

УДК 539.171.4:532.74+547.979.733:616-006

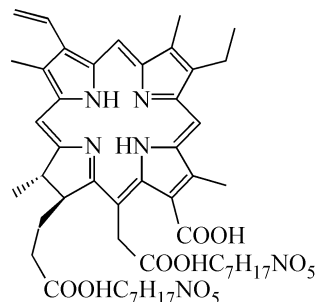
**КОМПЛЕКСЫ ФЕРРОЖИДКОСТЕЙ С ФОТОДИТАЗИНОМ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**© 2009 Ю.В. Кульвелис<sup>1\*</sup>, В.А. Трунов<sup>1</sup>, В.Т. Лебедев<sup>1</sup>, Д.Н. Орлова<sup>1</sup>, Д. Торок<sup>2</sup>,  
М.Л. Гельфонд<sup>3</sup><sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, Гатчина<sup>2</sup>Институт физики твердого тела и оптики АН Венгрии, Будапешт<sup>3</sup>НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Росздрава, Санкт-Петербург

Статья поступила 21 июня 2008 г.

Впервые синтезированы и исследованы методом малоуглового рассеяния нейтронов наноразмерные комплексы феррочастиц с сенсibilизатором фотодитазином, используемым в фотодинамической терапии в онкологии. Определена структура комплексов, исследовано влияние биосовместимого полимера плюроники. Клинические испытания показали увеличение эффективности полученных комплексов по сравнению с исходным препаратом фотодитазин. Синтезированные комплексы могут быть использованы в качестве первого магнитоуправляемого сенсibilизатора при лечении онкологических заболеваний методом фотодинамической терапии.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, фотодитазин, магнитные жидкости, рассеяние нейтронов.

Наиболее эффективным российским препаратом для ФДТ является фотодитазин (рис. 1), разработанный в 1998 г. на основе глюкаминовой соли хлорина еб в качестве фотосенсibilизатора для лечения целого ряда опухолей [ 1 ]. Терапия основана на селективной способности фотодитазина накапливаться в онкологическом образовании с существенно более высокой концентрацией по сравнению со здоровой тканью, а также способностью фотодитазина выделять биологически активный синглетный кислород под действием оптического облучения. Синглетный кислород приводит к гибели клеток, а поскольку концентрация фотодитазина существенно выше вблизи злокачественных клеток, то преимущественно погибают злокачественные клетки. Однако на практике остается много нерешенных проблем, в основном связанных с недостаточным контрастом накопления препарата в опухоли по сравнению со здоровой тканью. Актуальной является задача повышения контраста злокачественное образование/здоровая ткань для лечебного препарата.



С целью решения этих проблем мы впервые исследовали возможность управляемой (внешним магнитным полем) транспортировки и концентрации фотодитазина, локализованного на частицах ферромагнитной жидкости, вблизи злокачественного образования. Разработаны биосовместимые магнитные жидкости на основе магнетита, связывающие фотодитазин на поверхности магнитных частиц, устойчивые во внешнем магнитном поле.

Рис. 1. Структурная формула фотодитазина

\* E-mail: kulvelis@pnpi.spb.ru

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследована локализация фотодитазина на частицах феррожидкости методом малоуглового рассеяния нейтронов. Для повышения эффективности и биологической совместимости фотодитазина в феррожидкости вводили плюроник (блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида), широко используемый в фармацевтике и медицине и способный солюбилизировать фотодитазин [ 2 ]. Плюроники облегчают проникновение лекарств через биологические барьеры, увеличивают накопление лекарств в опухолевых клетках. Авторы работы [ 2 ] обнаружили, что плюроники в некоторых случаях увеличивают фотокаталитическую активность фотодитазина в 5—10 раз. Эффективность приготовленных препаратов проверяли на онкологических клеточных культурах и на животных.

Магнетит синтезировали стандартным методом Массара при конденсации солей  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  [ 3 ]. Стабилизацию полученных частиц магнетита проводили в водной среде, покрывая их лимонной кислотой [ 4, 5 ].

Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов проводили на дифрактометрах "Мембрана-2" (ПИЯФ РАН, Гатчина) и "Yellow Submarine" (Институт физики твердого тела и оптики, Будапешт).

Клинические испытания проводили в НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Росздрава с использованием лазера "Аткус-2" с длиной волны 662 нм, применяемого для проведения ФДТ с фотодитазином.

