

На правах рукописи

Кульвелис Юрий Викторович

**СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ
И ИХ АНАЛОГОВ С БИОСОВМЕСТИМЫМИ ПОЛИМЕРАМИ
И МАГНИТНЫМИ ЧАСТИЦАМИ**

03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2009

Работа выполнена в Отделении нейтронных исследований Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук Лебедев Василий Тимофеевич.

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор Вахрушев Сергей Борисович,

доктор физико-математических наук, профессор Кожевников Николай Михайлович.

Ведущая организация: Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Защита состоится 22 июня 2009 г. в 16 часов на заседании

Диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу:

194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 5, факультет медицинской физики и биоинженерии, ауд. 305.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет».

Автореферат разослан "___" мая 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Власова О.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Порфирины и их аналоги – макрогетероциклические соединения, содержащие в своей основе цикл порфина. Природные порфирины являются широко распространенными веществами и выполняют важнейшие биологические функции. Наиболее известные из них – это хлорофилл и гем крови, которые обеспечивают процессы фотосинтеза и дыхания. Порфирины также входят в состав гемоглобина, миоглобина, ферментов каталазы, пероксидазы и группы цитохромов.

Важной областью применения порфиринов и их аналогов является медицина. Интенсивно развиваются исследования порфиринов в качестве сенсibilизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний, основанной на способности порфиринов к накоплению преимущественно в опухолевых клетках и к генерации цитотоксичного синглетного кислорода. Наиболее эффективным сенсibilизатором, разработанным и применяющимся в России, является фотодитазин (производное хлорина), однако он не всегда накапливается в опухолевых клетках с достаточным контрастом по сравнению с нормальными. Важной задачей является повышение контраста накопления сенсibilизатора, например, в комплексе с внешне управляемым магнитным носителем. Известны противовирусные свойства некоторых порфиринов. Так, сульфированные тетрафенилпорфины, помимо фотодинамической активности, проявляют активность против вируса иммунодефицита. Сульфированные дифталоцианины металлов активны против вируса гриппа, саркомы Рауса.

Терапевтический эффект порфиринов напрямую связан со структурной организацией и взаимодействием порфиринов с молекулами и органеллами в живых клетках и организмах. Актуальной задачей является изучение механизмов взаимодействия порфиринов и их аналогов с различными биомолекулами (ДНК, белки, ферменты) и другими биосовместимыми полимерами в связи с необходимостью разработки новых эффективных противовирусных и терапевтических препаратов.

Цель работы заключалась в изучении механизмов взаимодействия порфиринов и их аналогов с биосовместимыми полимерами (поли-N-винилпирролидон и ДНК) и магнитными частицами для создания перспективных противовирусных и противоопухолевых препаратов, исследовании структуры комплексов порфирин-полимер и магнитных носителей с фотодитазинном для магнитоуправляемого транспорта препарата к опухолевым клеткам, а также оценке эффективности магнитоуправляемого противоопухолевого препарата в доклинических испытаниях на животных.

Задачи исследования:

1. Исследование межмолекулярных взаимодействий и образования комплексов в водных растворах при взаимодействии сульфированного тетрафенилпорфина и поли-N-винилпирролидона, определение характера конформационных изменений полимера при комплексообразовании, анализ молекулярной структуры комплексов и количественных характеристик связывания в зависимости от температуры и соотношения концентраций компонентов.
2. Изучение механизмов образования комплексов сульфированных дифталоцианинов лютеция и скандия с макромолекулами ДНК, исследование структуры комплексов и их гидродинамических свойств в водно-солевых растворах.
3. Разработка стабильного наноразмерного магнитоуправляемого носителя для фотодитазина на основе частиц магнитной жидкости для повышения эффективности препарата для фотодинамической терапии. Определение и сравнительный анализ структуры магнитных наносистем с фотодитазином и тройных комплексов с биосовместимым полимером (плюронином), стимулирующим активность фотодитазина в модельных системах.
4. Проверка эффективности разработанных магнитных комплексов с фотодитазином и плюронином в ходе биомедицинских тестов на животных.

Научная новизна работы.

