

## Структура магнитоуправляемых наноразмерных носителей сенсibilизатора фотодитазина по данным малоуглового рассеяния нейтронов

© Ю.В. Кульвелис, В.А. Трунов, В.Т. Лебедев, Д.Н. Орлова, Гу. Төгөк\*, М.Л. Гельфонд\*\*

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН,  
Гатчина, Ленинградская обл., Россия

\* Research Institute for Solid State Physics and Optics,  
Budapest, Hungary

\*\* Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова,  
Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kulvelis@pnpi.spb.ru

Впервые синтезированы и исследованы методом малоуглового рассеяния нейтронов наноразмерные комплексы феррочастиц с сенсibilизатором „фотодитазин“, использующимся в фотодинамической терапии в онкологии. Определена структура комплексов, исследовано влияние на них биосовместимого полимера плуроника. Обсуждаются возможности применения комплексов для магнитоуправляемого транспорта фотосенсibilизатора в клетки и ткани при лечении онкологических заболеваний методом фотодинамической терапии.

Работа поддержана Правительством Санкт-Петербурга (грант № 2.4/25-04/08)

### 1. Введение

Актуальной проблемой физики и химии функциональных наноструктурных материалов является создание гибридных систем, включающих магнитные наночастицы, низкомолекулярные и полимерные поверхностно-активные вещества, служащие для связывания медицинских препаратов с магнитными частицами, играющими роль управляемых полей носителей лекарственных веществ [1,2]. В связи с этим до последнего времени разрабатывались в основном феррожидкости на основе наночастиц ферритов, концентрирование которых в опухолях при внешнем воздействии (инфракрасном облучением или магнитным полем) создавало эффект гипертермии [2,3], который приводит к разрушению не только опухолевых, но и здоровых клеток. С точки зрения избирательного действия наиболее эффективными представляются феррожидкости — носители лекарственных препаратов за счет наличия комплекса препарата с магнитной частицей и последующей управляемой полем локализации препарата в нужном месте организма. Указанная область исследований еще только формируется [4,5]. Направление синтеза и нейтронных исследований структуры и физико-химических свойств феррожидкостей развивается в ПИЯФ РАН в течение нескольких десятилетий и в последнее время сконцентрировано на изучении впервые разработанных гибридных многокомпонентных систем на основе стабилизированных наночастиц феррита в водной среде,

являющихся биосовместимыми и способными связывать лекарственные препараты, не подавляя, а усиливая их лечебное действие, что было показано в серии опытов на клеточных культурах [6]. Следует подчеркнуть, что в таких системах достижение необходимого комплекса функциональных свойств требует в первую очередь создания особой (оптимальной) наноструктуры, наиболее эффективным методом анализа которой является малоугловое рассеяние нейтронов. Целью настоящей

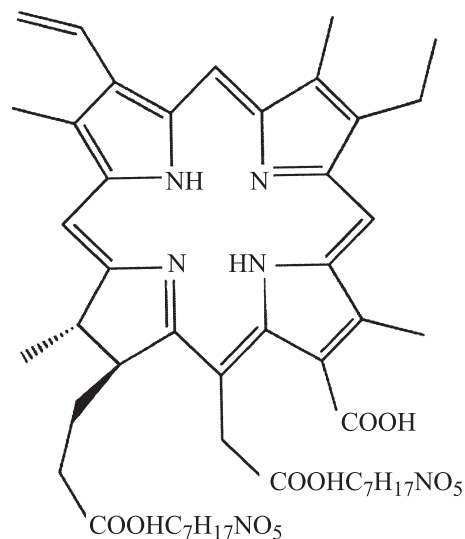


Рис. 1. Структура фотодитазина.

работы являлось изучение структуры и молекулярных корреляций в феррожидкостях с частицами в виде комплексов магнетита с фотодитазином (производное хлорина, рис. 1) — российским препаратом для фотодинамической терапии в онкологии, разработанным в качестве фотосенсибилизатора для лечения целого ряда опухолей [7].

