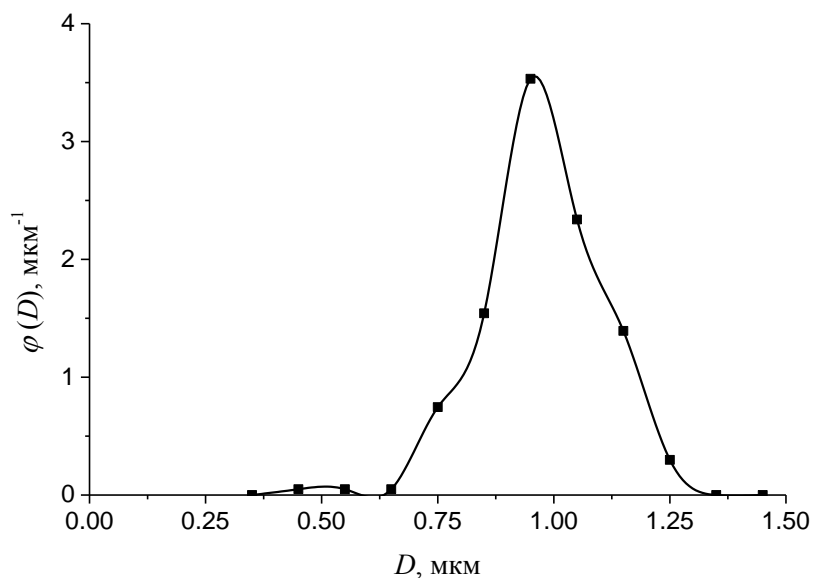


Рисунок 53. Дифференциальная функция распределения по диаметру частиц образца, синтезированного из раствора глицерофосфата кальция (0.02 моль/л) в трис буфере (рН=9.1) в объеме гидрогеля агарозы при концентрации щелочной фосфатазы в геле 0.5 мкг/мл.

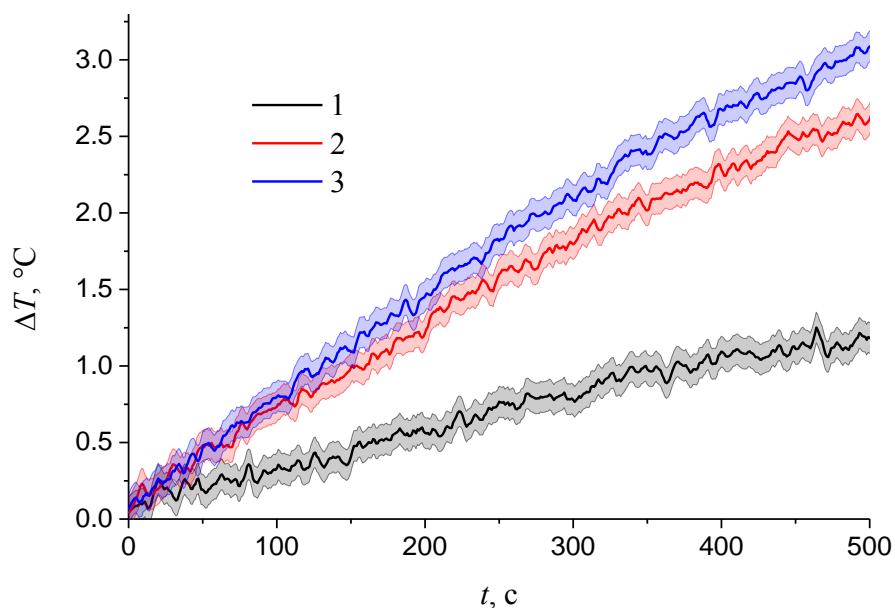


Рисунок 54. Тепловые эффекты, возникающие при воздействии акустического поля на агарозный гидрогель, ферментативно минерализованный гидроксиапатитом: 1 – немодифицированный гидрогель, 2 – содержание фосфатазы 0.5 мкг/мл ($K=2.3\pm 0.2$), 3 – содержание фосфатазы 1 мкг/мл ($K=2.9\pm 0.3$).

Таким образом, образующиеся при ферментативной минерализации относительно крупные агрегаты гидроксиапатита действительно приводят к существенному усилению тепловых эффектов ультразвукового воздействия на такие системы. Этот факт следует учитывать и в ультразвуковой терапии. Здесь формирование твердой фазы соносенсибилизатора в очаге поражения можно было бы обеспечить обычным для биоминерализации путем, так как необходимые для этого ферменты уже присутствуют в организме. С другой стороны, возможно введение в поверхностные опухоли необходимых ферментов с помощью электрофореза. Этот подход предполагает гидролиз имеющихся в ней растворимых фосфатов и с точки зрения синтеза твердофазных соносенсибилизаторов является абсолютно новым.

Можно надеяться, что искусственная минерализация опухоли с помощью ферментативного синтеза нерастворимых фосфатов может повысить избирательность ультразвукового воздействия, обеспечив его локализацию в очаге поражения.

3.5. 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 изученных в работе твердофазных соносенсибилизаторов реально используемыми в ультразвуковой терапии могут быть терафтал и гидроксиапатит. Поэтому они были выбраны для проведения исследований на живых системах. При этом следует отметить, что приведённые примеры составляют небольшую часть проведённых совместно с РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН исследований, результатами которой являются завершённый цикл доклинических испытаний терафтала и три патента.

Оценка эффективности in vitro

Удобным объектом для комплексного изучения твердофазной соносенсибилизации могут быть различные бактерии, например *Escherichia coli* (*Enterobacteriaceae*). Она приспособлена к существованию в условиях человеческого организма при мезофильных температурах и нейтральных значениях pH, отличается высокой пролиферативной активностью, легко культивируется на питательных средах. Бактерии имеют слизистую оболочку, которая может рассматриваться как аналог окружающей среды раковой клетки внутри опухоли.

Введение раствора терафтала в суспензию бактериальных клеток приводит к формированию твердой фазы кальциевой соли, локализованной, по всей вероятности, на поверхности бактерий (рис. 55). При этом первоначально утрата бактериями жизнеспособности не происходит. Заметное снижение жизнеспособности бактерий начинается со времени 1 часа контакта. Ультразвуковое воздействие на бактерии, находящиеся в плотном контакте с кальциевой солью терафтала, но не потерявшие своей жизнеспособности, приводит к частичной ее утрате (рис. 56). При этом число выживших клеток тем меньше, чем больше концентрация терафтала и чем больше интенсивность ультразвукового воздействия. Заметный и воспроизводимый эффект влияния терафтала на уменьшение числа выживших клеток в ультразвуковом поле находится в пределах от 0.6-2.0 Вт/см². При этом концентрация терафтала находится в

пределах 10^{-4} - 10^{-5} М. Воздействие ультразвука с меньшей интенсивностью практически не отражается на жизнеспособности бактерий, а при большей – влияние терафтала перестает быть заметным.

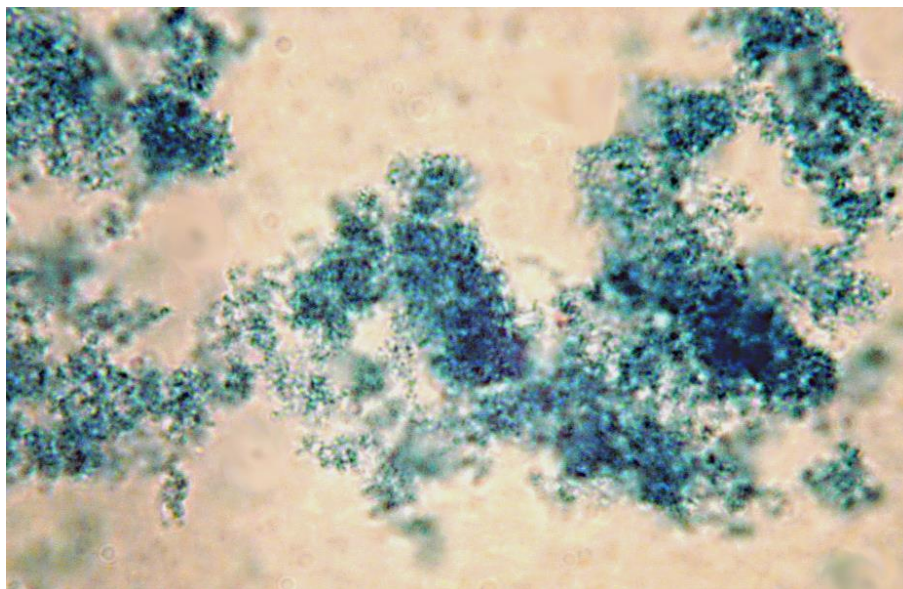


Рисунок 55. Оптическая микрофотография суспензии бактерий *Escherichia coli* с кальциевой солью тарафтала.

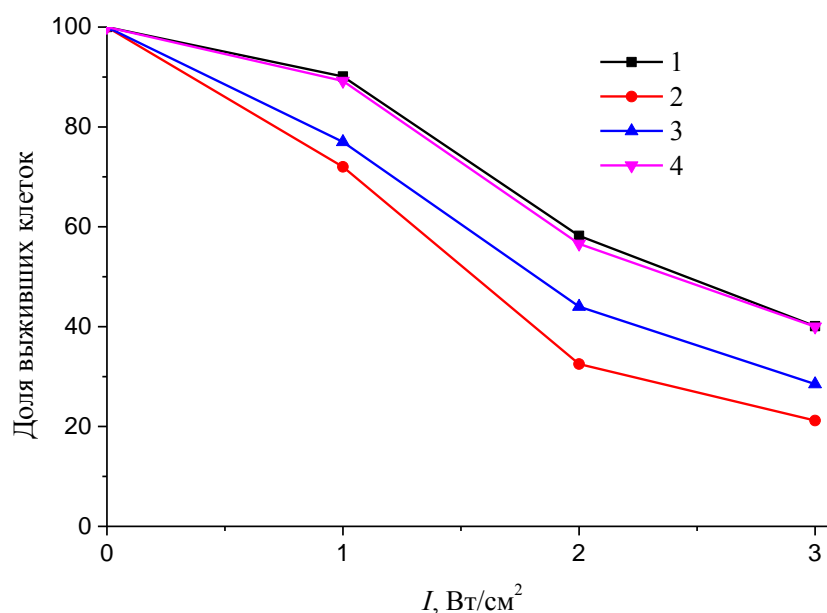


Рисунок 56. Зависимость доли выживших бактериальных клеток после совместного действия ультразвука и тарафтала в различных концентрациях: 1 – без тарафтала, 2 – 10^{-4} М, 3 – 10^{-5} М, 4 – 10^{-6} М. Время предварительного контакта тарафтала с клетками 30 минут, частота ультразвука 0.88 МГц, время ультразвукового воздействия 5 минут.

Для более детального выявления механизма потери жизнеспособности бактериальных клеток был проведен сравнительный анализ электронных микрофотографий исследованных образцов (рис. 57). В результате совместного действия ультразвука и терафтала происходит появление разрывов плазматической мембраны бактериальной клетки. Таким образом, можно заключить, что потеря жизнеспособности бактерий вызвана разрушением мембранных структур. Такое разрушение, по все вероятности, связано с активизацией кавитационных процессов в местах локализации кальциевой соли терафтала, осажденной на поверхности бактерий.

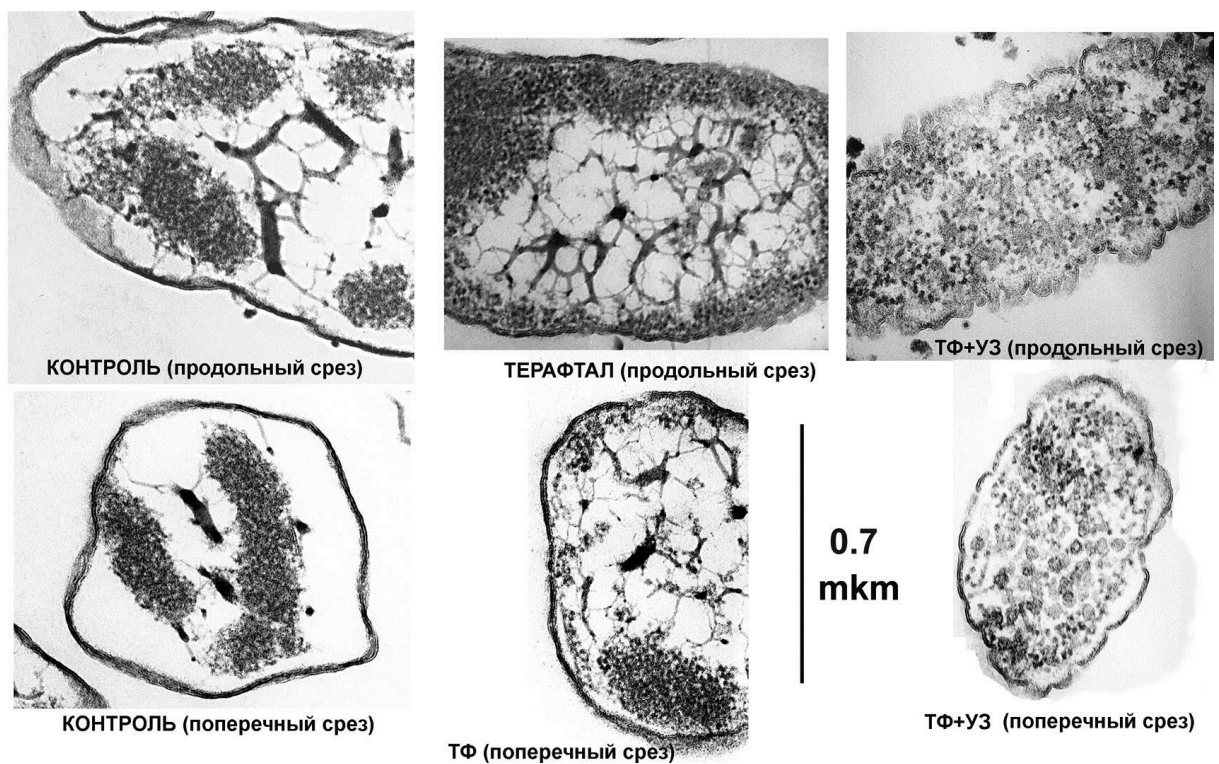
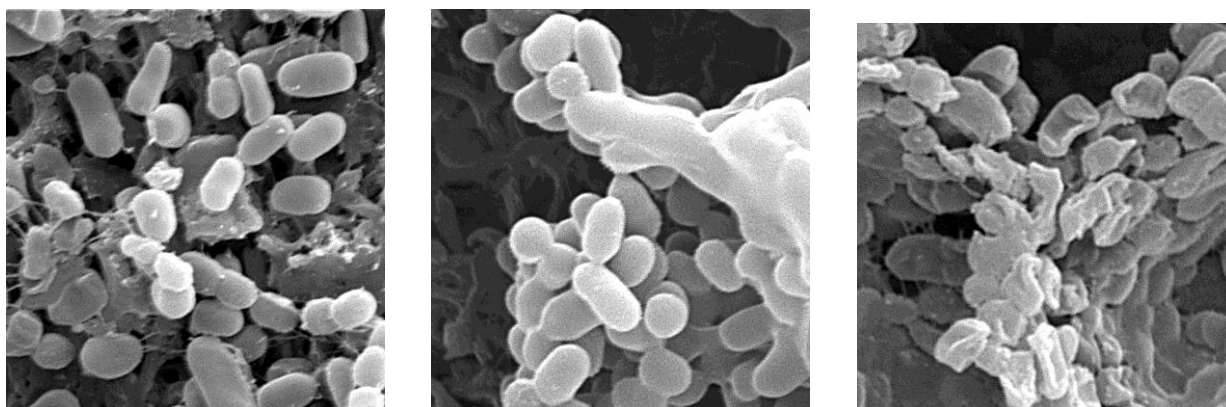


Рисунок 57. Электронные микрофотографии клеток бактерий *Escherichia coli*, обработанных различными способами. Контроль слева, терафтал в центре, терафтал и ультразвук справа.