1. Установлено образование комплексов сульфированного тетрафенилпорфина с поли-N-винилпирролидоном в водных растворах, определена молекулярная структура, гидродинамические и спектральные характеристики комплексов.
2. Установлено образование комплексов отрицательно заряженных сульфированных дифталоцианинов с ДНК в водно-солевых растворах, определены структурные и гидродинамические свойства комплексов.
3. Разработаны стабильные магнитоуправляемые комплексы на основе наночастиц магнетита, связанных с молекулами сенсibilизатора фотодитазина. Достигнута биосовместимость комплексов при сохранении функциональных свойств сенсibilизатора, в том числе с использованием плюронинов, связывающих фотодитазин и повышающих его эффективность.
4. Показано торможение роста опухоли в ходе доклинических испытаний на мышах при применении магнитоуправляемого комплекса с фотодитазином и направленной доставке препарата с помощью внешнего магнитного поля. Использование плюроника в составе комплексов увеличивает терапевтическое воздействие на опухоль.

Практическая значимость работы. Синтезированные и исследованные в работе комплексы порфиринов и их аналогов с поли-N-винилпирролидоном и ДНК перспективны для создания новых эффективных противовирусных препаратов. Полученные магнитоуправляемые комплексы с фотодитазином представляют практический интерес в качестве эффективных сенсibilизаторов для фотодинамической терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сульфированный тетрафенилпорфин образует комплексы с макромолекулами поли-N-винилпирролидона по данным спектрофотометрического титрования, рассеяния нейтронов, вискозиметрии и динамического рассеяния света. Связывание носит кооперативный характер и приводит к нарушению электронейтральности цепей полимера при низких ионных силах внешнего электролита.
2. Отрицательно заряженные сульфированные дифталоцианины лютеция и скандия образуют комплексы с ДНК в водно-солевых растворах, приводя к компактизации молекулы ДНК, что подтверждено данными рассеяния нейтронов, вискозиметрии, спектрофотометрического титрования.
3. Установленные по данным рассеяния нейтронов структура и характер корреляций между частицами в магнитных жидкостях регулируются способами стабилизации феррочастиц. В феррожидкостях, стабилизированных лимонной кислотой, частицы ассоциируют в цепные структуры по мере повышения концентрации синтезированной магнитной жидкости.
4. Введение макромолекул плуроника, играющего роль полимерного поверхностно-активного вещества, в феррожидкость блокирует образование цепных структур, вызывая формирование глобулярных кластеров из феррочастиц в оболочках плуроника.
5. Фотодитазин в составе синтезированных магнитных комплексов с плуроником не только сохраняет свои функциональные свойства, но и приобретает повышенную эффективность как магнитоуправляемый сенсibilизатор для фотодинамической терапии.

Личный вклад автора заключается непосредственно в постановке задач, планировании, подготовке и проведении экспериментов, обсуждении результатов и оформлении публикаций. Экспериментальная часть работы (опыты по рассеянию нейтронов и динамическому рассеянию света, вискозиметрии и спектрофотометрии, разработка структурных моделей исследованных систем, фурье-анализ данных нейтронного рассеяния) практически полностью выполнена автором. Публикации на 90% написаны и

подготовлены к печати лично автором.

Достоверность полученных результатов подтверждается высокой воспроизводимостью и взаимной согласованностью результатов, полученных независимыми методами.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены на следующих российских и международных научных конференциях: III и IV Всероссийские Каргинские конференции. (Москва, 2004 и 2007); XII, XIII и XIV симпозиумы по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул (Пушино, 2004, Санкт-Петербург, 2006, Челябинск, 2008); I Всероссийская школа-конференция «Молодые ученые – новой России. Фундаментальные исследования в области химии и инновационная деятельность» (Иваново, 2005); XIX и XX Сопещания по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (Обнинск, 2006, Гатчина, 2008); I и II Региональные конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем (Крестовские чтения)» (Иваново, 2006, 2007); International Workshop on Nanobiotechnologies (Saint-Petersburg, 2006); VI Национальная конференция по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов (Москва, 2007); V International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (Moscow, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе статей в журналах из перечня ВАК – 3, препринтов и сообщений ПИЯФ – 3, тезисов докладов на отечественных и международных конференциях – 9.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, приложения, заключения и списка цитируемой литературы (196 наименований). Работа изложена на 168 страницах, включая 69 рисунков и 32 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи работы, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость.

