

© Коллектив авторов, 2013

С. Н. Корякин¹, П. Л. Иванов², В. Н. Хабаров³, В. А. Ядровская¹, Е. В. Исаева¹,
Е. Е. Бекетов¹, А. Н. Зеленецкий², С. А. Успенский³, М. А. Селянин³,
С. Е. Ульяновко¹

СИНТЕЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ НЕЙТРОН-ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ ПОЛИХЕЛАТОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И БОРА-10

¹ ФГБУ Медицинский радиологический научный центр Минздравсоцразвития России, Обнинск, Россия;

² ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н. С. Ениколопова РАН, Москва, Россия;

³ АНО "Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС", Москва, Россия

Разработана технология твердофазной модификации гиалуроновой кислоты и декагидробората натрия на наковальне Бриджмена. Деформирование проводили при давлении 1 ГПа и угле поворота наковален 500°. Исследовали структуру полученного комплекса. С помощью Раман- и ИК-Фурье-спектроскопии показано, что гиалуроновая кислота и полибораты могут образовывать сетку циклических полихелатных комплексов, в которых ГК выступает в качестве полидендатного лиганда. Изучено распределение борсодержащего соединения на основе гиалуроновой кислоты по органам и тканям мышей с меланомой В-16 после однократного внутриопухолевого введения. Максимальное содержание бора в опухоли наблюдается через 15 мин после введения, но уже через 1 ч уменьшается в 2 раза, а к 3 ч снижается более чем в 5 раз. Наиболее благоприятное время для проведения сеанса нейтрон-захватной терапии — 30 мин с момента введения препарата, когда концентрация бора в опухоли больше 30 мкг/г и превышает содержание в окружающих тканях. Причем по отношению к мышце и крови градиент достигает 3 и 5 соответственно. На основании первого этапа исследований можно говорить о перспективности использования данного нетоксичного соединения для задач нейтрон-захватной терапии.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота; бор-10; наковальня Бриджмена; биораспределение; меланома В-16; нейтрон-захватная терапия.

Адресная доставка и удержание в опухоли препаратов для таргетной, нейтрон-захватной или фотодинамической терапии являются одними из наиболее актуальных проблем онкологии. Синтезированы сотни таких соединений, большая часть которых не обеспечивает желаемый терапевтический эффект. Одним из таких направлений исследований является синтез соединений на основе гиалуроновой кислоты. Молекула гиалуроновой кислоты (ГК) представляет собой анионный, линейный гетерополисахарид, построенный из регулярно чередующихся остатков D-глюкуроновой

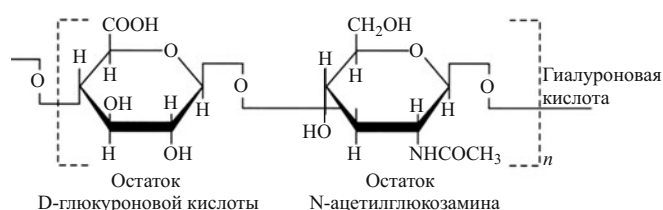


Рис. 1. Структурная формула дисахаридного звена молекулы гиалуроновой кислоты.

кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (рис. 1). ГК присутствует практически во всех тканях организма позвоночных, где играет роль в регуляции клеточной активности: ускоряет или, наоборот, замедляет деление клеток, их миграцию, участвует в реорганизации структур хроматина и переключении генов, участвует в адаптации клеток к физическим и химическим воздействиям, в процессах оплодотворения, эмбриогенеза, ангиогенеза, воспаления, регенерации, опухолевого роста [1]. Российскими учеными разработана технология твердофазной модификации ГК различными низкомолекулярными биорегуляторами (аминокислотами, витаминами, олигопептидами) [2]. На основе данной технологии создан целый ряд препаратов для инъекционной косметологии [3, 4]. Для существенного расширения возможностей использования ГК в медицине представляет интерес создание новых комплексов ГК, в состав которых входят различные химические элементы, например, бор, катионы металлов (цинка, серебра, золота и др.).