Аналогичную картину разрушений можно наблюдать и для бактерий рода *Enterococcus*, подвергшихся аналогичному воздействию (рис. 58). Из сопоставления представленных результатов 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 [220].



а)

б)

в)

Рисунок 58. Действие ультразвука на бактерии рода *Enterococcus*: а) нативные бактерии, б) бактерии, обработанные ультразвуком, в) бактерии, обработанные ультразвуком и терафталом. Концентрация терафтала 10^{-5} М, частота ультразвука 0.88 МГц, интенсивность – 1 Вт/см^2 , время обработки 10 минут.

Таким образом, можно сделать вывод об эффективности совместного действия ультразвука и терафтала, которое выражается в разрушении клеточных мембран бактерий. Главным фактором в этом разрушении, вероятно, является акустическая кавитация, усиление которой в присутствии терафтала наблюдалось в экспериментах на гидрогелевых фантомах.

Оценка эффективности in vivo

Совместно с Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина проводились исследования эффективности совместного действия твердофазных соносенсибилизаторов и ультразвука в терапии онкологических заболеваний на экспериментальных животных.

На рисунке 59 представлены кривые динамики роста опухоли при совместном действии ультразвука и терафтала. Терафтал 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 терафтал вообще не оказывает влияние на рост опухоли. Совместное действие ультразвука и терафтала приводит к существенному торможению роста опухоли. В зависимости от дозы, терапевтическая эффективность комбинированного действия ультразвука и терафтала увеличивается в 2-3 раза. Об этом можно судить по соответствующему увеличению времени удвоения объёма опухоли по сравнению с контролем [221].

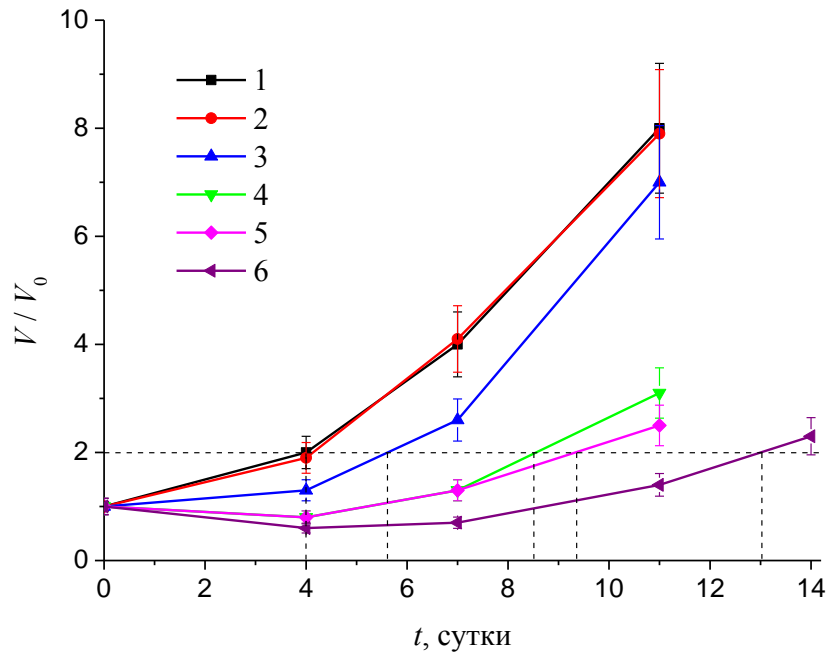


Рисунок 59. Динамика роста опухоли при совместном действии ультразвука и терафтала: 1 – контроль, 2 – терафтал 80 мг/кг, 3 – ультразвук, 4 – ультразвук и терафтал 40 мг/кг, 5 – ультразвук и терафтал 60 мг/кг, 6 – ультразвук и терафтал 80 мг/кг. Ультразвук – 2.64 МГц 2 Вт/см² и 0.88 МГц 1 Вт/см². Начало ультразвукового воздействия через 1 час после введения терафтала. Опухоль меланомы В16, мышцы линии ВDF1.

В качестве твердофазного соносенсибилизатора впервые был опробован препарат на основе нанокристаллов гидроксиапатита. Гидроксиапатит выбран по причине его биосовместимости. Кроме того, имеются данные о его естественном нахождении в крови и безвредности при введении в кровотоки инвазивно [222, 223]. В экспериментах на животных был использован высокодисперсный гидроксиапатит с сорбированным на нем альбумином. Альбумин накапливается в солидных опухолях и поэтому может быть

использован одновременно как стабилизатор твердой фазы и как средство доставки ее в опухоль. Нанокристаллы гидроксиапатита имели размеры 100-200 нм.

Установлено, что сочетанное действие ультразвука и гидроксиапатита приводит к выраженному торможению роста опухоли, величина которого зависит от временного интервала между введением наночастиц и ультразвуковым воздействием. Увеличение эффективности терапии достигает 2 раз при интервале между введением гидроксиапатита и ультразвуковым воздействием 4 часа (рис. 60). Следует отметить, что сенсibiliзирующая активность гидроксиапатита зависит от природы соединения, связанного с его поверхностью. В отсутствие альбумина гидроксиапатит соносенсибилизирующей активностью практически не обладает [224].

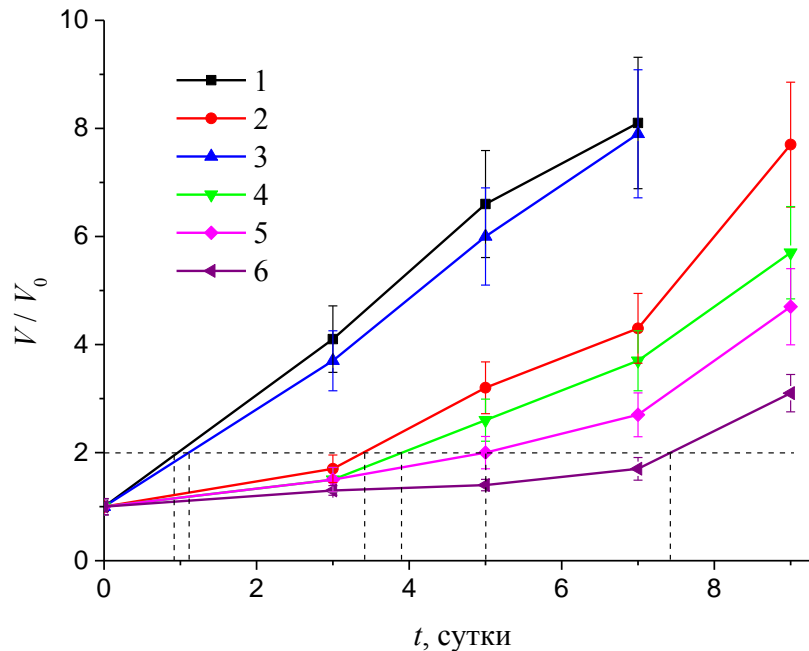


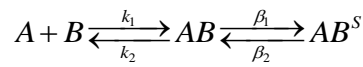
Рисунок 60. Динамика роста опухоли при совместном действии ультразвука (УЗ) и наночастиц гидроксиапатита (НЧ ГАП) с сорбированным на них альбумином (25 мг/кг) в зависимости от интервала между введением НЧ ГАП и УЗ воздействием: 1 – контроль, 2 – ультразвук, 3 – НЧ ГАП, 4 – НЧ ГАП и УЗ через 15 минут, 5 – НЧ ГАП и УЗ через 1 час, 6 – НЧ ГАП и УЗ через 4 часа. Опухоль – меланома В16.

3.6. Модель фазообразования в гидрогелях

Основным способом выявления закономерностей, связывающих характеристики твердой 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 твердого модификатора в гелевой матрице можно представить следующим образом:



Здесь индекс S относится к твердой фазе. Вследствие диффузии и гомогенной реакции между A и B в объем 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 между частицами матрицы и проницаемость слоя уменьшается вплоть до полной его «закупорки» [225]. Скорость диффузии, нуклеации и роста кристаллов определяется концентрацией компонентов раствора. Параметры нуклеации и роста определяются исключительно концентрацией кристаллизующегося вещества в поровом растворе.

Массоперенос в слое

Обозначим через $C_i(x,t)$ профиль мольных концентраций реагентов ($i=1, 2$), и продукта гомогенной реакции ($i=3$) по толщине слоя x в момент t . Уравнения переноса реагентов в слое имеют вид:

$$\frac{\partial \varepsilon C_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[D_i \frac{\partial C_i}{\partial x} \right] + \mathfrak{Z}_i(x,t). \quad (23)$$

Здесь \mathfrak{Z}_i – функции, учитывающие расход и образование i -го компонента. \mathfrak{Z}_1 и \mathfrak{Z}_2 определяются кинетикой гомогенной реакции, а \mathfrak{Z}_3 – кинетикой гомогенной реакции и кинетикой кристаллизации. Выражения для них будут определены ниже.

Функция распределения по размеру кристаллов определена как

$$\Psi(x, L, t) = \frac{\partial N}{\partial L}, \quad (24)$$

где N – число кристаллов в точке x слоя, размер которых меньше L , в единичном объеме слоя. Объем кристаллов, образовавшихся в порах слоя, определяется выражением

$$V_k = \frac{4\pi}{3} \int_0^{\infty} L^3 \Psi(x, L, t) dL. \quad (25)$$

Порозность слоя $\varepsilon = 1 - V_k - V_m$, где V_m и – доля объема слоя, занятого матрицей. В данной модели предполагалось, что коэффициент диффузии зависит от порозности следующим образом:

$$D = D_0 (\varepsilon - \varepsilon_0), \quad (26)$$

где ε_0 – минимальная порозность, при которой все поры становятся замкнутыми и диффузия в слое прекращается. Уравнения дополняется соответствующими начальными и граничными условиями.

Кинетика реакции

Химическая реакция протекает в соответствии с соотношениями

$$\mathfrak{I}_{1,2}(x, t) = (k_2 C_3 - k_1 C_1 C_2) \varepsilon, \quad (27)$$

$$\mathfrak{I}_3(x, t) = (k_1 C_1 C_2 - k_2 C_3) \varepsilon - 4\pi \rho_k \int_0^{\infty} \Psi(x, L, t) L^2 G dL, \quad (28)$$

где k_1 и k_2 – константы скоростей прямой и обратной гомогенных реакций, C_1 , C_2 и C_3 – концентрации реагентов в поровом растворе, ρ_k – плотность кристаллов.

Функция $\Psi(x, L, t)$ в каждой точке слоя подчиняется уравнению Фоккера-Планка

$$\frac{\partial \Psi}{\partial t} = -\frac{\partial(\Psi G)}{\partial L} + \frac{\partial}{\partial L} \left(p \frac{\partial(\Psi G)}{\partial L} \right), \quad (29)$$

где p – коэффициент флуктуации скорости роста.

Начальное условие для функции распределения имеет вид:

$$\Psi(x, L, 0) = 0, \quad (30)$$

т.е. частиц в поровом растворе нет. Граничные условия при $L=0$ для уравнения (29) определяются нуклеацией в объеме порового раствора:

$$G\Psi - p \frac{\partial(G\Psi)}{\partial L} = \eta. \quad (31)$$

Требование отсутствия бесконечно больших частиц позволяет сформулировать условие:

$$\Psi(x, \infty, t) = 0. \quad (32)$$

Скорость нуклеации η и роста G определяются концентрацией продукта реакции C_3 в растворе. Зарождение кристаллов в объеме раствора зависит от пересыщения:

$$\eta = \begin{cases} \beta_0 \left[\left(\frac{C_3}{C_s} \right)^2 - 1 \right], C_3 > C_s, \\ 0, C_3 \leq C_s \end{cases}, \quad (33)$$

где β_0 – кинетический коэффициент гомогенной нуклеации, C_s – растворимость продукта реакции.

Рост кристаллов происходит с линейной скоростью:

$$G = \begin{cases} \beta_1 \left(\frac{C_3}{C_s} - 1 \right), C_3 > C_s \\ 0, C_3 = C_s \\ -\beta_2 \left(\frac{C_3}{C_s} - 1 \right), C_3 < C_s \end{cases}, \quad (34)$$

где β_1, β_2 – кинетические коэффициенты роста и растворения кристаллов.

Распределение массы кристаллов продукта, образовавшихся в гелевом слое, описывается уравнением:

$$m(x) = \frac{4\pi}{3} \rho_k \int_0^{\infty} L^3 \Psi(x, L, t) dL, \quad (35)$$

а суммарная масса кристаллов продукта в слое:

$$M = \int_0^H m(x) dx. \quad (36)$$

Задача (23), (29) с начальными и граничными условиями (30)-(32), а также с начальными и граничными условиями на $C_i(x, t)$, и зависимостями (27), (28), (33), (34) представляет собой нелинейную нестационарную задачу [226, 227]. Ее решение находили численными методами в простейшем одномерном случае. Для этого производные заменяли конечными разностями и решали получившуюся систему линейных уравнений методом прогонки [228].