Глава 1. Литературный обзор посвящен современным представлениям о структуре и физико-химических свойствах порфиринов и их аналогов, характеристикам их электронных спектров поглощения, комплексообразующим свойствам и перспективам их биомедицинского применения. Представлены обзоры по сенсбилизаторам для ФДТ на основе порфиринов и их аналогов, комплексообразующим свойствам поли-N-

виниламидов и ДНК, синтезу и применению магнитных жидкостей.

Глава 2. Объекты и методы исследования. Объектами исследования настоящей работы являлись водорастворимые порфирины и их аналоги: сульфированные дифталоцианины лютеция и скандия (рис. 1), сульфированный тетрафенилпорфин дигидрохлорид (рис. 2) и фотодитазин (рис. 3).

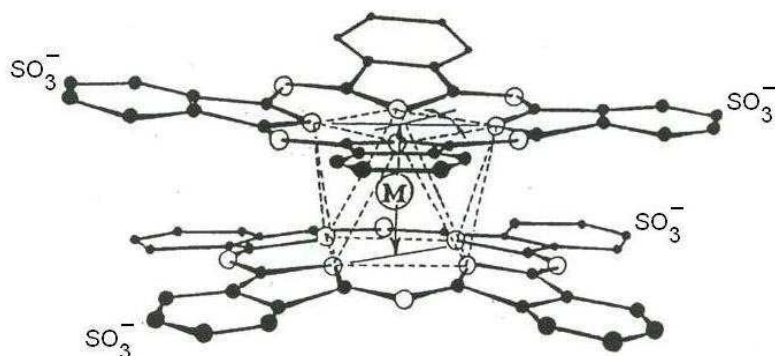


Рис. 1. Анион сульфированного дифталоцианина металла ($MPC_2S_4^{4-}$), $M = Lu$ или Sc

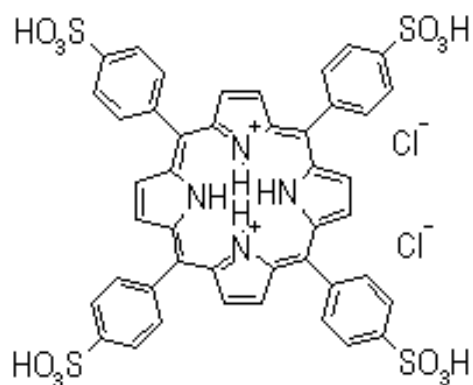


Рис. 2. Сульфированный тетрафенилпорфин дигидрохлорид ($H_2TPPS_4(HCl)_2$)

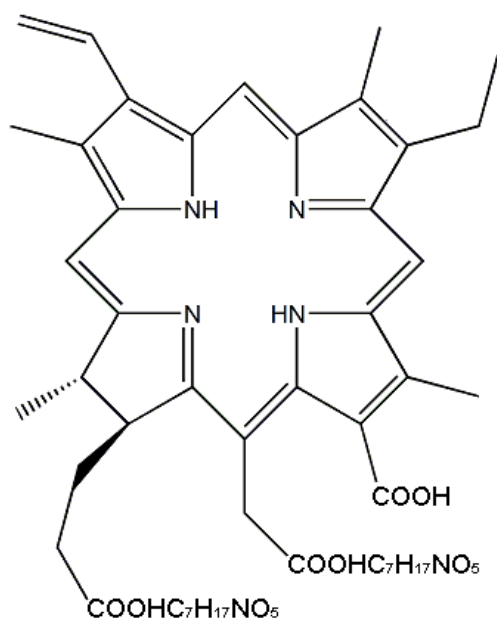


Рис. 3. Фотодитазин

Проанализированы возможности различных методов исследования структуры и физико-химических свойств растворов при изучении молекулярных комплексов и обоснован выбор гидродинамических, спектральных методов и метода малоуглового рассеяния нейтронов для решения поставленных задач.

Спектры поглощения порфиринов в видимой области чувствительны к комплексообразованию, поэтому анализ спектров поглощения (спектрофотометрическое титрование) использовали для установления образования комплексов порфирина-полимер и определения количественных характеристик связывания. Спектры поглощения служили также для проверки сохранения свойств фотодитазина в комплексе с феррочастицами. Использованы спектрофотометры СФ-26 и Hitachi U-3310 в области длин волн 250–1100 нм.