Цель настоящей работы заключалась в синтезе соединения на основе ГК и стабильного изотопа бо-

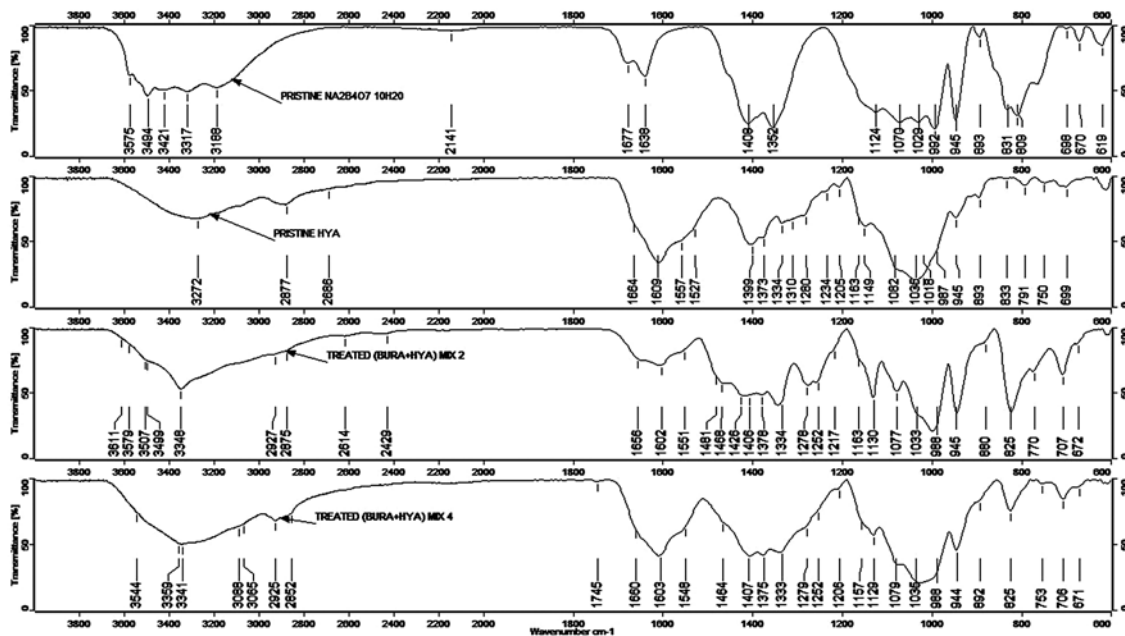


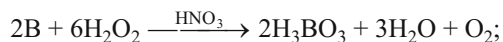
Рис. 2. Сравнение ИК-спектров отдельных исходных компонентов и продуктов обработки смесей ГК + бура, где сверху вниз ИК-спектры: буры, ГК и 2 продукта, полученных после деформирования при разных соотношениях (моль-звено ГК/моль буры 1/4 и 1/1 соответственно).

ра-10, исследовании его распределения по органам и тканям животных-опухоленосителей для оценки целесообразности использования полученного препарата в качестве агента для нейтрон-захватной терапии (НЗТ) онкологических заболеваний.

Экспериментальная химическая часть

В качестве исходного вещества использовали гиалуроновую кислоту, $M_n = 1000$ кДа, $W_T = 11\%$, ИК-фурье-спектр: ν_{max} , cm^{-1} : 1620 – 1650, 1566 и 1415 – 1420 — полосы деформационных колебаний амида (Амид-I, Амид-II и Амид-III соответственно); 1710 – 1720 — полосы поглощения карбоксильных групп; 1560 — полосы асимметричных валентных колебаний $COO(-)$; 1075 – 1085 — полоса валентных колебаний C-O пиранозного цикла; 2900 – 3750 — область поглощения валентных колебаний связей X-H (X=O, N, C). Бура ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) для НЗТ получена из обогащенного ^{10}B изотопа в две стадии:

а) получение моногидрата борной кислоты с выходом по бору 92 – 98 % [5, 6]:



б) нейтрализация моногидрата борной кислоты:



Смешение в твердом состоянии на наковальне Бриджмена. ГК и буру в соотношении моль 4/1, либо 1/1 перетирали в агатовой ступке и помещали на наковальню Бриджмена [7]. Деформирование проводили при давлении 1 ГПа и угле поворота наковален 500° . Полученный продукт анализировали без дополнительной очистки.