Анализ результатов вычислительного эксперимента

Обезразмеривание задачи проведено на характерный размер слоя H гелевой матрицы, начальную концентрацию первого реагента C_1 , коэффициент диффузии

первого реагента D_1 , время $t = D_1\tau/H^2$. Для безразмерных величин использованы характерные для кристаллизации значения $p=0.01$ [229, 230].

При анализе результатов моделирования рассматривались случаи, наиболее интересные в практическом отношении. Это диффузионное поступление реагентов в гелевую среду свободную от реагентов с постоянной концентрацией реагентов на границе, условие постоянной концентрации одного компонента и убывающей во времени концентрации другого компонента и двукратное введение реагентов.

Постоянная концентрация реагентов

При формировании модифицированных гидрогелевых систем методом встречной диффузии происходит подача реагентов с разных сторон гелевого слоя. За счет диффузии они движутся навстречу друг другу и реагируют сначала с образованием растворенного продукта, а затем и твердой фазы осадка. Концентрации реагентов вне гелевого слоя можно считать неизменными. В зависимости от диффузионных и кинетических параметров системы может реализоваться различная локализация твердого продукта в поровом пространстве слоя. На рисунке 61 представлены зависимости концентраций реагентов A и B от координаты в слое в различные моменты времени при следующих условиях: $C_1(0,t) = 1$, $C_1(1,t) = 0$, $D_1 = 1$, $C_2(0,t) = 0$, $C_2(1,t) = 0.5$, $D_2 = 1$, $D_3 = 1$, $\varepsilon(x,0) = 1$, $\varepsilon_0 = 0.1$, $C_S = 0.03$, $\beta_0 = 10$, $\beta_1 = 10$, $\beta_2 = 10$, $k_1 = 1$, $k_2 = 0.01$. Уход продукта AB в твердую фазу AB^S приводит к завершению транспорта в узкой области встречи реагентов (на координате $x = 0.60-0.64$), а со снижением проницаемости слоя – у границы выросшей кристаллической фазы (искажение кривых C_1 при $x = 0.60-0.62$). Образующаяся кристаллическая фаза препятствует массопереносу. Как следует из рисунка 62а, изменение пористости ε достигает 0.4. При этом 95% массы кристаллов локализовано в узкой области, а в процессе образования максимум кривой массы смещается в сторону реагента с меньшей концентрацией (рис. 62б).

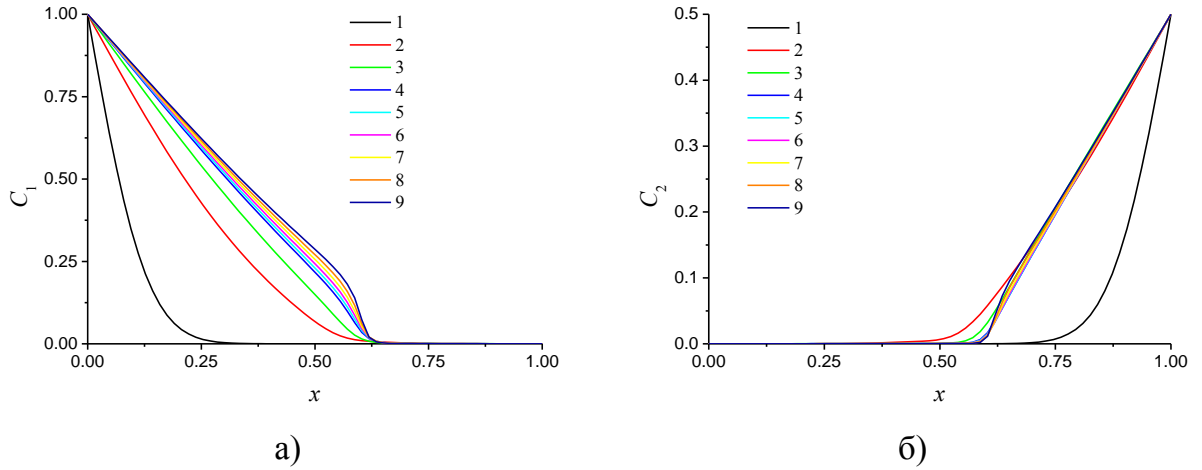


Рисунок 61. Динамика изменения концентрации реагентов А (а) и В (б) по координате слоя при диффузионном поступлении реагентов навстречу друг другу. 1 – $t = 0.006$, 2 – $t = 0.06$, 3 – $t = 0.12$, 4 – $t = 0.19$, 5 – $t = 0.20$, 6 – $t = 0.21$, 7 – $t = 0.22$, 8 – $t = 0.24$, 9 – $t = 0.25$.

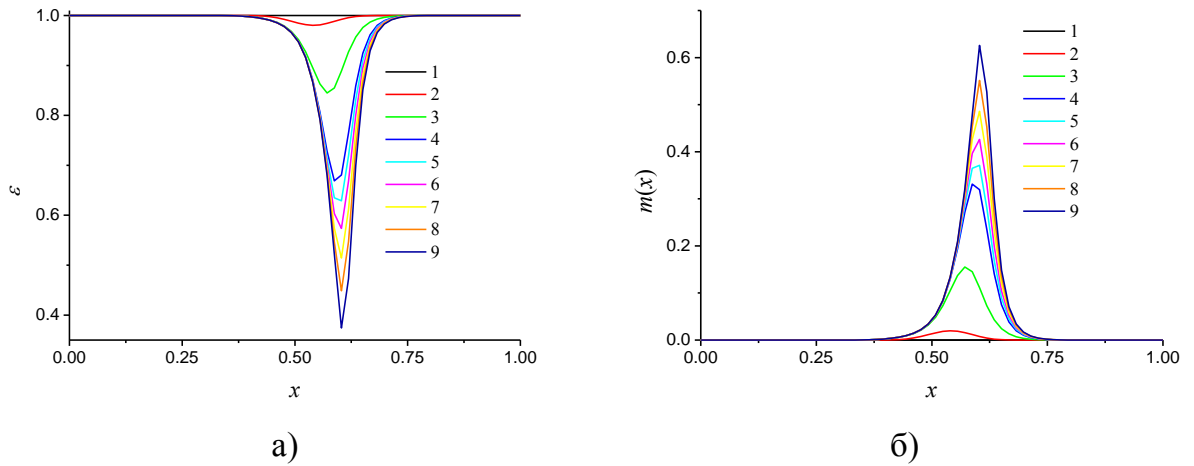


Рисунок 62. Динамика изменения порозности слоя (а) и масса кристаллов твердого продукта (б) по координате слоя. 1 – $t = 0.006$, 2 – $t = 0.06$, 3 – $t = 0.12$, 4 – $t = 0.19$, 5 – $t = 0.20$, 6 – $t = 0.21$, 7 – $t = 0.22$, 8 – $t = 0.24$, 9 – $t = 0.25$.

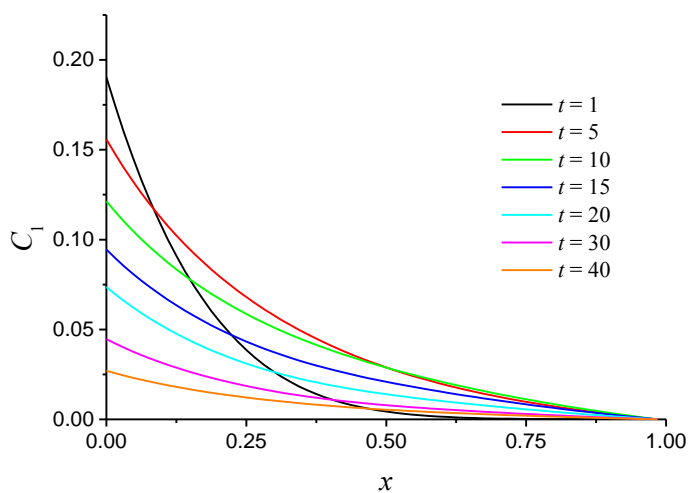
Убывающая концентрация реагентов

Более близкой к ситуации фазообразования *in vivo* является та, когда фазообразование происходит в условиях постоянной концентрации одного компонента и убывающей во времени по определенному закону концентрации другого компонента. Примером может служить образование кальциевой соли терафтала в опухолевой ткани. При этом постоянной остается концентрация ионов кальция в опухоли, а концентрация

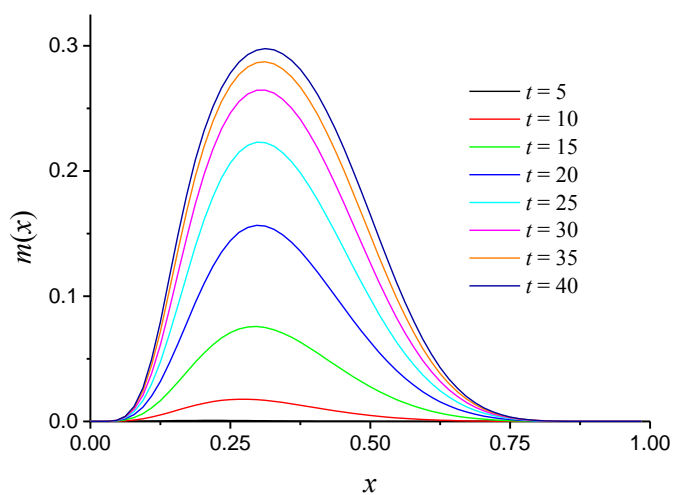
терафтала в сосудистом русле убывает со временем. Для такого случая можно записать следующие условия: $C_1(0,0)=0.2$; $C_1(1,t)=0$; $D_1=0.1$; $C_2(0,t)=0$; $C_2(1,t)=1$; $D_2=0.1$; $C_3(x,0)=1$; $D_3=0.1$; $\varepsilon=1$, $\varepsilon_0=0.1$; $\beta_0=0.5$; $\beta_1=0.03$; $\beta_2=0.005$. Концентрация первого реагента на границе слоя убывает во времени по экспоненциальному закону $C_1(t) = C_1(0,0)\exp(-kt)$.

На рисунках 63-65 показана эволюция во времени концентрации первого реагента в слое, распределения массы твердой фазы по координате и суммарной массы твердого продукта. Численные решения приведены для различных параметров, определяющих убывание концентрации первого реагента в системе ($k=0.05$; 0.1 ; 0.2). В результате расчетов можно отметить, что при убывании концентрации первого реагента на границе слоя общая масса твердого продукта все еще продолжает возрастать. Далее, постепенно растворяясь, депонированная твердая фаза, в принципе, может служить источником растворимой формы. В случае вышеупомянутого терафтала это может быть важным для обеспечения терапевтического эффекта.

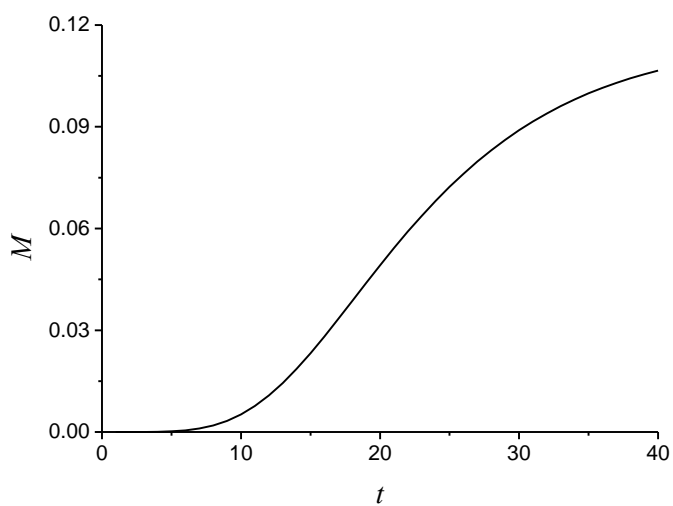
Этот результат указывает на наличие времени, соответствующего максимальному накоплению твердой фазы в выбранных условиях. Для реальной терапевтической процедуры, в которой необходимо иметь максимальное количество твердой фазы в опухоли, это означает наличие оптимального интервала времени, отделяющего момент введения препарата (терафтала) от момента ультразвукового воздействия.



а)

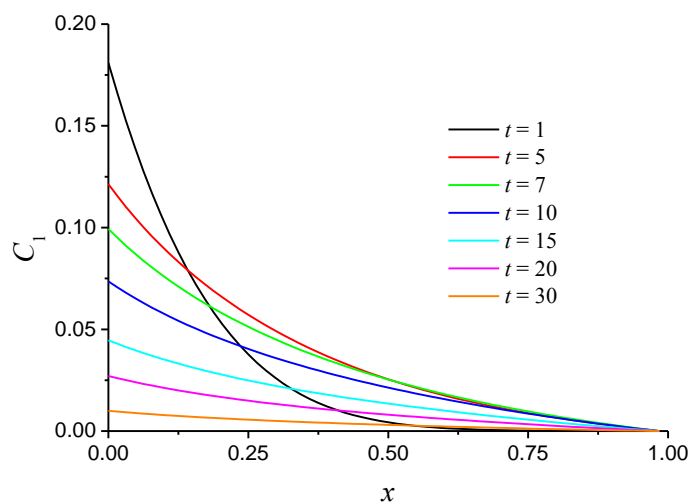


б)

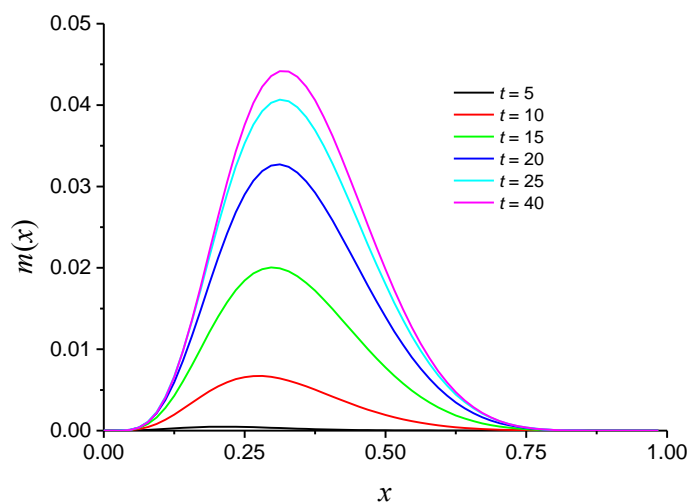


в)

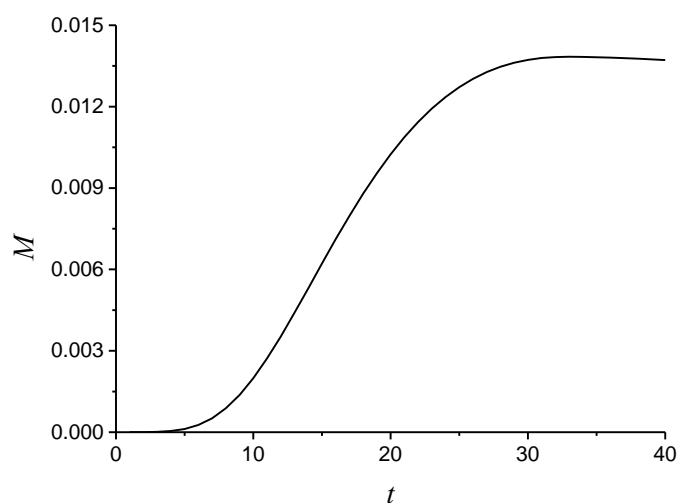
Рисунок 63. Зависимость концентрации первого реагента (а), распределения твердого продукта в слое (б) и его суммарной массы (в) от времени ($k = 0.05$).