## 2. Экспериментальная часть

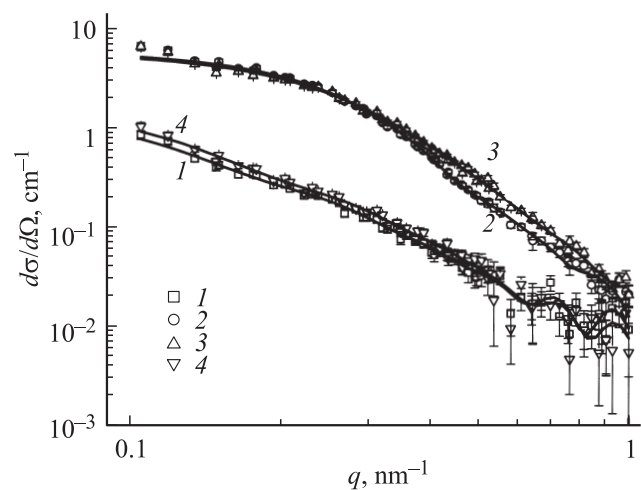
Для приготовления биосовместимых феррожидкостей синтезировали магнетит стандартным методом Массара (конденсация солей  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ ) [8]. Стабилизацию полученных частиц магнетита проводили в водной среде, покрывая их лимонной кислотой [9,10]. Препарат фотодитазин (ООО „Вета-Гранд“) использовали в виде раствора в водной среде (исходная концентрация 0.5 g/dl). Установлено, что фотодитазин связывается с феррочастицами ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [6]. Ранее было показано, что эффективность и биологическая совместимость препарата фотодитазина повышаются при его связывании с плуронином (блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида) [11]. Поэтому при синтезе в феррожидкости вводили макромолекулы плуроника (F-127, молекулярная масса — 12 300, фирма BASF), облегчающие проникновение лекарств через биологические барьеры, усиливающие их накопление в опухолевых клетках (увеличение фотокаталитической активности фотодитазина до 5–10 раз) [11].

Для выявления особенностей строения впервые синтезированных многокомпонентных биологически активных феррожидкостей в нейтронных экспериментах проводился сравнительный анализ структуры ряда феррожидкостей различного состава: образец № 1 — магнитная жидкость, № 2 — магнитная жидкость с плуронином, № 3 — магнитная жидкость с плуронином и фотодитазином, № 4 — магнитная жидкость с фотодитазином. Образцы приготовлены в среде, содержащей 90 vol.%  $\text{D}_2\text{O}$  и 10 vol.%  $\text{H}_2\text{O}$ . Магнетит, плуроник и фотодитазин имеют величины плотности длины когерентного ядерного рассеяния, равные  $K_m = 7.0 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ ,  $K_{pl} = 0.5 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  и  $K_{ph} = 1.3 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  соответственно. Разности этих значений и плотности длины когерентного ядерного рассеяния среды растворителя  $K_{sl} = 5.7 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  определяют величину контраста в рассеянии для каждой из компонент:  $\Delta K_m = K_m - K_{sl} = 1.3 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ ;  $\Delta K_{pl} = -5.2 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ ;  $\Delta K_{ph} = -4.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ . Таким образом, по отношению к растворителю магнетит обладает положительным контрастом, а плуроник и фотодитазин характеризуются отрицательными значениями контраста одного порядка величины. Отсюда следует, что в этих условиях рассеивающая способность плуроника и фотодитазина, определяемая квадратом фактора контраста, на порядок выше, чем у магнетита.