Препарат фотодитазин использовали в виде раствора в водной среде с исходной концентрацией 0,5 г/дл (производство ООО "Вета-Гранд"), плюроник F-127 (молекулярная масса — 12300) — производства фирмы BASF.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для измерений методом малоуглового рассеяния нейтронов были приготовлены четыре образца магнитных жидкостей с плюроником F-127 и фотодитазином в 90 %  $D_2O$ : 1 — магнитная жидкость, 2 — магнитная жидкость с плюроником, 3 — магнитная жидкость с плюроником и фотодитазином, 4 — магнитная жидкость с фотодитазином.

Кривые рассеяния нейтронов (зависимость интенсивности рассеяния  $I(q)$  от переданного импульса  $q$ ), полученные от образцов, измеренных на дифрактометре "Мембрана-2", хорошо описываются моделью

$$I(q) = \frac{I(0)}{(1 + (R_{C1}q)^2)^2} \left\{ 1 + \frac{1}{(1 + (R_{C2}q)^2)^2} \right\}, \quad (1)$$

соответствующей модели плотных частиц, образующих кластеры, где  $I(0) = I_{q \rightarrow 0}$  — интенсивность рассеяния в нулевой угол при отсутствии интерференции волн, рассеянных от разных частиц;

$\frac{1}{(1 + (R_{C1}q)^2)^2} = F^2(q)$  — квадрат формфактора рассеивающих частиц в виде квадратированного лоренциана, применявшегося для описания рассеяния нейтронов на феррожидкостях [ 6 ];

$1 + \frac{A}{(1 + (R_{C2}q)^2)^2} = S(q)$  — структурный фактор, обусловленный взаимной пространственной

корреляцией частиц, образующих кластеры;  $A = \alpha(n - 1)$ , где  $\alpha$  — вероятность образования кластера и  $n$  — число частиц в кластере.  $R_{C1}$  и  $R_{C2}$  — радиусы корреляции отдельных частиц магнетита и кластеров соответственно, определяющие радиусы самих частиц как  $R_p = \sqrt[4]{9/2}R_c \approx 1,5R_c$  и их размеры (диаметр)  $D_p \approx 3R_c$ . Так были определены размеры частиц магнетита (8—9 нм) и кластеров (40—50 нм) для образцов, не содержащих плюроник. Более подробно результаты измерений на "Мембране-2" изложены в [ 7 ].

Измерения на дифрактометре "Yellow Submarine" позволили более детально исследовать структуру комплексов. Кривые рассеяния на образцах 1—4  $d\sigma/d\Omega(q)$  (зависимость сечения рас-

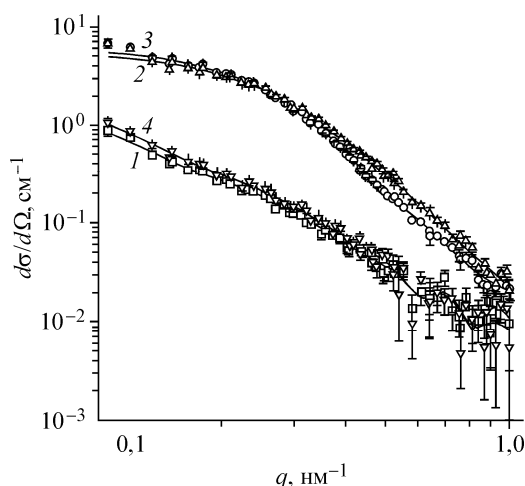


Рис. 2. Сечение рассеяния на образцах 1—4 как функция переданного импульса  $q$

сечения  $d\sigma/d\Omega$  от переданного импульса  $q$ ) приведены на рис. 2.

Кривые рассеяния на образцах 1 и 4 (без плюроника) удовлетворительно описываются моделью:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \frac{I(0)}{(1 + (qR_c)^2)^2} \left\{ 1 + \sum_{i=1}^5 A_i \frac{\sin qR_i}{qR_i} \right\}. \quad (2)$$

Формфактор здесь тот же, что и в модели (1), а структурный фактор,  $1 + \sum_{i=1}^5 A_i \frac{\sin qR_i}{qR_i}$  описывает

корреляции частиц на пяти различных расстояниях ( $R_1 \dots R_5$ ).  $A_i$  — количество частиц, коррелирующих с любой выбранной частицей на расстоянии  $R_i$  от нее.

Кривые рассеяния на образцах 2 и 3 (с плюроником) хорошо описываются моделью:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \left[ I_1(0) \frac{3(\sin qr_1 - qr_1 \cos qr_1)}{(qr_1)^3} + I_2(0) \frac{3(\sin qr_2 - qr_2 \cos qr_2)}{(qr_2)^3} \right]^2 \left\{ 1 + A \frac{\sin qR}{qR} \right\}. \quad (3)$$

Формфактор здесь соответствует сферическим образованиям [ 8 ] с ядром из магнетита (радиуса  $r_1$ ) и оболочки, содержащей плюроник (радиуса  $r_2$ ), структурный фактор содержит только один член, показывающий пространственные корреляции на одном характерном расстоянии  $R$ .