а)

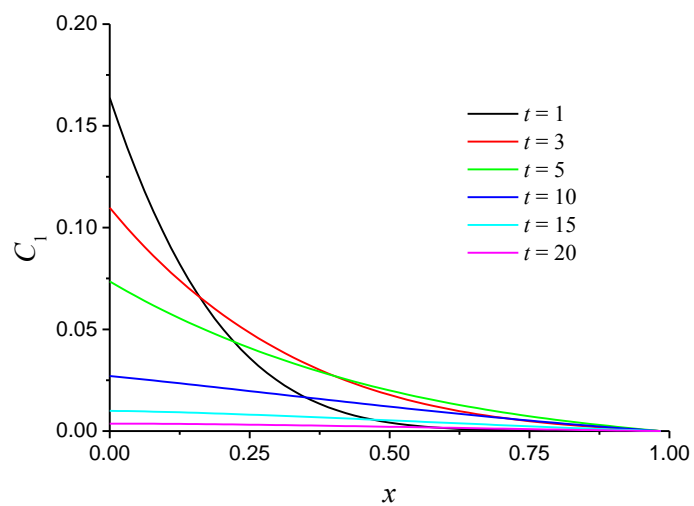


б)

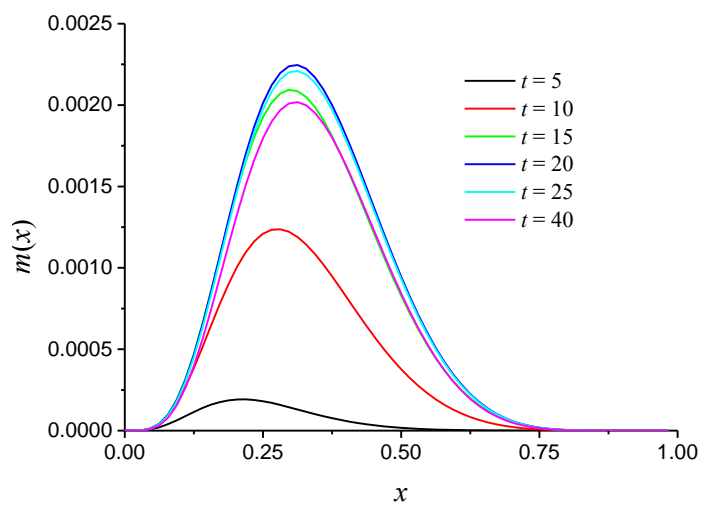


в)

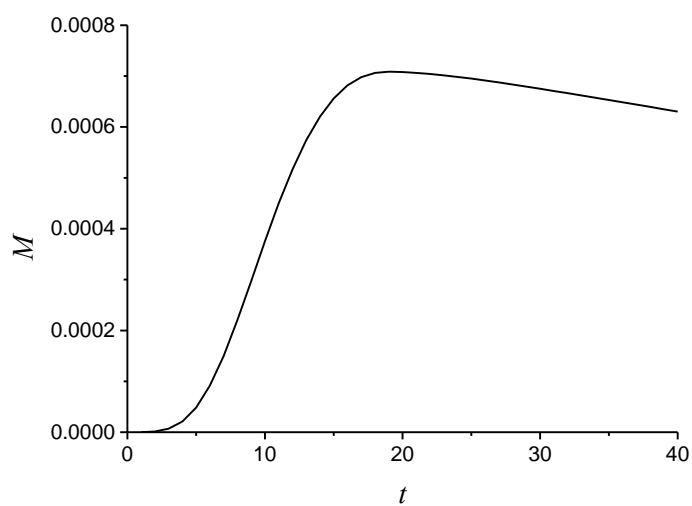
Рисунок 64. Зависимость концентрации первого реагента (а), распределения твердого продукта в слое (б) и его суммарной массы (в) от времени ($k = 0.1$)



а)



б)



в)

Рисунок 65. Зависимость концентрации первого реагента (а), распределения твердого продукта в слое (б) и его суммарной массы (в) от времени ($k = 0.2$)

Двукратное введение препарата

В данном случае до времени t_1 и после времени t_2 граничные концентрации исходных реагентов составляют $C_1(0,t)=C_2(1,t)=1$. В промежуток времени от t_1 до t_2 – $C_1(0,t)=C_2(1,t)=0$. Начиная с момента t_1 , происходит выход реагентов и растворенного продукта из матрицы, а также медленное растворение кристаллов продукта. Малая скорость его растворения по сравнению со скоростью роста (рис. 6б) обусловлена его достаточно низкой растворимостью и, следовательно, диффузионными препятствиями для выхода растворенного продукта из матрицы. С наступлением момента t_2 снова начинается поступление реагентов в слой, что ведет к образованию новых кристаллов и дальнейшему росту недорастворившейся твердой фазы. Параметры, использованные при расчете: $C_1(0,t)=C_2(1,t)=1$, $D_1=D_2=D_3=1$, $C_s=0.01$, $\beta_0=0.005$, $\beta_1=0.0075$, $\beta_2=0.015$, $t_1=3.25$, $t_2=17.25$.

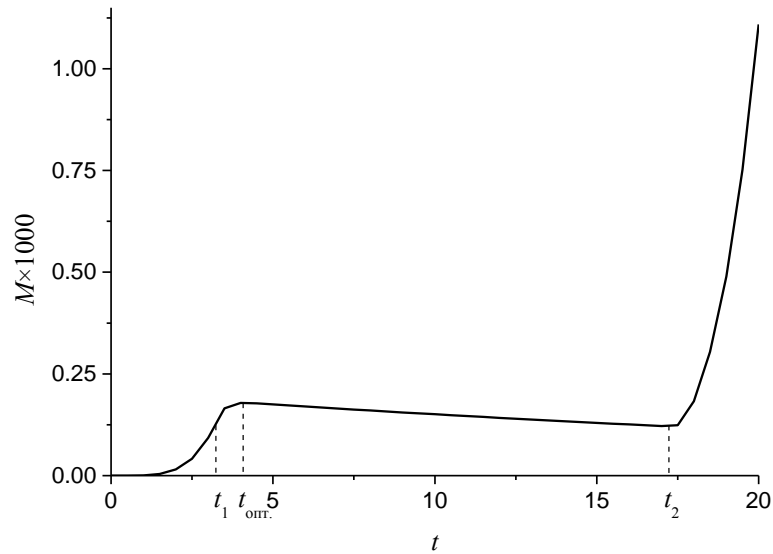


Рисунок 6б. Зависимость суммарной массы твердого продукта от времени.

Видно, что существует оптимальное время накопления модификатора, при котором его масса в слое оказывается максимальной. Причем эта максимальная масса достигается уже после отключения подачи реагентов. Кроме того, данный режим поступления реагентов при второй подаче дает существенно большее накопление твердой фазы продукта в слое, нежели при первой. Также такая двукратная подача приводит к формированию бимодальной функции распределения кристаллов продукта

(рис. 67). Этот результат был успешно использован в реальных экспериментах по ультразвуковой терапии злокачественных опухолей на животных.

Однако применение результатов вычислительных экспериментов ограничено отсутствием полного набора необходимых параметров, требует наработки соответствующей базы данных и в настоящее время может играть роль фактора, определяющего направление экспериментального поиска.

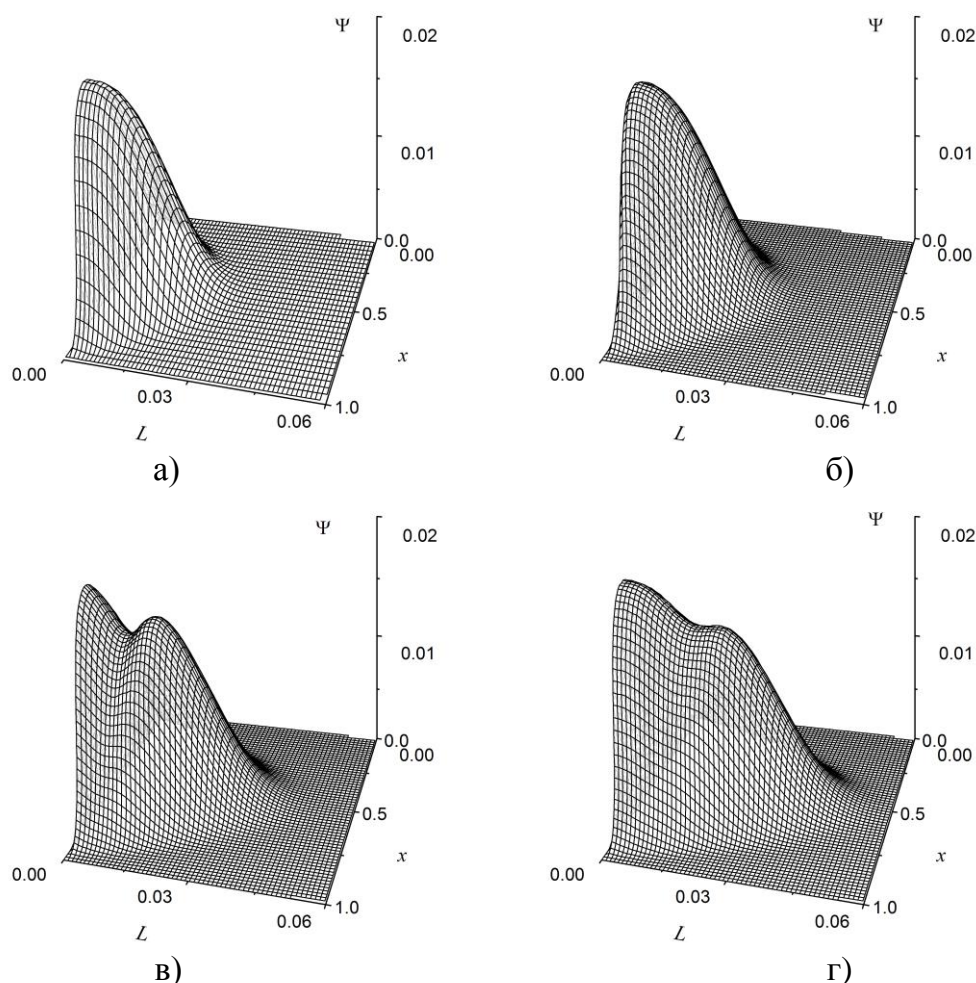


Рисунок 67. Графики функции распределения твердого продукта по размерам в слое в различные моменты времени: а) 3, б) 3.5, в) 19 и г) 20.

3.7. Заключение

В результате проведённых исследований выявлен ряд факторов, определяющих величины акустических эффектов в твердофазно модифицированных гелевых средах. Установлено, что полученные на гелевых моделях результаты, не противоречат

результатам, полученным *in vivo*. Так, соносенсибилизатор терафтал, образующий в условиях опухоли твердую фазу, и гидроксиапатит, который вводится в опухоль внутривенно, показали при воздействии ультразвука высокую противоопухолевую активность. В то же время, в экспериментах с гидрогелями, модифицированными этими соединениями, наблюдалось повышение интенсивности температурных и кавитационных эффектов. Сопоставление результатов исследований, полученных на модельных системах с результатами *in vivo*, позволяет сформулировать некоторые предварительные положения, определяющие критерии выбора соединений, перспективных в качестве соносенсибилизаторов. Это способность в физико-химических условиях опухоли образовывать твердую фазу, локализованную на отдельных элементах модельных опухолевых структур, гидрофобная природа контактов частиц в агрегатах и повышение интенсивности температурных и кавитационных акустических эффектов.

Дальнейшее развитие работ в этом направлении связано с решением ряда задач, важнейшими среди которых являются создание эталонных физико-химических моделей биологических и тканевых сред и разработка физико-химической базы, определяющей параметры формирования твердой фазы в биологических средах. Следующим шагом должно быть выявление закономерностей, связывающих характеристики твердофазных включений (морфология, пористость, иерархическая структура, распределение агрегатов частиц твердой фазы по размерам, локализация, характер связи с полимерной матрицей) с величинами акустических эффектов. Очевидно, что для решения столь масштабной задачи необходимы совместные усилия химиков, физиков, биологов и медиков. При этом основным подходом к решению ещё долгое время будет многоступенчатый экспериментальный скрининг.

Успех этого направления позволит установить корреляцию между параметрами модельных экспериментов и экспериментами *in vivo*. Это позволит разработать алгоритм выбора эффективных соносенсибилизаторов на модельных системах для сонодинамической терапии злокачественных опухолей, сократит время исследований и позволит минимизировать возможные неблагоприятные последствия.