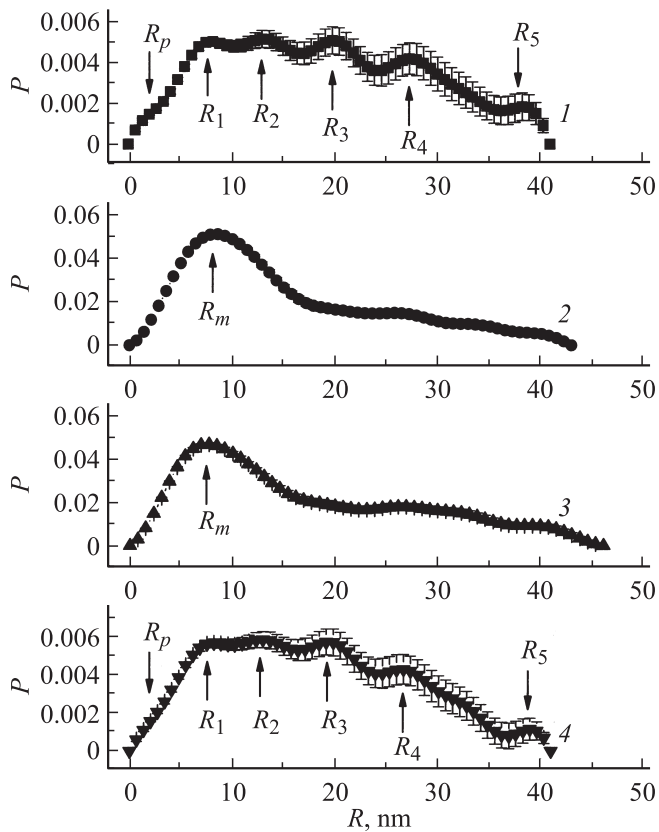
Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов с длинами волн  $\lambda = 0.39$  и  $0.75 \text{ nm}$  (ширина спектра  $\Delta\lambda/\lambda = 0.1$ ) проводили на дифрактометре „Yellow Submarine“ (Институт физики твердого тела и оптики, Будапешт) в диапазоне переданных импульсов  $q = \frac{4\pi \sin \theta/2}{\lambda} = 0.1 - 1 \text{ nm}^{-1}$  при физиологической температуре  $37^\circ\text{C}$ . Сечения рассеяния  $d\sigma/d\Omega(q)$  (в единичный телесный угол детектора и на единицу объема в зависимости от переданного импульса  $q$ ) определяли нормировкой интенсивностей рассеяния на образцах к интенсивностям рассеяния на калибровочном образце (слой  $\text{H}_2\text{O}$  толщиной 1 mm), являющегося стандартом известного сечения рассеяния.

## 3. Результаты и их обсуждение

Зависимости сечений рассеяния нейтронов  $d\sigma/d\Omega(q)$  от переданного импульса для образцов № 1–4 приведены на рис. 2. Введение в систему плуроника в количестве  $\sim 0.5 \text{ mass.}\%$  вызывает усиление рассеяния на порядок в значительной части диапазона импульсов, кроме высоких значений  $q \sim 0.8 - 1 \text{ nm}^{-1}$ . Добавление в десять раз меньшего количества фотодитазина сопровождается соответственно на порядок меньшим приростом сечений, причем не во всей области импульсов. Детальный анализ поведения сечений в этих образцах выполнен с помощью Фурье-преобразования данных и восстановления корреляционных функций  $\gamma(R)$  в зависимости от радиуса  $R$  с использованием пакета программ ATSAS [12]. Структурные особенности феррожидкостей наглядно прослеживаются в поведении корреляционных функций на рис. 3, которые показаны в сферическом представлении  $P(R) = \gamma(R) \cdot R^2$  и описывают корреляции плотности длины когерентного рассеяния внутри



**Рис. 2.** Сечение рассеяния на образцах № 1–4 как функция переданного импульса  $q$ . Линии — подгоночные функции по модели (1) для образцов № 1 и 4 и (2) для образцов № 2 и 3. Номера кривых соответствуют номерам образцов.



**Рис. 3.** Корреляционные функции в сферическом представлении  $P = \gamma R^2$  для образцов № 1–4 в зависимости от расстояния  $R$ . Номера кривых соответствуют номерам образцов.

частицы и в сферических слоях вокруг выбранной частицы на расстоянии радиуса  $R$ . Для образцов № 1 и 4 без плуроника в спектре корреляций имеется характерная начальная область при  $0 \leq R \leq 5$  nm, которая отвечает корреляциям короткого радиуса — в пределах отдельной частицы. Как известно [13], для однородной сферической частицы радиуса  $R_p$  корреляционная функция  $P(R) \sim R^2[1 - (3/4)(R/R_p) + (1/16)(R/R_p)^3]$  имеет максимум при  $R^* = 1.05R_p$ . В эксперименте максимум, соответствующий радиусу частицы  $R_p \approx R^* \sim 3-4$  nm, перекрывается с максимумом на расстоянии  $R_1 \sim 8$  nm. Кроме того, выражены пространственные корреляции частиц на расстояниях  $R_2 \sim 13$  nm,  $R_3 \sim 20$  nm,  $R_4 \sim 28$  nm и  $R_5 \sim 38$  nm. Наличие максимумов в позициях  $R_{1-5}$  явно показывает структурирование коллоидных систем № 1 и 4, что присуще феррожидкостям вообще. Феррочастицы обладают магнитными моментами, поэтому в феррожидкостях за счет дипольного притяжения вероятно образование цепных кластеров частиц [14]. В образцах № 1 и 4 (рис. 3) наблюдается формирование именно цепных структур длиной до  $\sim 10$  диаметров частицы. Об этом свидетельствует соотношение между корреляционными радиусами  $R_5/5 \approx R_4/4 \approx R_3/3 \approx R_2/2 \approx R_1 \approx 2R_p$ , показывающее, что значения  $R_{1-5}$  кратны среднему диаметру