ИК-спектры Фурье снимали на приборах VERTEX-70 (фирмы Bruker, Германия) и FTIR-1720 (1725XFTIR фирмы Perkin-Elmer, США). В зависимости от физического состояния анализируемого образца использовали режимы записи спектров на пропускание, НПВО (неполного внутреннего отражения) или диффузного отражения-пропускания (DRAFT). Реологические измерения растворов комплексов ГК и боратов проводили на вискозиметре Уббелодде с диаметром капилляра $0,54$ мм при $25 \pm 0,2$ °С.

Экспериментальная биологическая часть

В экспериментах использовали мышей-самцов линий F1 массой 20 – 22 г. В правую заднюю лапку животных подкожно имплантировали суспензию клеток мышинной меланомы В-16 в количестве $\approx 10^6$ клеток (в 0,2 мл). Борсодержащее соединение “Боргиал” с концентрацией 3000 мкг бора в 1 мл вводили мышам внутриопухолево в объеме 0,1 мл на 12 день после перевивки (объем опухоли $\approx 0,8 - 1,2$ cm^3). Животные были разделены на 7 групп по 7 мышей. Через 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 9, 12 и 24 ч после введения у декапитированных под наркозом животных отбирали образцы опухоли, крови, кожи, мышцы, печени, почек, селезенки, легких для последующего анализа содержания бора.

На каждую точку в качестве исследуемых и контрольных групп использовали не менее 6 животных. Рассчитывали несмещенную оценку среднего значения (\bar{x}) и несмещенную оценку стандартного отклонения среднего значения ($S_{\bar{x}}$).

Подготовка образцов для анализа содержания бора. Навески биологических образцов количественно переносили с помощью дистиллированной воды в

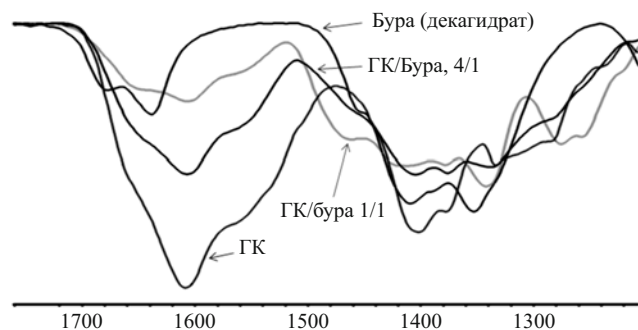


Рис. 3. Область карбониллов и амидных полос (весь спектр нормирован по СН).

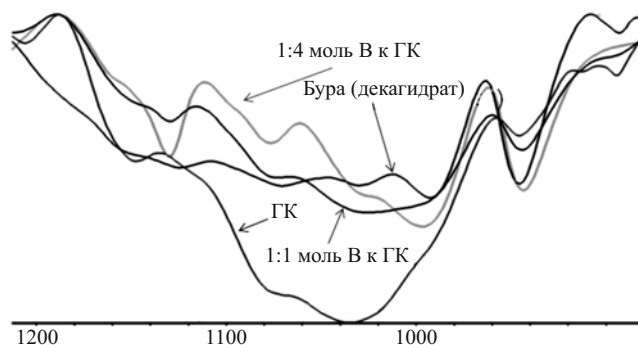


Рис. 4. Область колебаний С-О-содержащих связей (нормировка по СН).