Основные результаты и выводы

1. На примере гидрогелей агарозы, полиакриламида и желатины, модифицированных сульфатом бария, гидроксидом железа (III) и кальциевой солью октакарбокситаллоцианина 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 литературы

1. Sangwal K. Additives and Crystallization Processes: from Fundamentals to Applications / K. Sangwal – New York: Wiley, 2007. – 468 p.
2. Mann S. Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry / S. Mann – Oxford: Oxford University press, 2001. – 210 p.
3. Sommerdijk N.A.J.M. Lessons from Nature–Biomimetic Approaches to Minerals with Complex Structures / N.A.J.M. Sommerdijk, H. Cölfen // MRS Bull. – 2010. – Vol. 35, № 2. – P. 116-121.
4. Song R.-Q. Additive controlled crystallization / R.-Q. Song, H. Cölfen // Cryst. Eng. Comm. – 2011. – Vol. 13, № 5. – P. 1249-1276.
5. Fainerman V.B. Dynamics of a Mixed Monolayer Consisting of a Soluble Amphiphile and Its Insoluble 2D Condensing Homologue / V.B. Fainerman, D. Vollhardt, S. Siegel // J. Phys. Chem. B. – 2002. – Vol. 106, № 5. – P. 5701-5709.
6. Mann S. Controlled crystallization of CaCO₃ under stearic acid monolayers / S. Mann, B.R. Heywood, S. Rajam, J.D. Birchall // Nature. – 1988. – Vol. 334, № 6184. – P. 692-695.
7. Heywood B.R. Molecular Construction of Oriented Inorganic Materials: Controlled Nucleation of Calcite and Aragonite under Compressed Langmuir Monolayers / B.R. Heywood, S. Mann // Chem. Mater. – 1994. – Vol. 6, № 3. – P. 311-318.
8. Gebauer D. Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters / D. Gebauer, A. Volkel, H. Cölfen // Science. – 2008. – Vol. 322, № 5909. – P. 1819-1822.
9. Pouget E.M. The Initial Stages of Template-Controlled CaCO₃ Formation Revealed by Cryo-TEM / E.M. Pouget, P.H.H. Bomans, J.A.C.M. Goos, P.M. Frederik, G. de With, N.A.J.M. Sommerdijk // Science. – 2009. – Vol. 323, № . – P. 1455-1458.
10. Balz M. Crystallization of Vaterite Nanowires by the Cooperative Interaction of Tailor-Made Nucleation Surfaces and Polyelectrolytes / M. Balz, H.A. Therese, J.X. Li, J.S. Gutmann, M. Kappl, L. Nasdala, W. Hofmeister, H.J. Butt, W. Tremel // Adv. Funct. Mater. – 2005. – Vol. 15, № 4. – P. 683-688.
11. Li H.Y. Hydrogels Coupled with Self-Assembled Monolayers: An in Vitro Matrix To Study Calcite Biomineralization / H.Y. Li, L.A. Estroff // J. Am. Chem. Soc. – 2007. – Vol. 129, № 17. – P. 5480-5483.

12. Li C. Bioinspired Fabrication of 3D Ordered Macroporous Single Crystals of Calcite from a Transient Amorphous Phase / C. Li, L.M. Qi // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2008. – Vol. 47, № 13. – P. 2388-2393.
13. Madhavi S. Synthesis and crystallization of macroporous hydroxyapatite / S. Madhavi, C. Ferraris, T.J. White // *J. Solid State Chem.* – 2005 – Vol. 178, № 9. – P. 2838-2845.
14. Uchida M. Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfoms / M. Uchida, M.T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L.O. Liepold, M. Young, T. Douglas // *Adv. Mater.* – 2007. – 19, № 9. – P. 1025-1042.
15. Knez M. Atomic Layer Deposition on Biological Macromolecules: Metal Oxide Coating of Tobacco Mosaic Virus and Ferritin / M. Knez, A. Kadri, C. Wege, U. Gosele, H. Jeske, K. Nielsch // *Nano Lett.* – 2006. – Vol. 6, № 6. – P. 1172-1177.
16. Douglas T. Viruses: Making Friends with Old Foes / T. Douglas, M. Young // *Science.* – 2006. – Vol. 312, № 5775. – P. 873-875.
17. Levi-Kalisman Y. Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM / Y. Levi-Kalisman, G. Falini, L. Addadi, S. Weiner // *J. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 135, № 1. – P. 8-17.
18. Addadi L. Mollusk Shell Formation: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization Processes / L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner // *Chem. Eur. J.* – 2006. – Vol. 12, № 4. – P. 980-987.
19. Murayama E. Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1 / E. Murayama, Y. Takagi, T. Ohira, J.G. Davis, M.I. Greene, H. Nagasawa // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269, № 2. – P. 688-696.
20. Estroff L.A. An organic hydrogel as a matrix for the growth of calcite crystals / L.A. Estroff, L. Addadi, S. Weiner, A.D. Hamilton // *Organic Biomol. Chem.* – 2004. – Vol. 2, № 1. – P. 137-141.
21. Cölfen H. Mesocrystals: Inorganic Superstructures Made by Highly Parallel Crystallization and Controlled Alignment / H. Cölfen, M. Antonietti // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2005. – Vol. 44, № 35. – P. 5576-5591.
22. Schwahn D. Mesocrystal to Single Crystal Transformation of d,l-Alanine Evidenced by Small Angle Neutron Scattering / D. Schwahn, Y. Ma, H. Cölfen // *J. Phys. Chem. C.* – 2007. – Vol. 111, № 8. – P. 3224-3227.

23. Henisch H.K. Crystals in Gels and Liesegang Rings / H.K. Henisch. – Cambridge: Cambridge University Press, 1988. – 197 p.
24. Dennis J. Nucleation and Growth of Crystals in Gels / J. Dennis, H.K. Henisch // *J. Electrochem. Soc.* – 1967. – Vol. 114, № 3, –P. 263-266.
25. Oaki Y. Experimental Demonstration for the Morphological Evolution of Crystals Grown in Gel Media / Y. Oaki, H. Imai // *Cryst. Growth Design.* – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 711-716.
26. Bica C.I.D. Dynamics of Cellulose Whiskers in Agarose Gels. 1. Polarized Dynamic Light Scattering / C.I.D. Bica, R. Borsali, E. Geissler, C. Rochas // *Macromolecules* 2001. – Vol. 34, № 15. – P. 5275-5279.
27. Lee R.E. Interaction of various ions with a lead chromate ionic membrane / R.E. Lee, F.R. Meeks // *J. Colloid Interface Sci.* – 1971. – Vol. 35, № 4. – P. 584-592.
28. Meldrum F.C. Controlling Mineral Morphologies and Structures in Biological and Synthetic Systems / F.C. Meldrum, H. Cölfen // *Chem. Rev.* – 2008. – Vol. 108, № 11. – P. 4332–4432.
29. Lefauchaux F. A comparison between gel grown and solution grown crystals — case of ADP and KDP / F. Lefauchaux, M.C. Robert, E. Manghi // *J. Cryst. Growth.* – 1982. – Vol. 56, № 1. – P. 141-150.
30. Petrova R.I. Habit Modification of Asparagine Monohydrate Crystals by Growth in Hydrogel Media / R.I. Petrova, R. Patel, J.A. Swift // *Cryst. Growth Design.* – 2006. – Vol. 6, № 12. – P. 2709-2715.
31. Yang D. Well-defined star-shaped calcite crystals formed in agarose gels / D. Yang, L.M. Qi, J.M. Ma // *Chem. Commun.* – 2003. – № 10. – P. 1180-1181.
32. Aizenberg J. Crystal-protein interactions studied by overgrowth of calcite on biogenic skeletal elements / J. Aizenberg, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi // *J. Cryst. Growth.* – 1994. – Vol. 142, № 1-2. – P. 156-164.
33. Falini G. Control of the architectural assembly of octacalcium phosphate crystals in denatured collagenous matrices / G. Falini, M. Gazzano, A. Ripamonti // *J. Mater. Chem.* – 2000. – Vol. 10, № 2. – P. 535-538.
34. Kniep R. Biomimetic Growth and Self-Assembly of Fluorapatite Aggregates by Diffusion into Denatured Collagen Matrices / R. Kniep, S. Busch // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 1996. – Vol. 35, № 22. – P. 2624-2626.

35. Busch S. Biomimetic Morphogenesis of Fluorapatite-Gelatin Composites: Fractal Growth, the Question of Intrinsic Electric Fields, Core/Shell Assemblies, Hollow Spheres and Reorganization of Denatured Collagen / S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O. Podebrad, U. Vietze, T. Weiland, R. Kniep // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 1999. – № 10. – P. 1643-1653.
36. Busch S. Chemical and Structural Investigations of Biomimetically Grown Fluorapatite–Gelatin Composite Aggregates / S. Busch, U. Schwarz, R. Kniep // *Adv. Funct. Mater.* – 2003. – Vol. 13, № 3. – P. 189-198.
37. Zhan J.H. Biomimetic Formation of Porous Single-Crystalline CaCO₃ via Nanocrystal Aggregation / J.H. Zhan, H.P. Lin, C.Y. Mou // *Adv. Mater.* – 2003. – Vol. 15, № 7-8. – P. 621-623.
38. Grassmann O. Organic–Inorganic Hybrid Structure of Calcite Crystalline Assemblies Grown in a Gelatin Hydrogel Matrix: Relevance to Biomineralization / O. Grassmann, G. Müller, P. Löbmann // *Chem. Mater.* – 2002. – Vol. 14, № 11. – P. 4530-4535.
39. Grassmann O. Biomimetic control of crystal assembly by growth in an organic hydrogel network / O. Grassmann, R.B. Neder, A. Putnis, P. Löbmann // *Am. Mineral.* – 2003. – Vol. 88, № 4. – P. 647-653.
40. Grassmann O. Morphogenetic Control of Calcite Crystal Growth in Sulfonic Acid Based Hydrogels / O. Grassmann, P. Löbmann // *Chem. Eur. J.* – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 1310-1316.
41. Grassmann O. Biomimetic nucleation and growth of CaCO₃ in hydrogels incorporating carboxylate groups / O. Grassmann, P. Löbmann // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25, № 2. – P. 277-282.
42. Oaki Y. A hierarchical self-similar structure of oriented calcite with association of an agar gel matrix: inheritance of crystal habit from nanoscale / Y. Oaki, S. Hayashi, H. Imai // *Chem. Commun.* – 2007. – № 27. – P. 2841-2843.
43. Sethmann I. Octocoral sclerite ultrastructures and experimental approach to underlying biomineralisation principles / I. Sethmann, U. Helbig, G. Worheide // *Cryst. Eng. Comm.* – 2007. – Vol. 9, № 12. – P. 1262-1268.
44. Li H.Y. Porous calcite single crystals grown from a hydrogel medium / H.Y. Li, L.A. Estroff // *Cryst. Eng. Comm.* – 2007. – Vol. 9, № 12. – P. 1153-1155.

45. Suda J. Morphological Diversity in the Crystal Growth of Potassium Dichromate in Gelatin Gel / J. Suda, T. Nakayama, A. Nakahara, M. Matsushita // *J. Phys. Soc. Jpn.* – 1996. – Vol. 65, № 3. – P. 771-777.
46. Oaki Y. Morphological Evolution of Inorganic Crystal into Zigzag and Helical Architectures with an Exquisite Association of Polymer: A Novel Approach for Morphological Complexity / Y. Oaki, H. Imai // *Langmuir*. – 2005. Vol. 21, № 3. – P. 863-869.
47. Oaki Y. Amplification of Chirality from Molecules into Morphology of Crystals through Molecular Recognition / Y. Oaki, H. Ima // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126, № 30. – P. 9271-9275.
48. Falini G. Calcite crystallization on gelatin films containing polyelectrolytes / G. Falini, M. Gazzano, A. Ripamonti // *Adv. Mater.* – 1994. – Vol. 6, № 1. – P. 46-48.
49. Falini G. Biomimetic Crystallization of Calcium Carbonate Polymorphs by Means of Collagenous Matrices / G. Falini, S. Fermani, M. Gazzano, A. Ripamonti // *Chem. Eur. J.* – 1997. – Vol. 3, № 11. – P. 1807-1814.
50. Falini G. Oriented Crystallization of Vaterite in Collagenous Matrices / G. Falini, S. Fermani, M. Gazzano, A. Ripamonti // *Chem. Eur. J.* – 1998. – Vol. 4, № 6. – P. 1048-1052.
51. Falini G. Polymorphism and architectural crystal assembly of calcium carbonate in biologically inspired polymeric matrices / G. Falini, S. Fermani, M. Gazzano, A. Ripamonti // *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* – 2000. – № 21. – P. 3983-3987.
52. Wada N. Effects of calcium-binding polysaccharides from calcareous algae on calcium carbonate polymorphs under conditions of double diffusion / N. Wada, M. Okazaki, S. Tachikawa // *J. Cryst. Growth.* – 1993. – Vol. 132, № 1-2. – P. 115-121.
53. Wada N. Effects of divalent cations upon nucleation, growth and transformation of calcium carbonate polymorphs under conditions of double diffusion / N. Wada, K. Yamashita, T. Umegaki // *J. Cryst. Growth.* – 1995. – Vol. 148, № 3. – P. 297-304.
54. Wada N. Effects of Silver, Aluminum, and Chrome Ions on the Polymorphic Formation of Calcium Carbonate under Conditions of Double Diffusion / N. Wada, K. Yamashita, T. Umegaki // *J. Colloid Interface Sci.* – 1998. – Vol. 201, № 1. – P. 1-6.
55. Wada N. Effects of Carboxylic Acids on Calcite Formation in the Presence of Mg^{2+} Ions / N. Wada, K. Yamashita, T. Umegaki // *J. Colloid Interface Sci.* – 1999. – Vol. 212, № 2. – P. 357-364.