Состав образцов и параметры обработки кривых рассеяния приведены в табл. 1 и 2.

Образцы 1 и 4 (без плюроника) характеризуются наличием частиц магнетита с размерами  $D_p \approx 6-7$  нм и кластерами из ассоциированных между собой частиц. Радиусы корреляции  $R_1 \dots R_5$  являются характерными расстояниями между центрами частиц в кластерах. Структурные параметры для образца 4 (с фотодитазинном) не очень сильно отличаются от таковых для образца 1 (без фотодитазина). Значения параметров  $A_1 \dots A_4$ , равные  $\sim 2$ , показывают, что кластеры представляют собой типичные для магнитных жидкостей цепные структуры [ 9 ]. Величина параметра  $A_5 < A_{1,2,3,4}$  свидетельствует об ослаблении корреляций на расстоянии  $R_5$ . Кластеры со-

Т а б л и ц а 1

Состав и параметры образцов 1 и 4 (без плюроника)

Образец	$C_{\text{магн}}, \%$	$C_{\text{F-127}}, \%$	$C_{pd}, \%$	$I(0), \text{см}^{-1}$	$R_c, \text{нм}$	$A_1$	$R_1, \text{нм}$	
1	2,4872	0	0	0,18(3)	2,0(2)	2,1(3)	8,0(4)	
4	2,4895	0	0,0493	0,29(9)	2,5(3)	1,5(4)	7,9(7)	
Образец	$A_2$	$R_2, \text{нм}$	$A_3$	$R_3, \text{нм}$	$A_4$	$R_4, \text{нм}$	$A_5$	$R_5, \text{нм}$
1	2,0(4)	14,2(7)	2,3(5)	20,6(6)	2,4(6)	28,3(6)	1,3(4)	36,7(10)
4	1,4(6)	14,1(12)	1,9(7)	20,2(8)	2,0(6)	28,2(7)	0,9(4)	37,5(13)

Т а б л и ц а 2

Состав и параметры образцов 2 и 3 (с плюроником)

Образец	$C_{\text{магн}}, \%$	$C_{\text{F-127}}, \%$	$C_{pd}, \%$	$I_1(0), \text{см}^{-1}$	$r_1, \text{нм}$	$I_2(0), \text{см}^{-1}$	$r_2, \text{нм}$	$A$	$R, \text{нм}$
2	2,4898	0,5355	0	0,53(9)	3,1(4)	1,02(7)	7,3(4)	1,77(12)	9,08(11)
3	2,4975	0,5092	0,0491	0,74(6)	3,57(19)	1,02(5)	8,0(4)	0,96(12)	9,7(3)

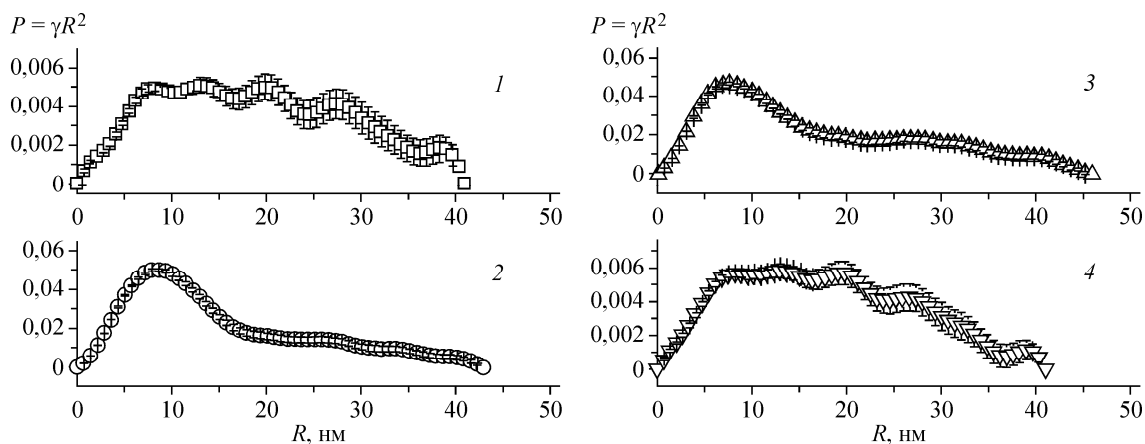


Рис. 3. Корреляционные функции в сферическом представлении для образцов 1—4 в зависимости от расстояния  $R$