кварцевую посуду (тигли, стаканы) и высушивали в сушильном шкафу при температуре 85 – 105 °С до полного испарения влаги. К высушенным в сушильном шкафу анализируемым образцам добавляли 25 мг оксида магния для снижения потерь бора, по каплям добавляли воду, перемешивали и упаривали на плитке досуха. Разложение биологических проб для определения бора проводили сухим озолением в муфельной печи марки “ЭКПС-50” (Россия) в 2 этапа. Сначала пробы нагревали до 200 °С, далее шел ступенчатый нагрев по 50 °С с 15 мин прогревом на фиксированной температуре до достижения 500 °С. При этой температуре выдерживали 5 – 6 ч до получения белой или бело-серой золы. В кварцевую посуду с озолёнными пробами приливали 5 мл 1 Н раствора серной кислоты, перемешивали (2 – 3 мин) и оставляли на 10 мин. Содержимое стаканов переносили в центрифужные пробирки, промывая стаканы дистиллированной водой, и доводили объем пробирки дистиллированной водой до 10 мл. Определение содержания бора в образцах проводили с использованием оптического эмиссионного метода с индуктивно связанной плазмой в качестве атомизатора на приборе ICP-OES (Varian, Австралия).

Результаты и их обсуждение

Интенсивность полос в ИК- и КР-спектрах отвечает мольному содержанию соответствующих связей в образце. Чтобы сравнить интенсивность полос поглощения в спектрах разных образцов, одну из полос каждого из спектров, которая минимально изменяется в различных условиях эксперимента, принимают за

внутренний стандарт. Тогда все остальные полосы, пересчитанные по отношению к этому стандарту, можно сравнить между собой по интенсивности. Изменение интенсивности полос и появление новых указывает на протекание реакций соответствующих им групп, вклад которых оценён количественно. Другая характеристика реакционного и физического взаимодействия – это сдвиг полос по отношению к их положению в исходных веществах. Сдвиг полос означает или изменение структуры соседних с анализируемой группой участков молекулы или же перераспределение связей, в которых эта группа участвует. Часто возникает новое качество взаимодействия, которое выражается в появлении соседнего пика или плеча на пике исследуемой группы.

На рис. 2 видны отличия спектров продуктов деформирования от спектров исходных веществ. Для анализа этих изменений и определения характера взаимодействия реагентов спектры разбиты на области, соответствующие характеристическому (наиболее четко интерпретируемому) поглощению групп ГК и боратов. Это области 3650 – 2750 см⁻¹, 1750 – 1200 см⁻¹ (с двумя вариантами нормировки по С-Н поглощению в области валентных и деформационных колебаний этих групп), 1200 – 880 см⁻¹, и 900 – 580 см⁻¹ (рис. 3).

Пик поглощения при 1481 см⁻¹ — взаимодействие бората с ГК за счет карбоксильных и карбинольных групп в качестве доноров протонов с О-атомами В-О-В-связей и борат-анионами В-О(-) : О-Н...О, О-Н...(-)О, и одновременно за счет электронодонорных свойств свободных пар электронов гетероатомов

Распределение борсодержащего соединения “Боргиал” в печени, почках, селезенке и легких мышей с меланомой В-16 на разные сроки после его внутриопухолевого введения

Орган	Концентрация бора в ткани, мкг бора на 1 г ткани ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)				
	1 ч	3 ч	6 ч	9 ч	24 ч
Печень	11,9 ± 1,0	7,5 ± 0,7	5,7 ± 1,2	5,8 ± 1,0	4,1 ± 0,7
Почки	11,6 ± 1,5	9,2 ± 1,4	7,2 ± 0,7	5,6 ± 0,6	2,7 ± 0,5
Селезенка*	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Легкие*	2,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,4

* Содержание бора во всем органе.