частиц  $2R_p \sim 8$  nm. Данная структурная модель была применена для анализа данных по образцам № 1 и 4 в импульсном пространстве (рис. 2).

Функция рассеяния

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

включает квадрат формфактора частиц  $\frac{1}{(1 + (qR_c)^2)^2} = F^2(q)$  в виде квадрированного лоренциана, зависящий от корреляционного радиуса частицы  $R_c$ . Как показано ранее [15], функция  $F^2(q)$  такого вида хорошо аппроксимирует данные рассеяния нейтронов на частицах феррожидкости при наличии дисперсии размера частиц (относительная дисперсия радиуса  $\Delta R_p/R_p \sim 0.5$ ). Важно, что при этом выполняется закон Порода [13] для частиц с резкими границами,  $F^2(q) \sim 1/q^4$  при импульсах  $q \gg 1/R_c$  много больше обратного радиуса корреляции частицы, связанного с ее геометрическим радиусом в асимптотике для рассеяния на сфере радиуса  $R_p = \sqrt[4]{9/2} R_c \approx 1.5R_c$ . В формуле (1) параметр  $\sigma(0) = \sigma_{q \rightarrow 0}$  — сечение рассеяния в пределе малых импульсов при отсутствии интерференции волн, рассеянных от разных частиц, имеющих характерный диаметр  $D_p \approx 3R_c$ . В закон рассеяния (1) входит структурный фактор системы

частиц  $1 + \sum_{i=1}^5 A_i \frac{\sin qR_i}{qR_i}$ , учитывающий, что центры коррелирующих в пространстве частиц находятся на характерных расстояниях  $R_{1-5}$ , как было показано выше. Каждый из параметров  $A_i$  — это количество частиц, коррелирующих с любой выбранной частицей на расстоянии  $R_i$  от нее. Полученные из аппроксимации данных функцией (1) параметры приведены в табл. 1. Структурные параметры для образца № 4 (с фотодитазина) не очень сильно отличаются от таковых для образца № 1 (без фотодитазина). Как видно из величин параметров (табл. 1), частицы магнетита, имеющие в среднем диаметр  $D_p \approx 7$  nm, находятся на характерных расстояниях  $R_{1-5}$ , примерно соответствующих тем, при которых наблюдаются максимумы корреляционных функций (рис. 3). Значения параметров  $A_{1-4} \sim 2$  показывают, что в среднем в окрестности каждой частицы на расстояниях  $R_{1-4}$  находятся по две частицы, что реализуется именно в цепном кластере [14]. Меньшее значение параметра  $A_5 < A_{1-4}$  свидетельствует об ослаблении корреляций на расстоянии  $R_5$ , т.е. величина  $R_5$  дает оценку радиуса кластера, который, как показывает суммирование величин  $A_{1-5}$ , составлен из  $\sim 10$  частиц.

Введение в систему плуроника, играющего роль полимерного поверхностно-активного вещества, качественно меняет картину молекулярных корреляций (рис. 3). В поведении корреляционных функций для образцов № 2 и 3, различающихся между собой наличием фотодитазина, видны общие закономерности: преобладает главный корреляционный максимум при  $R_m \sim 8-9$  nm; корреляции на больших масштабах достаточно слабые; не проявлены

Таблица 1. Состав и параметры образцов № 1 и 4 (без плуроника)