56. Fernandez-Diaz L. The role of magnesium in the crystallization of calcite and aragonite in a porous medium / L. Fernandez-Diaz, A. Putnis, M. Prieto, C.V. Putnis // *J. Sediment. Res.* – 1996. – Vol. 66, № 3. – P. 482-491.
57. Ультразвук. Маленькая энциклопедия / под. ред. И. П. Голямина. – М.: Советская энциклопедия, 1979. – 400 с.
58. Хавский Н.Н. Основные эффекты, возникающие в мощных ультразвуковых полях / Н.Н. Хавский – М.: Изд. МИСИС, 1987. – 82 с.
59. Кольцова И.С. Распространение ультразвуковых волн в гетерогенных средах / И.С. Кольцова – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2007. – 247 с.
60. Данилов Е.Б. Акустические течения и возможность их использования для интенсификации массообменных процессов / Е.Б. Данилов, Н.Г. Семенова // *Сб. научн. тр. МИСИС.* – 1977. – № 90. – С. 5-8.
61. Ratoarinoro. Power measurement in sonochemistry / Ratoarinoro, F. Contamine, A.M. Wilhelm, J. Berlan, H. Delmas // *Ultrason. Sonochem.* – 1995. – Vol. 2, № 1. – P. S43-S47.
62. Challis R.E. Ultrasound techniques for characterizing colloidal dispersions / R.E. Challis, M.J.W. Povey, M.L. Mather, A.K. Holmes // *Rep. Prog. Phys.* – 2005. – Vol. 68, № 7. – P. 1541-1637.
63. Strutt J.W. (B. Rayleigh). *The Theory of Sound* / J.W. Strutt (B. Rayleigh). – London: Macmillan and Co. – 1896.
64. Sewell C.J.T. On the extinction of sound in viscous atmospheres by small obstacles of cylindrical form / C.J.T. Sewell // *Phil. Trans. R. Soc. A.* – 1910 – Vol. 210. – P. 239-270.
65. Lamb H. *Hydrodynamics* / H. Lamb. – New York: Dover publications. – 1945. – 762 p.
66. Urick R.J. A sound velocity method for determining the compressibility of finely divided substances / R.J. Urick // *J. Appl. Phys.* – 1947. – Vol. 18, № 11. – P. 983-987.
67. Urick R.J. The propagation of sound in composite media / R.J. Urick, W.S. Ament // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1949. – Vol. 21, № 2. – P. 115-119.
68. Wood A.B. *A Textbook of Sound* / A.B. Wood. – London: G Bell and Sons. – 1941. – 578 p.
69. Urick R.J. The absorption of sound in suspensions of irregular particles / R.J. Urick // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1948. – Vol. 20, № 3. – P. 283-289.

70. Strutt J.W. (B. Rayleigh). Investigation of the disturbance produced by a spherical obstacle on the waves of sound / J.W. Strutt (B. Rayleigh). // *Math. Soc. Proc.* – 1872. – Vol. 4. – P. 253-283.
71. Epstein P.S. The absorption of sound in suspensions and emulsion / P.S. Epstein, R.R. Carhart // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1953. – Vol. 25, № 3. – P. 553-565.
72. Herzfeld K.T. The scattering of sound waves on small elastic spheres / K.T. Herzfeld // *Phil. Mag.* – 1930. – Vol. 9, № 59 suppl. – P. 741-751.
73. Исакович М.А. О распространении звука в эмульсиях/ М.А. Исакович // *ЖЭТФ.* – 1948. – Т. 18, № 10. – С. 905-912.
74. Ратинская И.А. О затухании звука в эмульсиях / И.А. Ратинская // *Акуст. Ж.* – 1962. – Т. 8, №2. – С. 210-215.
75. Allegra J.R. Attenuation of sound in suspensions and emulsions: theory and experiments / J.R. Allegra, S.A. Hawley // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1971. – Vol. 51, №5. – P.1545-1564.
76. Matsukawa M. Ultrasonic wave properties in the particle compounded agarose gels / M. Matsukawa, T. Akimoto, Sh. Ueba, T. Otani // *Ultrasonics.* – 2002. – Vol. 40, № 1-8. – P. 323-327.
77. Mason T.J. Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing / T.J. Mason, J.P. Lorimer – Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH, 2002. – 303 p.
- 78 Neppiras E.A. Cavitation Produced by Ultrasonics: Theoretical Conditions for the Onset of Cavitation / E.A. Neppiras, B.E. Noltingk // *London: Proc. Phys. Soc. B.* – 1950. – Vol. 64., № 12. – P. 1032-1038.
79. Flynn H.G. Physics of acoustic cavitation in liquids / H.G. Flynn // *Physical acoustics.* – Ed. W.P. Mason. – New York: Academic Press, 1964. – Vol. 1B. – P. 57-172.
80. Neppiras E.A. Acoustic cavitation / E.A. Neppiras // *Physics reports.* – 1980. – Vol. 61, № 3. – P. 159-251.
81. Ashokkumar M. The characterization of acoustic cavitation bubbles – An overview / M. Ashokkumar // *Ultrason. Sonochem.* – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 864-872.
82. Leighton T.G. The Acoustic Bubble / T.G. Leighton. – London: Academic Press, 1994. – 613 p.

83. Misík V. EPR spin-trapping of the sonolysis of H₂O/D₂O mixtures: probing the temperatures of cavitation regions / V. Misík, N. Miyoshi, P. Reisz // *J. Phys. Chem.* – 1995. – Vol. 99, № 11. – P. 3605-3611.
84. Suslick K.S. Sonochemical hotspot / K.S. Suslick, D.A. Hammerton, R.E. Cline // *J. Am. Chem. Soc.* – 1986. – Vol. 108, № 18. – P. 5641-5642.
85. Хорошев Г.А. О захлопывании паровоздушных кавитационных полостей / Г.А. Хорошев // *Акуст. Ж.* – 1963. – Т. 9, № 3. – С. 340-346.
86. Eller A., Flynn H.G. Rectified Diffusion during Nonlinear Pulsations of Cavitation Bubbles / A. Eller, H.G. Flynn // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1965. – Vol. 37, № 3. – P. 493-503.
87. Eller A.I. Growth of Bubbles by Rectified Diffusion / A.I. Eller // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1969. – Vol. 46, №5. – P. 1246-1250.
88. Greenspan M. Radiation-induced acoustic cavitation; apparatus and some results / M. Greenspan, C.E. Tschiegg // *J. Res. Natl. Bur. Stand.* – 1967. – Vol. 71C, № 4. – P. 299-312.
89. Маргулис М.А. Основы звукохимии. Химические реакции в акустических полях / М.А. Маргулис – М.: Высшая школа, 1984. — 272 с.
90. Сиротюк М.Г. Акустическая кавитация / М.Г. Сиротюк — М.: Наука, 2008. – 271 с.
91. Apfel R.E. The Role of Impurities in Cavitation-Threshold Determination / R.E. Apfel // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1970. – Vol. 48, № 5. – P. 1179-1186.
92. Belova V. Selective Ultrasonic Cavitation on Patterned Hydrophobic Surfaces / V. Belova, D.A. Gorin, D.G. Shchukin, H. Möhwald // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2010. – Vol. 49, № 39. – P. 7129-7133.
93. Bremond N. Cavitation on surfaces / N. Bremond, M. Arora, C.-D. Ohl, D. Lohse // *J. Phys.: Condens. Matter* – 2005. – Vol. 17, № 45. – P. S3603-S3608.
94. Lapidés I. The effect of ultrasound treatment on the particle-size of Wyoming bentonite in aqueous suspensions / I. Lapidés, Sh. Yariv // *J. Mater. Sci.* – 2004. – Vol. 39, № 16-17. – P. 5209-5212.
95. Grossier R. Mixture segregation by an inertial cavitation bubble / R. Grossier, O. Louisnard, Y. Vargas // *Ultrason. Sonochem.* – 2007. – Vol. 14, № 4. – P. 431-437.

96. Ruecroft G. Sonocrystallization: the use of ultrasound for improved industrial crystallization / G. Ruecroft, D. Hipkiss, T. Ly, N. Maxted, P.W. Cains // *Org. Process Res. Dev.* – 2005. – Vol. 9, № 6. – P. 923-932.
97. Lyczko N. Effect of ultrasound on the induction time and the metastable zone widths of potassium sulphate / N. Lyczko, F. Espitalier, O. Louisnard, J. Schwartzentruber // *Chem. Eng. J.* – 2002. – Vol. 86, № 3. – P. 233-241.
98. Ультразвук в медицине и биологии. Физические основы применения / под ред. К. Хилла, Дж. Бембера, Г. тер Хаар – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008. – 544 с.
99. Esche R. Untersuchung der Schwingungskavitation in Flüssigkeiten / R. Esche // *Akust. Beih.* – 1952. – Vol. 2, Suppl. 4. – P. 208-218.
100. Morton K.I. Subharmonic emission as an indicator of ultrasonically induced biological damage / K.I. Morton, G.R. ter Haar, L.J. Stratford, C.R. Hill // *Ultrasound Med. Biol.* – 1983. – Vol. 9. – P. 629-633.
101. Neppiras E.A. Subharmonic and other low frequency signals from bubbles in sound-irradiated liquids / E.A. Neppiras // *J. Sound Vib.* – 1969. – Vol. 10. – P. 176-186.
102. Holland C.K. Thresholds for transient cavitation produced by pulsed ultrasound in a controlled nuclei environment / C.K. Holland, R.E. Apfel // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1990. – Vol. 88. – P. 2059-2069.
103. Coleman A.J. Acoustic emission and sonoluminescence due to cavitation at the beam focus of an electrohydraulic shock wave lithotripter // *Ultrasound Med. Biol.* – 1992. – Vol. 18. – P. 267-281.
104. Акопян В.Б. Ультразвуковое свечение / В.Б. Акопян, А.М. Журавлев – М.: «Наука», 1977. – 135 с.
105. Roy R.A. A precise technique for the measurement of acoustic cavitation thresholds and some preliminary results / R.A. Roy, A.A. Atchley, L.A. Crum, J.B. Fowlkes, J.J. Reidy // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1985. – Vol. 78. – P. 1799-1805.
106. Daniels S. Sonoluminescence in water and agar gels during irradiation with 0.75 MHz continuous-wave ultrasound // *Ultrasound Med. Biol.* – 1991. – Vol. 17. – P. 297-308.
107. Weissler A. Chemical effects of ultrasonic waves: oxidation of KI solution by CCl₄ / A. Weissler // *J. Am. Chem. Soc.* – 1950. – Vol. 72, № 4. – P. 1769-1775.

108. Fricke H. Chemical dosimetry / H. Fricke, E.J. Haart // Radiation dosimetry, eds. F.H. Attrib, W.C. Roesch. – New York: Academic Press, 1966. – P. 167-239.
109. Wang L. Drastically enhanced ultrasonic decolorization of methyl orange by adding CCl_4 / L. Wang, L. Zhu, W. Luo, Y. Wu, H. Tang // Ultrason. Sonochem. – 2007. – Vol. 14, № 2. – P. 253-258.
110. ter Haar G.R. Evidence for ultrasonically induced cavitation *in vivo* / G.R. ter Haar, S. Daniels // Phys. Med. Biol. – 1981. – Vol. 26. – P. 1145-1149.
111. ter Haar G.R. Ultrasonically induced cavitation *in vivo* / G.R. ter Haar, S. Daniels, K.C. Eastaugh, C.R. Hill // Br. J. Cancer. – 1982. – Vol. 45, Suppl. Vol. – P. 151-155.
112. Amso N.N. Application of therapeutic ultrasound in medicine / N.N. Amso // Ultrason. Sonochem. – 1994. – Vol. 1, № 1. – P.69-71.
113. Акопян В.Б. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами / В.Б. Акопян, Ю.А. Ершов. – М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. – 224 с.
114. Сперанский А.П. Ультразвук и его лечебное применение / А.П. Сперанский, В.И. Рокитянский. – М.: Медицина, 1970. – 287 с.
115. Overgaard J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy / J. Overgaard // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1989. – Vol. 16, № 3. – P. 535-549.
116. Sneed P.K. Combining hyperthermia and radiation: how beneficial? / P.K. Sneed, T.L. Phillips // Oncology (Williston Park N.Y.). – 1991. – Vol. 5, № 3. – P. 99-108.
117. Bornstein B.A. Local hyperthermia, radiation therapy, and chemotherapy in patients with local-regional recurrence of breast carcinoma / B.A. Bornstein, P.S. Zouranjian, J.L. Hansen, S.M. Fraser, L.A. Gelwan, B.A. Teicher, G.K. Svensson // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1993. – Vol. 25, № 1. – P. 79-85.
118. Dahl O. Hyperthermia on chemotherapeutic agents / O. Dahl, O. Mella // eds.: S.B. Field, J.W. Hand. An introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia. – New York: Taylor & Francis, 1990. – P. 104-142.
119. Fessenden P. Hyperthermia therapy physics / P. Fessenden, J.W. Hand // ed.: A.R. Smith. Medical radiology: radiation therapy physics. – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – P. 315-363.
120. Seegenschmiedt M.H. Techniques and clinical experience of interstitial thermoradiotherapy / M.H. Seegenschmiedt, R. Sauer, L.W. Brady, U.L. Karlsson // ed.:

- R. Sauer. Interventional radiation therapy, techniques-brachytherapy. – Berlin: Springer Verlag. – 1991. – P. 343-355.
121. Interstitial and intracavitary thermoradiotherapy / eds.: M.H. Seegenschmiedt, R. Sauer. – Berlin: Springer-Verlag, 1993. – 397 p.
122. Principles and practices of thermoradiotherapy and thermochemotherapy / eds.: M.H. Seegenschmiedt, P. Fessenden, C.C. Vernon. – Berlin: Springer-Verlag, 1995.
123. Dewey W.C. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic / W.C. Dewey // *Int. J. Hyperthermia*. – 1994. – Vol. 10, № 4. – P. 457-483.
124. Dewhurst M.W. Future directions in hyperthermia biology / M.W. Dewhurst // *Int. J. Hyperthermia*. – 1994. – Vol. 10, № 3. – P. 339-345.
125. Gaber M.H. Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks / M.H. Gaber, N.Z. Wu, K. Hong, S.K. Huang, M.W. Dewhurst, D. Papahadjopoulos // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1996. – Vol. 36, № 5. – P. 1177-1187.
126. Huang S.K. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes / S.K. Huang, P.R. Stauffer, K. Hong, J.W. Guo, T.L. Phillips, A. Huang, D. Papahadjopoulos // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, № 8. – P. 2186-2191.
127. Kakinuma K. Targeting chemotherapy for malignant brain tumor using thermosensitive liposome and localized hyperthermia / K. Kakinuma, R. Tanaka, H. Takahashi, M. Watanabe, T. Nakagawa, M. Kuroki // *J. Neurosurg.* – 1996. – Vol. 84, № 2. – P. 180-184.
128. Pearce J. Rate process analysis of thermal damage / J. Pearce, S. Thomsen // Eds.: A.J. Welch, M.J.C. Van Gemert. – *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. – London: Plenum, 1995. – P. 561-606.
129. Sapareto S.A. Thermal dose determination in cancer therapy / S.A. Sapareto, W.C. Dewey // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1984 – Vol. 10, № 6. – P. 787-800.
130. Diederich C.J. Ultrasound technology for hyperthermia / C.J. Diederich, K. Hynynen // *Ultrasound Med. Biol.* – 1999. – Vol. 25, № 6. – P. 871-887.
131. Anhalt D.P. Patterns of changes of tumour temperatures during clinical hyperthermia: implications for treatment planning, evaluation and control / D.P. Anhalt, K. Hynynen, R.B. Roemer // *Int. J. Hyperthermia*. – 1995. – Vol. 11, № 3. – P. 425-436.