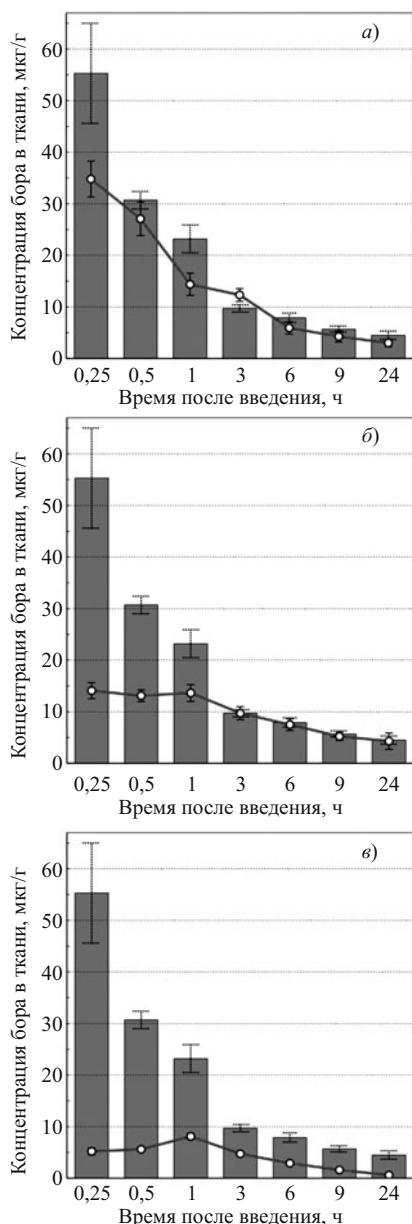


Рис. 5. Сравнение концентрации бора ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) в опухоли (столбики) и в коже (а), мышце (б), крови (в) на разные сроки после внутриопухолевого введения “Боргиала”.

-O(:)...В, -N(:)...В. Этот пик уменьшается и “сдвигается” батохромно (1461 см^{-1} , плечо) при повышении содержания ГК в продукте (рис. 4). В этой области спектра поглощает связь В-О эфиров борной кислоты R-O-B.

Сильное взаимодействие всех эфирных и гидроксильных (спиртовых) групп полисахарида с O-атомами В-О-В-связей и борат-анионами В-О(-) одновременно за счет свободных пар электронов и атомов водорода -O(:)...В, O-N...O, O-N...(-)O. В циклическом варианте это образование хелатных комплексов.

Таким образом, данные исследований систем такого рода с помощью Раман- и ИК-Фурье-спектроскопии показывают, что ГК и полибораты могут образовывать сетку циклических полихелатных комплексов, в которых ГК выступает в качестве полиденатного лиганда.

Распределение боросодержащего соединения “Боргиал” по органам и тканям мышей с меланомой В-16. Борнейтрон-захватная терапия (БНЗТ) основана на избирательном накоплении бора-10 в опухоли и последующем воздействии на опухоль тепловыми нейтронами. Боросодержащее соединение для БНЗТ должно удовлетворять 2 основным требованиям: накапливаться в опухолевых клетках при незначительном накоплении в окружающих тканях (градиент более 1); концентрация бора в опухоли должна быть достаточной для формирования эффективной поглощенной дозы излучения продуктов борнейтрон-захватной реакции (не менее 20 – 30 мкг бора на 1 г опухолевой ткани) [8]. Результаты исследований динамики накопления боросодержащего соединения на основе гиалуроновой кислоты в опухоли, крови, коже, мышце, печени, почках, селезенке, легких экспериментальных животных после его внутриопухолевого введения представлены на рис. 5 и в таблице.

Максимальное содержание бора в опухоли (49 мкг/г) наблюдается через 15 мин после введения, но уже через 1 ч уменьшается в 2 раза, а к 3 ч снижается более чем в 5 раз, что свидетельствует о достаточно быстром “выходе” соединения из места введения (опухоли). Наиболее благоприятное время для НЗТ — это 30 мин с момента введения препарата, когда концентрация бора в опухоли больше 30 мкг/г и превышает содержание в окружающих тканях. Причем по отношению к мышце и крови градиент достигает 3 и 5 соответственно. Высокое содержание бора в коже может быть связано с вытеканием части препарата из места введения. Не наблюдается значительного накопления препарата в печени, почках, селезенке и легких, что указывает на достаточно быстрый “выход” препарата из организма животных-опухоленосителей. Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация бора в опухоли быстро падает со временем, а на дальние сроки (после 3 ч) сопоставима с накоплением бора в окружающих тканях, что вероятнее всего свидетельствует о присутствии в готовом препарате значительного количества “свободного” бора, не связанного с гиалуроновой кислотой.

