

РАДИАЦИОННАЯ ХИМИЯ

УДК 515.15

ПРОБЛЕМЫ ГОМО-ГЕТЕРОГЕННОЙ КОНКУРЕНТНОЙ КИНЕТИКИ В ДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМАХ НА ПРИМЕРЕ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Л.Т.Бугаенко, В.И.Трофимов*, В.М.Бяков**

(лаборатория радиационной химии)

Рассмотрены кинетические задачи, возникающие при радиолизе разбавленных водных растворов бислойных везикул, на примере лецитиновых липосом. Приведены в однорадикальном приближении уравнения для расчета потока радикалов через мембрану. Показано, что активные радикалы (ОН, Н) практически полностью захватываются мембраной, тогда как неактивные (НО₂) практически полностью могут проникать во внутривезикулярный объем.

В практике и научных исследованиях очень широко используются разнообразные дисперсные системы, находящиеся под различными энергетическими воздействиями (ионизирующие излучения, свет, лазерное излучение, ультразвук, электрические поля и т.д.). К таким системам относятся каталитические и флотационные среды, космозоль и антропогенные золи, системы, имеющие место при механическом дроблении, лекарственные препараты и многие другие. В дисперсных системах при энергетическом воздействии образуется, как правило, несколько типов активных частиц с разной реакционной способностью. Реакции, в которых участвуют эти частицы, протекают как в объеме растворителя (газа или самой дисперсной фазы), так и на поверхности дисперсных частиц. Поэтому кинетическая схема, описывающая эти процессы, включает гомогенные и гетерогенные реакции, конкурирующие между собой, что в значительной степени и определяет изменение свойств системы после воздействия. Пока что механизмы такой конкурентной кинетики проработаны слабо, хотя знание их необходимо для управления процессом.

В данной работе мы попытались провести предварительную априорную оценку возможного соотношения гомогенных и гетерогенных реакций для случая радиационной стерилизации инкапсулированных лекарственных препаратов. В последние годы в практической медицине уже начала находить применение идея использования лекарственных препаратов, в которых фармакологическое активное соединение защищено оболочкой из физиологически более нейтрального вещества [1, 2]. Во-первых, в такой "рубашке" лекарство доставляется более избирательно в нужный для лечения орган (при правильном подборе пары "защита - активное вещество"), что существенно увеличивает эффективность его действия. Во-вторых, лекарство меньше подвержено биохимической деструкции в процессе доставки в целевой орган. Размеры таких капсул лежат обычно в диапазоне от сотни до тысячи нанометров и под-

бираются такими, чтобы капсулы могли попасть в самые тонкие кровеносные сосуды организма и, с другой стороны, содержали бы достаточно большое количество лекарственного вещества. Лекарственные соединения в такой капсуле могут быть самыми разнообразными по своей природе и назначению (антибиотики, белки, витамины, сульфамидные препараты, нуклеиновые кислоты и т.д.).

Одним из наиболее широко используемых материалов для создания оболочек капсул (мембран) являются фосфолипиды. Дисперсные системы на этой основе получили название липосом. Технология получения липосомальных форм ряда лекарственных препаратов в настоящее время достаточно хорошо разработана, но во всей цепи технологических процессов есть по крайней мере один этап, еще не нашедший удовлетворительного технического решения, – этап стерилизации, необходимый потому, что липиды являются хорошей питательной средой для развития многих видов микроорганизмов. Термическая стерилизация отпадает, ибо она разрушает липосомы. Любая "холодная" стерилизация при комнатной температуре сопряжена с использованием энергетических воздействий. Сейчас наиболее распространена радиационная стерилизация. К сожалению, образующиеся при облучении активные частицы не только инактивируют микроорганизмы в стерилизуемом препарате, но и неизбежно воздействуют также на липидную оболочку мембран и находящееся в капсулах лекарственное вещество. Изучение роли этих процессов необходимо для выбора условий стерилизации, при которых наименее нарушаются свойства лекарственного препарата. Нет сомнений также, что такие данные необходимы и для понимания механизмов процессов модификации биологически активных соединений в живом организме. Чтобы ограничить нашу задачу, мы выбрали для первичной оценки липосомы, изготовленные из яичного лецитина (*L*- α -лецитин), находящиеся в водной дисперсной фазе (концентрация 0,1 – 10 г/л). В качестве энергетического агента мы выбрали γ -излучение.