Образец	$C_{\text{magn}}$ , mass. %	$C_{F-127}$ , mass. %	$C_{\text{pdt}}$ , mass. %	$\sigma(0)$ , $\text{cm}^{-1}$	$R_c$ , nm	$A_1$	$R_1$ , nm	$A_2$	$R_2$ , nm	$A_3$	$R_3$ , nm	$A_4$	$R_4$ , nm	$A_5$	$R_5$ , nm
1	2.49	0	0	$0.18 \pm 0.03$	$2.0 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.3$	$8.0 \pm 0.4$	$2.0 \pm 0.4$	$14.2 \pm 0.7$	$2.3 \pm 0.5$	$20.6 \pm 0.6$	$2.4 \pm 6$	$28.3 \pm 0.6$	$1.3 \pm 0.4$	$36.7 \pm 1.0$
4	2.49	0	0.049	$0.29 \pm 0.09$	$2.5 \pm 0.3$	$1.5 \pm 0.4$	$7.9 \pm 0.7$	$1.4 \pm 0.6$	$14.1 \pm 1.2$	$1.9 \pm 0.7$	$20.2 \pm 0.8$	$2.0 \pm 6$	$28.2 \pm 0.7$	$0.9 \pm 0.4$	$37.5 \pm 1.3$

Таблица 2. Состав и параметры образцов № 2 и 3 (с плуроником)

Образец	$C_{\text{magn}}$ , mass. %	$C_{F-127}$ , mass. %	$C_{\text{pdt}}$ , mass. %	$S_1(0)$ , $\text{cm}^{-1/2}$	$r_1$ , nm	$S_2(0)$ , $\text{cm}^{-1/2}$	$r_2$ , nm	$A$	$R_m$ , nm
2	2.49	0.54	0	$0.53 \pm 0.09$	$3.1 \pm 0.4$	$1.02 \pm 0.07$	$7.3 \pm 0.4$	$1.77 \pm 0.12$	$9.08 \pm 0.11$
3	2.50	0.51	0.049	$0.74 \pm 0.06$	$3.57 \pm 0.19$	$1.02 \pm 0.05$	$8.0 \pm 0.4$	$0.96 \pm 0.12$	$9.7 \pm 0.3$

особенности, связанные с отдельными феррочастицами. Как показывают оценки, количество плюроники в системе таково, что при равномерном и полном осаждении его цепей на поверхность частиц последние имели бы тонкую полимерную оболочку толщиной всего  $\sim 0.9$  нм, что не увеличило бы существенно их наблюдаемый размер. Следовательно, объекты с характерным радиусом  $R_m \sim 8-9$  нм — это не отдельные частицы, а кластеры. Они представляют собой уже не рыхлые цепные, а плотные глобулярные структуры, способные с некоторой вероятностью ассоциировать в растворе. Простейшая сферически-симметричная модель такого кластера представляется в виде плотного ядра, окруженного оболочкой. Данные для образцов № 2 и 3 были аппроксимированы следующей функцией рассеяния:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \left( S_1(0) \frac{3(\sin qr_1 - qr_1 \cos qr_1)}{(qr_1)^3} + S_2(0) \frac{3(\sin qr_2 - qr_2 \cos qr_2)}{(qr_2)^3} \right)^2 \left( 1 + A \frac{\sin qR_m}{qR_m} \right). \quad (2)$$

Формфактор здесь соответствует сферическим образованиям [13] с ядром из магнетита (радиус  $r_1$ ) и оболочкой (внешний радиус  $r_2$ ), которая может содержать частицы, связанные с цепями плюроники. Структурный фактор учитывает пространственные корреляции на одном характерном расстоянии  $R_m$ . Параметры, полученные из обработки данных, приведены в табл. 2.

Как показывают результаты (табл. 2), в образцах № 2 и 3 (с плюроником) частицы магнетита имеют примерно те же размеры  $2r_1 \sim 6-7$  нм, что и в образцах № 1 и 4. Различие заключается в том, что в феррожидкостях № 2 и 3 феррочастицы несут на себе адсорбированные молекулы плюроники. Расчеты с использованием отношения вкладов в рассеяние ядра  $S_1(0)$  и оболочки  $S_2(0)$  (табл. 2) и известных длин когерентного рассеяния нейтронов на ядрах всех компонентов системы [16] показали, что для образца № 2 средняя плотность длины рассеяния оболочки составляет  $K_{SH} = 5.9 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ , что превышает значения длин рассеяния плюроники  $K_{pl} = 0.5 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$  и растворителя  $K_{sl} = 5.7 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ . Следовательно, оболочка содержит не только плюроник и растворитель, но также и частицы магнетита, для которого  $K_m = 7.0 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ . Для образца № 3 (с фотодитазином)  $K_{SH} = 5.8 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ , что почти не отличается от значения  $K_{SH}$  образца № 2, поэтому выводы о наличии магнетита в оболочке справедливы для обоих образцов. Оценки показали, что оболочки включают  $\sim 6$  частиц магнетита. Таким образом, структуризация феррожидкостей № 2 и 3 происходит путем агрегации частиц в кластеры, состоящие из центральной частицы и  $\sim 6$  частиц, формирующих сферический слой с внешним диаметром  $2r_2 \sim 15-16$  нм. При этом в растворе образуются группы преимущественно из 3 (образец № 2) или 2 (образец № 3) кластеров на расстоянии  $R_A < 2r_2$  (оболочки взаимно проникают).