стоят примерно из десяти частиц магнетита ( $\Sigma A_i$ ). Структурные особенности феррожидкостей более наглядно видны в поведении корреляционных функций  $\gamma(R)$ , восстановленных методом преобразования Фурье из сечений рассеяния (пакет ATSAS [10]). На рис. 3 показаны корреляционные функции в сферическом представлении  $P(R) = \gamma R^2$ . Для образцов 1 и 4 наблюдаются корреляции на расстояниях  $R_1 \sim 8$ ,  $R_2 \sim 13$ ,  $R_3 \sim 20$ ,  $R_4 \sim 28$  и  $R_5 \sim 38$  нм, хорошо совпадающих с расстояниями  $R_i$  между центрами частиц (см. табл. 1).

Образцы 2 и 3 (с плуроником) представляют собой частицы магнетита тех же размеров ( $2r_1 \sim 6\text{—}7$  нм), но покрытые оболочкой, содержащей плуроник. Структурная организация образцов 2 и 3 похожа — соседние частицы магнетита ассоциируют друг с другом и образуют кластер, состоящий из центральной частицы и примерно шести частиц, окружающих ее и формирующих сферический слой с внешним диаметром  $2r_2 \sim 15\text{—}16$  нм. Такие кластеры объединяются в тройки (образец 2) или пары (образец 3). Это следует из значений параметра  $A$ , определяющего количество кластеров в группе:  $A + 1 = 2,77 \sim 3$  (образец 2);  $A + 1 = 1,96 \sim 2$  (образец 3). Присутствие фотодитазина (образец 3) ослабляет взаимодействие кластеров и увеличивает расстояние  $R$  между их центрами от 9,08 до 9,7 нм. Корреляционные функции на рис. 3 подтверждают наличие корреляций на расстояниях  $R \sim 8$  нм и отсутствие упорядоченной структуры на больших расстояниях.

Показано образование комплексов фотодитазина и плуроника с частицами магнетита, определена структура комплексов. Установлено, что плуроник перестраивает структуру магнитной жидкости из цепных образований в компактные наноразмерные кластеры. Полученные комплексы остаются стабильными длительное время при 20—40 °С, что важно для применения в медицине. Клинические испытания на культурах опухолевых клеток Нер-2 (карцинома ротовой полости человека) и на мышях с применением направленной доставки препарата к месту опухоли с помощью внешнего магнитного поля показали, что фотокаталитические свойства фотодитазина в комплексе с магнетитом сохраняются, а эффективность препарата увеличивается по сравнению с исходным фотодитазином. Наличие плуроника еще больше увеличивает эффективность. Синтезированные комплексы могут быть использованы в качестве магнитоуправляемого сенсibilизатора в ФДТ.

Благодарим Н.С. Мелик-Нубарова и Т.М. Жиентаева за предоставленные образцы плуроника, Л. Рошта за поддержку в проведении экспериментов, Г.В. Пономарева за полезные обсуждения и Правительство Санкт-Петербурга за финансовую поддержку (грант 2.4/25-04/08).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гельфонд М.Л. // Физическая медицина. – 2005. – **15**. – С. 31 – 34.
2. Жиентаев Т.М., Аксенова Н.А., Мелик-Нубаров Н.С., Соловьева А.Б. // 4-я Всерос. каргинская конф. "Наука о полимерах 21-му веку". – Москва, 2007. – **2**. – С. 383.
3. Massart R. // IEEE Trans. Magn. – 1981. – **17**. – P. 1247 – 1248.
4. Байбуртский Ф.С., Гончаров Л.А., Брусенцов Н.А. <http://magneticliquid.narod.ru/medicine/012.htm>.
5. Gazeau F., Boue F., Dubois E., Perzynski R. // J. Phys.: Condens. Mat. – 2003. – **15**. – S1305 – S1334.
6. Lebedev V.T., Gordeev G.P., Panasiuk E.A. et al. // J. Magn. Magn. Mater. – 1993. – **122**. – P. 83 – 89.
7. Кульвелис Ю.В., Трунов В.А., Лебедев В.Т. и др. // Поверхность. – 2009. – № 5. – С. 55 – 62.
8. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. – М.: Наука, 1986. – С. 81.
9. Шлиомис М.И. // Успехи физ. наук. – 1974. – **112**. – С. 427 – 458.
10. Svergun D.I. // J. Appl. Crystallogr. – 1992. – **25**. – P. 495 – 503.