* Институт биотехнологии.

** Институт теоретической и экспериментальной физики.

Лекарство на данном этапе мы не рассматриваем, но предполагаем, что оно водорастворимое и находится только внутри липосомы (по способу приготовления).

Ионизирующее излучение в водной среде создает атомы водорода, гидратированные электроны и радикалы гидроксила, а если в системе присутствует кислород, то вместо атомов водорода и гидратированных электронов возникают радикалы пергидроксила (pH 4).

В рассматриваемой системе возникают по крайней мере четыре кинетических задачи (мы не будем учитывать возникновение радикалов в водном объеме внутри везикул, поскольку их вклад мал).

1. Определение доли радикалов, возникших в дисперсной фазе и достигших поверхности липосомы (поток радикалов на мицеллу).

2. Выявление реакций радикалов, протекающих на поверхности мембраны и в ее объеме.

3. Определение доли радикалов, проникших через мембрану во внутреннюю часть везикул (доля радикалов, прореагировавших с мембраной).

4. Выявление реакций, протекающих внутри везикулы.

Первая и третья задачи являются формально-кинетическими и могут быть рассмотрены априори. Вторая и четвертая требуют экспериментального исследования, которое нами проводится.

Для определения потока радикалов I на одиночную мицеллу воспользуемся уравнением, выведенным для разбавленных коллоидных растворов в рамках однорадикальной модели [3]. Оно имеет вид

$$I = 4\pi RD C_\infty \left(1 + R \sqrt{\frac{k_s C_s + 2k C_\infty}{D}} \right) \quad (1)$$

где k_s – константа скорости захвата радикалов присутствующим в растворе акцептором; C_s – концентрация акцеп-

тора; k – константа скорости рекомбинации радикалов; C_∞ – стационарная концентрация радикалов, рассчитываемая по уравнению

$$C_\infty = \frac{GP/k}{\frac{k_s C_s}{2k} + \sqrt{\left(\frac{k_s C_s}{2k}\right)^2 + \frac{GP}{k}}}$$

где G – радиационно-химический выход радикалов; P – мощность дозы; D – коэффициент диффузии радикалов; R – радиус мицеллы (уравнение (1) было апробировано на коллоидных растворах неорганических соединений). Мы рассчитали долю радикалов, достигших везикулы при мощности дозы 10^{16} эВ · см⁻³ · с⁻¹ и различном содержании дополнительного акцептора радикалов в растворе (химическую природу акцептора мы не задавали). Предполагалось, что атомы водорода, радикалы гидроксила и пергидроксила взаимодействуют с мембраной везикул и могут проникать через нее, а гидратированный электрон только взаимодействует с поверхностными эфирными связями лецитина, но не может проникать внутрь мембраны. Константы скорости рекомбинации всех перечисленных выше радикалов примерно одинаковы (различаются не более чем в шесть раз [4]), поэтому мы учитывали единственную реакцию рекомбинации с константой скорости $2 \cdot 10^{10}$ л · моль⁻¹ · с⁻¹. Предполагалось, что все радикалы, достигшие везикулы, либо реагируют с ней, либо проникают вглубь. Коэффициент диффузии радикалов брали средний по данным работы [5].

Результаты расчета доли радикалов, достигших везикулы для липосомальных растворов различной концентрации, в зависимости от кинетической эффективности дополнительного акцептора представлены на рис. 1. Как видно, при низких значениях $k_s C_s$ все радикалы достигают везикул и захватываются ими. Повышение концентрации акцептора приводит к снижению доли радикалов, достигших везикул, причем чем выше концентрация везикул, тем большая концентрация акцептора требуется для снижения доли захваченных радикалов (рис. 1, кривые 1 и 3). При этом радиус везикулы влияет только в области не очень высоких концентраций акцептора (рис. 1, кривые 3 – 5). Кривые такого типа позволяют для различных условий облучения рассчитать долю радикалов, захваченных везикулами. Радикалы, достигшие поверхности везикул, растворяются в ней и диффундируют через нее, реагируя в то же время с молекулами мембраны. Было получено уравнение, позволяющее оценить прошедший через мембрану поток I_2 при известном потоке радикалов из объема раствора на мембрану I_1 в предположении плоской, однородной по свойствам мембраны (поскольку толщина мембраны существенно меньше размеров везикулы, это предположение допустимо).