Этот вывод следует из значений параметра  $A$ , определяющего количество частиц в группе:  $A + 1 = 2.77 \sim 3$  (образец № 2);  $A + 1 = 1.96 \sim 2$  (образец № 3). Присутствие фотодитазина (образец № 3) немного ослабляет корреляции частиц и несколько увеличивает расстояния  $R_m$  между их центрами от 9.1 до 9.7 нм. В растворе наблюдаются также слабые корреляции на расстояниях  $R > 2r_2$ , превосходящих диаметр кластера.

## 4. Заключение

Образование комплексов фотодитазина и плюроники с частицами магнетита приводит к структурированию феррожидкости с образованием компактных глобулярных кластеров в отличие от явлений ассоциации феррожидкостей классического типа, частицы которых склонны формировать протяженные цепные структуры. Полученные комплексы с фотодитазином и плюроником остаются стабильными длительное время при  $20-40^\circ\text{C}$ , что важно для применения в медицине.

Авторы благодарят Н.С. Мелик-Нубарова и Т.М. Жиентаева за предоставление образцов плюроники, Л. Роща за поддержку в проведении экспериментов и Г.В. Пономарева за полезные обсуждения.

## Список литературы

- [1] R. Jurgons, C. Seliger, A. Hilpert, L. Trahms, S. Odenbach, C. Alexiou. *J. Phys.: Cond. Matter* **18**, S2893 (2006).
- [2] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Föhling, R. Felix. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 413 (1999).
- [3] N.A. Brusentsov, V.V. Gogosov, T.N. Brusentsova, A.V. Sergeev, N.Y. Jurchenko, A.A. Kuznetsov, O.A. Kuznetsov, L.I. Shumakov. *J. Magn. Magn. Mater.* **225**, 113 (2001).
- [4] N.A. Brusentsov, A.Yu. Baryshnikov, F.S. Bayburtskiy, L.A. Goncharov. <http://magneticliquid.narod.ru/authority/066.htm>.
- [5] M. Idowu, T. Nyokong. *J. Photochem. Photobiol.* **188**, 200 (2007).
- [6] Ю.В. Кульвеллис, В.А. Трунов, В.Т. Лебедев, Д.Н. Орлова, М.Л. Гельфонд, Н.С. Мелик-Нубаров, Т.М. Жиентаев. Препринт ПИЯФ № 2736. Гатчина (2007). 21 с.
- [7] М.Л. Гельфонд. *Физ. медицина* **15**, 31 (2005).
- [8] R. Massart. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247 (1981).
- [9] Ф.С. Байбургский, Л.А. Гончаров, Н.А. Брусенцов. <http://magneticliquid.narod.ru/medicine/012.htm>.
- [10] F. Gazeau, F. Boue, E. Dubois, R. Perzynski. *J. Phys.: Cond. Matter* **15**, S1305 (2003).
- [11] Т.М. Жиентаев, Н.А. Аксенова, Н.С. Мелик-Нубаров, А.Б. Соловьева. Четвертая Всерос. Каргинская конф. „Наука о полимерах 21 века“. М. (2007). Т. 2. С. 383.
- [12] D.I. Svergun. *J. Appl. Cryst.* **25**, 495 (1992).
- [13] Д.И. Свиргун, Л.А. Фейгин. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. Наука, М. (1986). С. 81.
- [14] М.И. Шлиомис. *УФН* **112**, 427 (1974).
- [15] V.T. Lebedev, G.P. Gordeev, E.A. Panasiuk, L. Kiss, L. Cser, L. Rosta, G. Török, B. Farago. *J. Magn. Magn. Mater.* **122**, 83 (1993).
- [16] V.F. Sears. *Neutron News* **3**, 26 (1992).