Таким образом, результаты предварительных исследований нового отечественного соединения на основе гиалуроновой кислоты и бора показали, что изучаемый препарат при внутриопухолевом введении имеет наибольшее накопление в опухоли в течение первого часа после введения. Наиболее целесообразно вводить данное соединение за 15 – 30 мин до сеанса облучения нейтронами, когда концентрация бора в опухоли выше, чем в окружающих тканях.

В целом, на основании первого этапа исследований можно говорить о перспективности использования данного нетоксичного соединения для задач нейтрон-захватной терапии, и необходимости проведения дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Н. Хабаров, П. Я. Бойков, М. А. Селянин, *Гиалуриновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине*, Практическая медицина, Москва (2012).
2. В. Н. Хабаров, М. А. Селянин, Н. П. Михайлова и др., *Вестник эстет. мед.*, **8**(1), 49 – 54 (2009).
3. В. Н. Хабаров, Н. П. Михайлова, М. А. Селянин, *Эстет. медицина*, **9**(2), 3 – 12 (2010).
4. В. Н. Хабаров, М. А. Селянин, Н. П. Михайлова, *Вестник эстет. медицины*, **9**(2), 69 – 76 (2010).
5. Е. Е. Котляр, Т. Н. Назарчук, *Ж. аналит. химии*, **15**, 207 (1960).
6. W. Z. Kroll, *Anorg. Chem.*, **101**, 1 (1918).
7. В. П. Волков, А. Н. Зеленецкий, П. Л. Иванов и др., *Способ получения борсодержащей гиалуриновой кислоты*, Патент РФ № 2445978 (2012).
8. A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, et al., *Chem. Rev.*, **98**(7), 1515 – 1562 (1998).

Поступила 08.06.12

SYNTHESIS AND STUDY OF NEW HYALURONIC ACID-BASED BORON-10 POLYCHELATES FOR NEUTRON CAPTURE THERAPY

P. L. Ivanov¹, S. N. Koryakin², V. N. Khabarov³, V. A. Yadrovskaya², E. V. Isaeva², E. E. Beketov², A. N. Zelenetskii¹, S. A. Uspenskiy³, M. A. Selyanin³, and S. E. Ulyanenko²

¹ Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials, ul. Profsoyuznaya 70, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117393 Russia

² Medical Radiology Research Center, Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga oblast, 249036 Russia

³ Martinex Research & Training Centre, ul. Krasno proletarskaya 11, Moscow, 127473 Russia

The technology of solid-state modification of hyaluronic acid with sodium decahydroborate by deformation in Bridgman anvils has been developed. The deformation was carried out at a pressure of 1 GPa and a rotation angle of 500 degrees. The structure of obtained complexes has been studied. According to the Raman and infrared spectroscopy data, hyaluronic acid and polyborates are capable of forming a network of cyclic polychelate complexes with hyaluronic acid as polydentate ligands. The distribution of hyaluronic acid-based boron compound in organs and tissues in mice with melanoma B-16 has been studied after single intratumor administration. The maximum boron content in tumor was observed 15 min after drug administration, but decreased two times already in 1 h and more than 5 times in 3 h upon administration. The optimum time for BNCT session is 30 min after compound administration, when boron concentration in tumor is greater than 30 $\mu\text{g/g}$ and exceeds that in the surrounding tissues. During this time, the tumor/muscle and tumor/blood concentration ratios were 3 and 5, respectively. The first stage of investigation shows that the proposed compound is non-toxic and has good prospects for use in BNCT.

Keywords: hyaluronic acid, boron-10, thiocyanation, toxicity, Bridgman anvils, biodistribution, melanoma B-16, neutron capture therapy