$$\frac{I_2}{I_1} = \frac{e^{-2aL}}{(0,5 + \lambda/3L) + (0,5 + \lambda 3L) \cdot e^{-2a/L}} \quad (2)$$

где a – толщина мембраны, $\lambda = 3D/v$ – длина рассеяния ра-

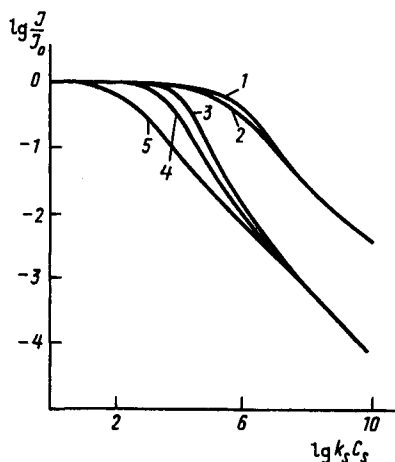


Рис. 1. Зависимость доли радикалов, достигших поверхности везикулы, от эффективности акцептора. Радиус везикул, см: 1, 3 – $5 \cdot 10^{-6}$, 4 – $1 \cdot 10^{-5}$, 2, 5 – $1 \cdot 10^{-4}$. Концентрация лецитина, %: 3, 4, 5 – 0,1; 1, 2 – 5. Коэффициент диффузии радикалов $2 \cdot 10^{-5}$ см² · с⁻¹

дикала на молекулах среды, D – коэффициент диффузии радикала, v – его скорость, $L^2 = D/k_s C_s$, k_s – константа скорости реакции радикала с акцептором, C_s – концентрация акцептора. В качестве акцептора выступает вещество мембраны.

Для того чтобы произвести оценку проходящего через мембрану потока, необходимо знать реакционную способность вещества, ее составляющего, по отношению к радикальным продуктам радиолитического разложения воды. К сожалению, для использованного нами L - α -лецитина известна только константа скорости реакции его взаимодействия с радикалом OH ($k_{\text{OH}} = 5 \cdot 10^8$) [6]. Для получения значений констант скорости реакции с атомами H и радикалами HO_2 можно в первом приближении оценить реакционную способность лецитина по реакционной способности составляющих его химических групп. В состав лецитина входят две сложноэфирные группы, одна простая эфирная группа, углеводородные цепочки ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}$ и $\text{C}_{17}\text{H}_{33}$), одна двойная связь и аминогруппа. Используя значения констант скорости реакций родственных соединений (углеводороды, простые и сложные эфиры, амины) [4, 7], мы оценили реакционную способность L - α -лецитина. Значения констант скорости представлены в таблице. Коэффициенты диффузии радикалов были оценены по формуле Стокса. В качестве базового значения был использован коэффициент диффузии воды в гексадекане ($D_{\text{H}_2\text{O}} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ [7]) и сделано предположение, что при комнатной температуре в тонких пленках мембраны (толщина мембраны 4 нм [8]) лецитин имеет такие же характеристики, как и в расплаве. Найденные значения коэффициентов диффузии приведены в таблице. При выбранных значениях констант скорости реакций и коэффициентов диффузии радикалов отношение $\lambda/3D$ пренебрежимо мало по сравнению с 0,5 в выражении (2), поэтому

$$I_2/I_1 = 1/(0,5 + 0,5 \cdot e^{2a/L}). \quad (3)$$

На рис. 2 представлена зависимость прошедшего потока от реакционной способности вещества мембраны при различной ее толщине. Как видно, чем выше реакционная способность мембраны и больше ее толщина, тем меньшая доля радикалов проникает через мембрану во внутренний объем липосомы.

В таблице приведены значения потоков, проходящих через мембрану, для L - α -лецитина. Для гидратированного электрона расчет не производили, так как он не может диффундировать через лецитиновую мембрану, а может только взаимодействовать с ее поверхностью. Как следует из таблицы, радикалы гидроксила практически полностью захватываются мембраной, атомы водорода частично проникают через мембрану, а радикалы пергидроксила вследствие своей низкой реакционной способности по отношению к лецитину полностью проникают через мембрану.