132. Wood A.K.W. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy / A.K.W. Wood, Ch.M. Sehgal // *Ultrasound Med. Biol.* – 2015. – Vol. 41, № 4. – P. 905-928.
133. Yumita N. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound / N. Yumita, R. Nishigaki, K. Umemura, S. Umemura // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1989. – Vol. 80, № 3. – P. 219-222.
134. Umemura S. Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin / S. Umemura, N. Yumita, R. Nishigaki, K. Umemura // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1990. – Vol. 81, № 9. – P. 962-966.
135. Bailey M. Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound. (A review) / M. Bailey, V. Khokhlova, O. Sapozhnikov, S. Kargl, L. Crum // *Acoust. Phys.* – 2003. – Vol. 49, № 4. – P. 369-388.
136. Jin Z.H. Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C3 H/HeN mice / Z.H. Jin, N. Miyoshi, K. Ishiguro, S. Umemura, K. Kawabata, N. Yumita, I. Sakata, K. Takaoka, T. Udagawa, S. Nakajima, H. Tajiri, K. Ueda, M. Fukuda, M. Kumakiri // *J. Dermatol.* – 2000. – Vol. 27, № 5. – P. 294-306.
137. Shibaguchi H. Sonodynamic cancer therapy: A non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer / H. Shibaguchi, H. Tsuru, M. Kuroki, M. Kuroki // *Anticancer Res.* – 2011. Vol. 31, № 7. – P. 2425-2429.
138. Costley D. Treating cancer with sonodynamic therapy: A review / D. Costley, C. Mc Ewan, C. Fowley, A.P. McHale, J. Atchison, N. Nomikou, J.F. Callan // *Int. J. Hyperthermia.* – 2015. – Vol. 31, № 2. – P. 107-117.
139. Misik V. Free radical intermediates in sonodynamic therapy / V. Misik, P. Riesz // *Annals N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 899. – P. 335-348.
140. Saksena T. Sonoluminescence from stable cavitation / T. Saksena, W. Nyborg // *J. Chem. Phys.* – 1970. Vol. 53. – P. 1722-1734.
141. Gaitan D.F. Sonoluminescence and bubble dynamics for a single, stable, cavitation bubble / D.F. Gaitan, L.A. Crum, C.C. Church, R.A. Roy // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1992. – Vol. 91. – P. 3166-3183.
142. He Y. In vivo sonoluminescence imaging with the assistance of FCLA / Y. He, D. Xing, S. Tan, Y. Tang, K. Ueda // *Phys. Med. Biol.* – 2002. Vol. 47, № 9. – P. 1535-1541.

143. Hachimine K. Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I), which is devoid of photosensitivity / K. Hachimine, H. Shibaguchi, M. Kuroki, H. Yamada, T. Kinugasa, Y. Nakae, R. Asano, I. Sakata, Y. Yamashita, T. Shirakusa, M. Kuroki // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98, № 6. – P. 916-920.
- 144 Kessel D. Modes of photodynamic vs sonodynamic cytotoxicity / D. Kessel, J. Lo, R. Jeffers, J.B. Fowlkes, C. Cain // *J Photochem. Photobiol. B.* – 1995. – Vol. 28, № 3. – P. 219-221.
145. Yumita N. Sonodynamically induced apoptosis, necrosis, and active oxygen generation by mono-l-aspartyl chlorin e6 / N. Yumita, Q. Han, I. Kitazumi, S. Umemura // *Cancer Sci.* – 2008. – Vol. 99, № 1. – P. 166-172.
146. Hiraoka W. Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photosensitizers on free radical formation and cell killing / W. Hiraoka, H. Honda, L.B. Feril Jr, N. Kudo, T. Kondo // *Ultrason. Sonochem.* – 2006. – Vol. 13, № 6. – P. 535-542.
147. Feril Jr L.B. Apoptosis induced by the sonomechanical effects of low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line / L.B. Feril Jr., T. Kondo, Z.G. Cui, Y. Tabuchi, Q.L. Zhao, H. Ando, T. Misaki, H. Yoshikawa, S. Umemura // *Cancer Lett.* – 2005. – Vol. 221, № 2. – P. 145-152.
148. Li J.H. In vitro study of haematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic effects on C6 glioma cells / J.H. Li, D.Y. Song, Y.G. Xu, Z. Huang, W. Yue // *Neurol. Sci.* – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 229-235.
149. Liu Q. Sonodynamic effects of protoporphyrin IX disodium salt on isolated sarcoma 180 cells / Q. Liu, X. Wang, P. Wang, H. Qi, K. Zhang, L. Xiao // *Ultrasonics.* – 2006. – Vol. 45, № 1-4. – P. 56-60.
150. Yumita N. Sonodynamic therapy on chemically induced mammary tumor: pharmacokinetics, tissue distribution and sonodynamically induced antitumor effect of gallium–porphyrin complex ATX-70 / N. Yumita, N. Okuyama, K. Sasaki, S. Umemura // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 60, № 6. – P. 891-897.
151. Tsuru H. Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer / H. Tsuru, H. Shibaguchi, M. Kuroki, Y. Yamashita, M. Kuroki // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 53, № 3. – P. 464-472.

152. Yumita N. Sonodynamic antitumour effect of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate on murine solid tumour / N. Yumita, S. Umemura // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 56, № 1. – P. 85-90.
153. Chen Z. Use of a novel sonosensitizer in sonodynamic therapy of U251 glioma cells in vitro / Z. Chen, J. Li, X. Song, Z. Wang, W. Yue // *Exp. Ther. Med.* – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 273-278.
154. Николаев А.Л. Сонодинамическая терапия онкологических заболеваний: комплексное экспериментальное исследование / А.Л. Николаев, А.В. Гопин, В.Е. Божевольнов, Н.В. Андропова, Е.М. Трещалина, Г.К. Герасимова, Е.В. Хорошева, О.Л. Каляя, Г.Н. Ворожцов, Н.В. Дежкунов // Сборник материалов III Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА – 2010». – 2010. – Т. 1. – С. 150-152.
155. Yumita N. Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro / N. Yumita, K. Kawabata, K. Sasaki, S. Umemura // *Ultrason. Sonochem.* – 2002. – Vol. 9, № 5. – P. 259-265.
156. Umemura S. Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells / S. Umemura, N. Yumita, K. Umemura, R. Nishigaki // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 43, № 5. – P. 389-393.
157. Sugita N. Synthesis of amphiphilic derivatives of rose bengal and their tumor accumulation / N. Sugita, K. Kawabata, K. Sasaki, I. Sakata, S. Umemura // *Bioconjug. Chem.* – 2007. – Vol. 18, № 3. – P. 866-873.
158. Saad A.H. Ultrasound Enhanced Drug Toxicity on Chinese Hamster Ovary Cells in Vitro / A.H. Saad, G.M. Hahn // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49, № 21. – P. 5931-5934.
159. Yoshida T. Combination of doxorubicin and low-intensity ultrasound causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human lymphoma U937 cells / T. Yoshida, T. Kondo, R. Ogawa, L.B. Feril Jr, Q. Zhao, A. Watanabe, K. Tsukada // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 61, № 4. – P. 559-567.
160. Liang L. The Combined effects of hematoporphyrin monomethyl ether-SDT and doxorubicin on the proliferation of QBC939 cell lines / L. Liang, S. Xie, L. Jiang, H. Jin, S. Li, J. Liu // *Ultrasound Med. Biol.* – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 146-160.

161. Huang D. Enhanced antitumor activity of ultrasonic irradiation in the presence of new quinolone antibiotics in vitro / D. Huang, K. Okada, C. Komori, E. Itoi, T. Suzuki // *Cancer Sci.* – 2004. – Vol. 95, № 10. – P. 845-849.
162. Nomikou N. Microbubble–sonosensitiser conjugates as therapeutics in sonodynamic therapy / N. Nomikou, C. Fowley, N. Byrne, B. McCaughan, A.P. McHale, J.F. Callan // *Chem. Commun.* – 2012. – Vol. 48. – P. 8332-8334.
163. Schutt E.G. Injectable Microbubbles as Contrast Agents for Diagnostic Ultrasound Imaging: The Key Role of Perfluorochemicals / E.G. Schutt, D.H. Klein, R.M. Mattrey, J.G. Riess // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2003. – Vol. 42, № 28. – P. 3218-3235.
164. Dijkmans P.A. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy / P.A. Dijkmans, L.J.M. Juffermans, R.J.P. Musters, A. van Wamel, F.J. ten Cate, W. van Gilst, C.A. Visser, N. de Jong, O. Kamp // *Eur. J. Echocardiography.* – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 245-256.
165. Ferrara K. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery / K. Ferrara, R. Pollard, M. Borden // *Annual Rev. Biomed. Eng.* – 2007. – Vol. 9. – P. 415-47.
166. Hernot S. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery / S. Hernot, A.L. Klibanov // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60, № 10. – P. 1153-1166.
167. Narang A.S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery / A.S. Narang, S. Varia // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2011. – Vol. 63, № 8. – P. 640-658.
168. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect / V. Torchilin // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2011. – Vol. 63, № 3. – P. 131-135.
169. Stride E. On the destruction of microbubble ultrasound contrast agents / E. Stride, N. Saffari // *Ultrasound Med. Biol.* – 2003. – Vol. 29, № 4. – P. 563-573.
170. Basta G. In vitro modulation of intracellular oxidative stress of endothelial cells by diagnostic cardiac ultrasound / G. Basta, L. Venneri, G. Lazzerini, E. Pasanisi, M. Pianelli, N. Vesentini, S. Del Turco, C. Kusmic, E. Picano // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 58, № 1. – P. 156-161.
171. Poliachik S.L. Effect of high-intensity focused ultrasound on whole Blood with and without microbubble contrast agent / S.L. Poliachik, W.L. Chandler, P.D. Mourad, M.R. Bailey, S. Bloch, R.O. Cleveland, P. Kaczkowski, G. Keilman, T. Porter, L.A. Crum // *Ultrasound Med. Biol.* – 1999. – Vol. 25, № 6. – P. 991-998.

172. Chen W.-S. Inertial cavitation dose and hemolysis produced in vitro with or without optison / W.-S. Chen, A.A. Brayman, T.J. Matula, L.A. Crum // *Ultrasound Med. Biol.* – 2003. – Vol. 29, № 5. P. 725-737.
173. Chen W.-S. The pulse length-dependence of inertial cavitation dose and hemolysis / W.-S. Chen, A.A. Brayman, T.J. Matula, L.A. Crum, M.W. Miller // *Ultrasound Med. Biol.* – 2003. – Vol. 29, № 5. – P. 739-748.
174. Miyoshi N. Ultrasound-induced cytolysis of cancer cells is enhanced in the presence of micron-sized alumina particles / N. Miyoshi, T. Tuziuti, K. Yasui, Ya. Iida, N. Shimizu, P. Riesz, J.Z. Sostaric // *Ultrason. Sonochem.* – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 881-890.
175. Nikolaev A.L. Use of solid-phase inhomogeneities to increase the efficiency of ultrasonic therapy of oncological diseases / A.L. Nikolaev, A.V. Gopin, V.E. Bozhevol'nov, E.M. Treshchalina, N.V. Andronova, I.V. Melikhov // *Acoust. Phys.* – 2009. – V. 55, № 4-5. – P. 575-583.
176. Harada Yo. Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors / Yo. Harada, K. Ogawa, Yu. Irie, H. Endo, L.B. Feril Jr., T. Uemura, K. Tachibana // *J. Controlled Release.* – 2011. – Vol. 149, № 2. – P. 190-195.
177. Osminkina L.A. Silicon nanocrystals as photo- and sono-sensitizers for biomedical applications / L.A. Osminkina, M.B. Gongalsky, A.V. Motuzuk, V.Y. Timoshenko, A.A. Kudryavtsev // *Appl. Phys. B: Lasers and Optics.* – 2011. – Vol. 105, № 3. – P. 665-668.
178. Sazgarnia A. Detection of sonoluminescence signals in a gel phantom in the presence of protoporphyrin IX conjugated to gold nanoparticles / A. Sazgarnia, A. Shanei, H. Eshghi, M. Hassanzadeh-Khayyat, H. Esmaily, M.M. Shanei // *Ultrasonics.* – 2013. – Vol. 53, № 1. – P. 29-35.
179. Гаврилов Л.Р. Фокусированный ультразвук высокой интенсивности в медицине / Л.Р. Гаврилов. – М.: ФАЗИС, 2013. – 656 с.
180. Culjat M.O. A review of tissue substitutes for ultrasound imaging / M.O. Culjat, D. Goldenberg, P. Tewari, R.S. Singh. // *Ultrasound Med. Biol.* – 2010. – Vol. 36, № 6. – P. 861-873.
181. International Commission on Radiation Units and Measurements. Tissue substitutes, phantoms, and computational modelling in medical ultrasound / International Commission on

Radiation Units and Measurements. – Bethesda: International Commission on Radiation Units and Measurements, 1998. – 132 p.

182. Dabbagh A. Tissue-Mimicking Gel Phantoms for Thermal Therapy Studies / A. Dabbagh, B.J.J. Abdullah, Ch. Ramasindarum, N.H. Abu Kasim // *Ultrasonic Imaging*. – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 291-316.

183. Davies R.P. Tissue phantom for learning US-guided vascular punctures / R.P. Davies, J. Kew // *J. Vasc. Interv. Radiol.* – 2001. – Vol. 12, № 2. – P. 267-268.

184. Robinson D.E. Performance tests of ultrasonic echoscopes for medical diagnosis / D.E. Robinson, G. Kossoff // *Radiology*. – 1972. – Vol. 104, № 1. – P. 123-132.

185. Dunn F. Generation and detection of ultra-high frequency sound in liquids / F. Dunn, J.E. Beyer // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1962. – V. 34, № 6. – P. 775-778.