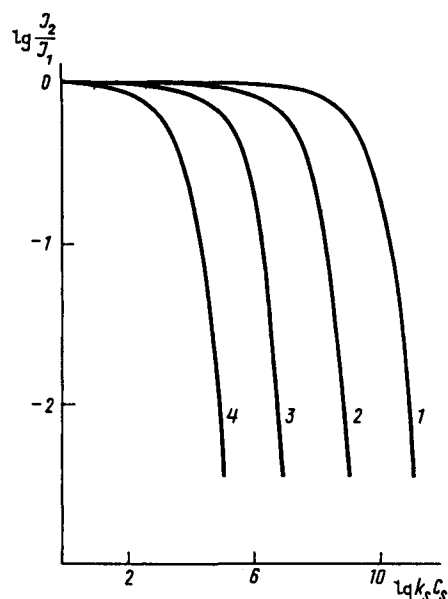


Рис. 2. Зависимость доли прошедших через мембрану радикалов от эффективности материала мембраны в захвате радикалов при толщине мембраны, нм: 1 – 4, 2 – 40, 3 – 400, 4 – 4000

Оценка потока радикалов через мембрану липосомы на основе L - α -лецитина (толщина мембраны 4 нм)

Радикал	Константа скорости, л · моль ⁻¹ · с ⁻¹	Коэффициент диффузии, см ² · с ⁻¹	I_2/I_1
H	$3 \cdot 10^8$	$7,6 \cdot 10^{-5}$	0,27
OH	$5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	0,07
HO ₂	$3 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	0,99

Следовательно, в присутствии кислорода разрушение мембраны можно отнести целиком к воздействию радикалов гидроксила. Для использованного нами в расчетах 0,5%-го раствора лецитина с диаметром липосом 50 нм можно оценить степень разрушения молекул лецитина, принимая, что в дисперсной фазе отсутствует дополнительный акцептор радикалов, т.е. для случая, когда все радиолитические радикалы достигают поверхности везикул. Типичная "стерилизующая доза", принятая почти повсеместно, составляет 25 кГр. Такая доза генерирует в 1 л суспензии $9 \cdot 10^{21}$ радикалов, так что на одну липосому приходится (в стенке мембраны находится $9,4 \cdot 10^4$ молекул лецитина) $2,8 \cdot 10^5$ радикалов, а на одну молекулу лецитина – 3 радикала. В присутствии кислорода гидратированные электроны переходят в радикалы пергидроксила и количество разрушающих радикалов уменьшается вдвое. Но все равно 1,5 радикала на молекулу лецитина слишком большая величина, поэтому необходимо вводить в дисперсную фазу защитный акцептор. Первые единичные данные о радиационных процессах в липосомах, опубликованные в литературе [9, 10], еще не позволяют провести количес-

твенное сравнение сделанных оценок с экспериментом, но в целом не противоречат проведенной оценке. Это дает основание применять изложенный выше подход для предварительной оценки роли радикальных процессов и при других энергетических воздействиях на дисперсии

липосом, при которых основное воздействие на липосомы происходит за счет радикалов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 95-03-09162).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The market for liposome drug delivery systems. N.Y., 1992.
2. Couvreur P., Vauthrier J. // *Controlled Release*. 1991. 17. P. 187.
3. Бяков В.М., Бугаенко Л.Т., Бахтадзе Г. // *Химия высоких энергий*. 1993. 23. С.19.
4. Пикаев А.К., Кабакчи С.А. Реакционная способность первичных продуктов радиолиза воды. М., 1982.
5. Бендерский В.А., Кривенко А.Г., Рукин А.Н. // *Химия высоких энергий*. 1980. 14. С.406.
6. Barber D.J.W., Thomas J.K. // *Radiat. Res*. 1978. 74. P.51.
7. Bielski B., Cabelli C., Arudy A., Ross A. // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 1985. 14. P. 1041.
8. Рид Р., Праусинг Дж., Шервуд Т. Свойства газов и жидкостей. Л., 1982.
9. *Liposome Technology*. V.1. N.Y., P. 268.
10. Каланин П.В., Соболева Н.Н., Трофимов В.И. // *Химико-фарм. ж.* 1988. № 4. С. 479.

Поступила в редакцию 11.01.96