186. Madsen E.L. Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms / E.L. Madsen, J.A. Zagzebski, R.A. Banjavie, R.E. Jutila // *Med. Phys.* – 1978. – Vol. 5. – P. 391-394.

187. Madsen E.L. Liquid or solid ultrasonically tissue-mimicking materials with very low scatter / E.L. Madsen, G.R. Frank, F. Dong // *Ultrasound Med. Biol.* – 1998. – Vol. 24, № 4. – P. 535-542.

188. Zell K. Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging / K. Zell, J.I. Sperl, M.W. Vogel, R. Niessner, C. Haisch // *Phys. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 52, № 2. – P. N475-N484.

189. Kondo T. New tissue mimicking materials for ultrasound phantoms / T. Kondo, M. Kitatuji, H. Kanda // *IEEE 2005 Ultrasonics Symposium*. – 2005. – Vol. 3. – P. 1664-1667.

190. Wojcik G. Nonlinear pulse calculations and data in water and a tissue mimic / G. Wojcik, T. Szabo, J. Mould, L. Carcione, F. Clougherty // *IEEE 1999 Ultrasonics Symposium*. – Vol. 2. – P. 1521-1526.

191. Lafon C. Gel phantom for use in high-intensity focused ultrasound dosimetry / C. Lafon, V. Zderic, M.L. Noble, J.C. Yuen, P.J. Kaczkowski, O.A. Sapozhnikov, F. Chavier, L.A. Crum, Sh. Vaezy // *Ultrasound Med. Biol.* – 2005. – Vol. 31, № 10. – P. 1383-1389.

192. Takegami K. Polyacrylamide gel containing egg white as new model for irradiation experiments using focused ultrasound / K. Takegami, Y. Kaneko, T. Watanabe, T. Maruyama, Y. Matsumoto, H. Nagawa // *Ultrasound Med Biol.* – 2004. – Vol. 30, № 10. – P. 1419-1422.

193. Park S.K. Reusable ultrasonic tissue mimicking hydrogels containing nonionic surface-active agents for visualizing thermal lesions / S.K. Park, S.R. Guntur, K.I. Lee, D.-G. Paeng, M.J. Choi // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 2010. Vol. 57, № 1. – P. 194-202.
194. Dabbagh A. Reusable heat-sensitive phantom for precise estimation of thermal profile in hyperthermia application / A. Dabbagh, B.J.J. Abdullah, N.H. Abu Kasim, C. Ramasindarum // *Int. J. Hyperthermia.* – 2014. – Vol. 30, № 1. – P. 66-74.
195. Дежкунов Н.В. Влияние импульсного модулирования ультразвукового поля на динамику развития кавитационной области и активность кавитации / Н.В. Дежкунов, А.В. Котухов, В.А. Столер, В.А. Колтович, А.Л. Николаев // *Доклады БГУИР.* – 2012. – № 2. – С. 92-98.
196. Тейлор А. Рентгеновская металлография / А. Тейлор – М.: Металлургия, 1965. – 664 с.
197. Nikolaev A.L. Localization of acoustic energy in gel systems on solid-phase inhomogeneities /, A.V. Gopin, D.S. Chicherin, V.E. Bozhevol'nov, I.V. Melikhov // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2008. – Vol. 63, № 3. – P. 167-171.
198. Mabe D.R. A novel investigation of tin-doped ferrihydrite nanoparticles / D.R. Mabe, A.M. Khasanov, J.G. Stevens // *Hyp. Int.* – 2005. – Vol. 165, № 1-4. – P. 209-213.
199. Menil F. Systematic trends of the ^{57}Fe Mössbauer isomer shifts in (FeO_n) and (FeF_n) polyhedra. Evidence of a new correlation between the isomer shift and the inductive effect of the competing bond T-X ($\rightarrow\text{Fe}$) (where X-is O or F and T any element With a formal positive Charge) / F. Menil // *J. Phys. Chem. Solids.* – 1985. – Vol. 46, № 7. – P. 763-789.
200. Drits V.A. Structural model for ferrihydrite / V.A. Drits, B.A. Sakharov, A.L. Salyn, A. Manceau // *Clay Miner.* – 1993. – Vol. 28, № 2. – P. 185-207.
201. Drits V.A. / V.A. Drits, A.I. Gorshkov, B.A. Sakharov, A.L. Salyn, A. Manceau, A.B. Sivtsov // *Lith. Miner. Res.* – 1995. – Vol. 1. – P. 68.
202. Столяр С.В. Мессбауэровские исследования бактериального ферригидрита / С.В. Столяр, О.А. Баюков, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладынина, Р.С. Исхаков, П.П. Пустошилов // *Неорг. матер.* – 2007. – Т. 43, № 6. – С. 725-728.
203. Kukkadapu R.K. Transformation of 2-line ferrihydrite to 6-line ferrihydrite under oxic and anoxic conditions / R.K. Kukkadapu, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, S.C. Smith, A.C. Dohnalkova, C.K. Russel // *Am. Mineral.* – 2003. – Vol. 88, № 11-12. – P. 1903-1914.

204. Perfil'ev Y.D. Mechanism of crystal modification of ferrihydrite by polymer hydrogels according to data of mössbauer spectroscopy / Y.D. Perfil'ev, A.L. Nikolaev, A.V. Gopin, L.A. Kulikov // *Russ. J. Phys. Chem. A.* – 2014. – Vol. 88, № 4. – P. 691-696.
205. Fry W.J. Determination of absolute sound levels and acoustic absorption by the thermocouple probes – theory / W.J. Fry, R.B. Fry // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1954. – Vol. 26, № 3. – P. 294-310.
206. Nikolaev A.L. Sonodynamic therapy of cancer. Comprehensive experimental study / A.L. Nikolaev, A.V. Gopin, V.E. Bozhevov, S.E. Mazina, A.V. Severin, V.N. Rudin // *Russ. Chem. Bull.* – 2014 – Vol. 63, № 5. – P. 1036-1047.
207. Николаев А.Л. Твердофазная соносенсибилизация в сонодинамической терапии онкологических заболеваний / А.Л. Николаев, А.В. Гопин, И.И. Конопацкая, М.А. Миронов, П.А. Пятаков, Н.В. Андропова, Е.М. Трещалина, Н.В. Дежжунов. // *Учен. Зап. Физ. фак-та Моск. ун-та.* – 2014. – № 5. – с. 145344-1-145344-13.
208. Миронов М.А. Параметрическое возбуждение сдвиговых волн в мягких упругих средах / М.А. Миронов, П.А. Пятаков, И.И. Конопацкая, Г.Т. Клемент, Н.И. Выходцева // *Акуст. журн.* – 2009. – Т. 55, № 4-5. – С. 557-564.
209. Hoffmann C. Enzyme-catalysed synthesis of calcium phosphates / C. Hoffmann, C. Zollfrank, G. Ziegler // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* – 2008. – Vol. 19. – P. 907-915.
210. Yamauchi K. Preparation of collagen/calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization / K. Yamauchi, T. Goda, N. Takeuchi, H. Einaga, T. Tanabe // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 5481-5489.
211. Tomomatsu O. A film of collagen/calcium phosphate composite prepared by enzymatic mineralization in an aqueous phase / O. Tomomatsu, A. Tachibana, K. Yamauchi, T. Tanabe // *J. Ceram. Soc. Jap.* – 2008. – Vol. 116, № 1349. – P. 10-13.
212. Douglas T.E.L. Enzymatically induced mineralization of platelet-rich fibrin / T.E.L. Douglas, V. Gassling, H.A. Declercq, N. Purcz, E. Pamula, H.J. Haugen, S. Chasan, E.L.W. de Mulder, J.A. Jansen, S.C.G. Leeuwenburgh // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2012. – Vol. 100A, № 5. – P. 1335-1346.
213. Gassling V. Magnesium-enhanced enzymatically mineralized platelet-rich fibrin for bone regeneration applications / V. Gassling, T.E.L. Douglas, N. Purcz, D. Schaubroeck,

- L. Balcaen, V. Bliznuk, H.A. Declercq, F. Vanhaecke, P. Dubruel // *Biomed. Mater.* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 1-10.
214. Xie M. Biocomposites prepared by alkaline phosphatase mediated mineralization of alginate microbeads / M. Xie, M.Ø. Olderøy, Zh. Zhang, J.-P. Andreassen, B.L. Strand, P. Sikorski // *RSC Adv.* – 2012. – Vol. 2. – P. 1457-1465.
215. Douglas T.E.L. Enzymatic Mineralization of Hydrogels for Bone Tissue Engineering by Incorporation of Alkaline Phosphatase / T.E.L. Douglas, P.B. Messersmith, S. Chasan, A.G. Mikos, E.L.W. de Mulder, G. Dickson, D. Schaubroeck, L. Balcaen, F. Vanhaecke, P. Dubruel, J.A. Jansen, S.C.G. Leeuwenburgh // *Macromol. Biosci.* – 2012. – Vol. 12. – P. 1077-1089.
216. Douglas T.E.L. Composites of polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel and calcium and magnesium phosphate formed by enzymatic functionalization / T.E.L. Douglas, A. Piegat, H.A. Declercq, D. Schaubroeck, L. Balcaen, V. Bliznuk, B. De Meyer, F. Vanhaecke, R. Cornelissen, M. El Fray, P. Dubruel // *Mater. Lett.* – 2014. – Vol. 137, № 15. – P. 62-67.
217. Николаев А.Л. Ферментативный синтез наногидроксиапатита в водных и полимерных средах / А.Л. Николаев, А.В. Гопин, А.В. Северин, В.К. Долгова // Сборник тезисов докладов конференции «Структура и динамика молекулярных систем». – 2016. – С. 116.
218. Powder Diffraction File. Swarthmore: Joint Committee on Powder Diffraction Standards. Card № 09-0422.
219. Гопин А.В. Ферментативная минерализация гидрогелей фосфатами кальция иммобилизованной щелочной фосфатазой / А.В. Гопин, А.Л. Николаев // Тезисы докладов IX Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы будущего». – 2016. – С. 183.
220. Mazina S.E. The sonosensitizing effect of teraphthal in bacterial media / S.E. Mazina, A.V. Gopin, A.L. Nikolaev, P.I. Talberg // *Biophys.* – 2015. – Vol. 60, № 3. – P. 425-428.
221. Трещалина Е.М. Экспериментальные подходы к использованию наночастиц в диагностике и терапии опухолей мягких тканей / Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова, А.Л. Николаев, А.В. Гопин, В.Е. Божевольнов, Б.Ю. Бохан, Г.А. Меерович,

- В.Б. Лощенов, С.Ш. Каршиева, Б.И. Долгушин // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 1. – С. 60-66.
222. Aoki H. An in vivo study on the reaction of hydroxyapatite-sol injected into blood / H. Aoki, H. Aoki, T. Kutsuno, W. Li, M. Niwa // J. Mater. Sci.: Mater. Med. – 2000. – Vol. 11, № 2. – P. 67-72.
223. Laschke M.W. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: *In vivo* analysis of biocompatibility and vascularization / M.W. Laschke, K. Witt, T. Pohlemann, M.D. Menger // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. – 2007. – Vol. 82B, № 2. – P. 494-505.
224. Nikolaev A.L. Combined method of ultrasound therapy of oncological diseases / A.L. Nikolaev, A.V. Gopin, V.E. Bozhevol'nov, H.M. Treshalina, N.V. Andronova, I.V. Melikhov, D.V. Filonenko, S.E. Mazina, G.K. Gerasimova, E.V. Khorosheva, I.N. Mikhailova, L.V. Demidov, B.Y. Bokhyan, B.Y. Kogan, O.L. Kaliya // Russ. J. Gen. Chem. – 2015. – Vol. 85, № 1. – P. 302-320.
225. Мелихов И.В. Диффузия в пористой среде с матрицей, претерпевающей фазовый переход / И.В. Мелихов // Журн. Физ. Хим. – 1990. – Т. 64, №4. – С. 1047-1053.
226. Мелихов И.В. Кинетика кристаллизации и сопряженного тепломассопереноса в гелевой среде / И.В. Мелихов, А.Я. Горбачевский, А.В. Гопин, А.Л. Николаев // Мат. Мод. – 2005. – Т. 17, № 6. – С. 122-128.
227. Melikhov I.V. A hierarchical model of crystallization in polymeric gels and porous solids / I.V. Melikhov, A.L. Nikolaev, A.V. Gopin, V.E. Bozhevol'nov // Russ. J. Phys. Chem. A. – 2009. – Vol. 83, № 1. – P. 71-76.
228. Самарский А.А. Теория разностных схем / А.А. Самарский. – М.: Наука, 1989. – 616 с.
229. Дальмон Б. Кинетика гетерогенных реакций / Б. Дальмон. – М.: Мир, 1972. – 472 с.
230. Стрикленд-Констэбл Р.Ф. Кинетика и механизм кристаллизации / Р.Ф. Стрикленд-Констэбл. – Л.: Недра, 1971. – 412 с.

Благодарности

Автор благодарит коллектив лаборатории гетерогенных процессов – Мелихова И.В., Божевольнова В.Е., Бердоносова С.С., Рудина В.Н., Северина А.В., Мазину С.Е., Козловскую Э.Д. – за ценные консультации и всестороннее обсуждение материала. Искреннюю благодарность автор выражает своему руководителю Николаеву Александру Львовичу. Автор признателен сотрудникам отдела медицинской акустики и биоакустики АКИН им. Н.Н.Андреева Миронову М.А., Пятакову П.А., Конопацкой И.И. и сотруднику лаборатории ультразвуковых технологий и оборудования БГУИР Дежкунову Н.В. за помощь в проведении акустических измерений, сотрудникам лаборатории ядерно-химических методов кафедры радиохимии Перфильеву Ю.Д. и Куликову Л.А. за обсуждение результатов мессбауэровской спектроскопии, сотрудникам лаборатории комбинированной терапии опухолей института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН Андроновой Н.В. и Трещалиной Е.М. за проведение экспериментов на животных, сотруднице лаборатории гетерогенных процессов кафедры радиохимии Мaziной С.Е. за помощь в подготовке образцов для электронно-микроскопических исследований и в экспериментах на бактериальных системах, сотрудника общефакультетской лаборатории электронной микроскопии Богданова А.Г. за техническую помощь и обсуждение результатов электронной микроскопии, сотрудников лаборатории физико-химического анализа кафедры общей химии Портного В.К. и Леонова А.В. за обсуждение результатов рентгенофазового анализа.