Гидродинамические методы (вискозиметрия, динамическое рассеяние света) использовались для оценки размеров и характеристики конформаций полимерных молекул. Для измерений вязкости использовали капиллярный вискозиметр Оствальда (при исследовании ПВП) и ротационный низкоградиентный вискозиметр Зимма (для ДНК). Динамическое рассеяние света проводили на длине волны 632.8 нм, используя анализатор Autosizer ПС (Malvern Instruments Ltd.) с углом рассеяния 90° и коррелятор PhotoCor-SP (углы рассеяния 30–110°).

Малоугловое рассеяние нейтронов является прямым методом, позволяющим расшифровать структуру образца на масштабах от единиц до сотен нанометров, определить размеры и форму составляющих его частиц (комплексов), установить пространственные корреляции между частицами. Нейтронные опыты проводились на двух дифрактометрах («Мембрана-2», реактор ВВР-М, ПИЯФ РАН, с диапазоном переданных импульсов $q = 0.03\text{--}0.8 \text{ нм}^{-1}$ при длине волны нейтронов $\lambda = 0.3 \text{ нм}$ и «Yellow submarine», Нейтронный центр Будапешта, $q = 0.1\text{--}4.3 \text{ нм}^{-1}$, $\lambda = 0.4, 0.75 \text{ нм}$).

Глава 3. Исследование взаимодействия сульфированных порфиринов и дифталоцианинов металлов с поли-N-винилпирролидоном и ДНК. Постановка задачи обусловлена антивирусными свойствами некоторых сульфированных порфиринов и их аналогов, в частности тетрафенилпорфина и дифталоцианинов лютеция и скандия. В связи с возможностью использования этих соединений в составе медицинских препаратов одной из важных задач является изучение взаимодействия их с различными биополимерами. В качестве такого полимера был выбран поли-N-винилпирролидон (ПВП), типичный полимер медицинского назначения, который входит в состав многих лекарственных препаратов и обладает выраженной способностью формировать молекулярные

комплексы, а также ДНК, с которой могут взаимодействовать порфирины в случае проникновения в живую клетку. Глава посвящена анализу взаимодействия сульфированного тетрафенилпорфина с ПВП и сульфированных дифталоцианинов лютеция и скандия с ДНК и исследованию структуры полученных комплексов порфирин-полимер.

3.1. Комплексы сульфированного тетрафенилпорфина с поли-N-винилпирролидоном. Методами спектрофотометрии в видимой области, вискозиметрии, динамического рассеяния света и холодных нейтронов анализировались водные растворы ПВП с добавлением сульфированного тетрафенилпорфина $H_2TPPS_4(HCl)_2$ (TPPS). Образование комплексов показано спектрофотометрическим титрованием водных растворов TPPS растворами ПВП при 20–90°C. Пример спектрофотометрического титрования при 20°C демонстрирует рис. 4. На основании вида графиков Скэтчарда и кривых связывания был сделан вывод о кооперативном характере ассоциации.

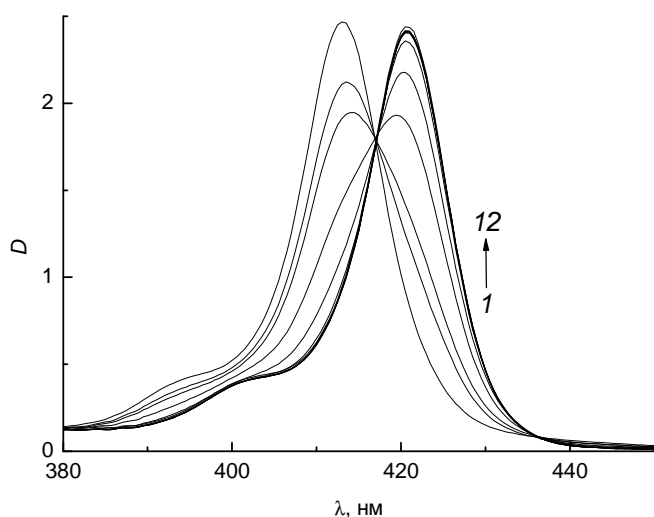


Рис. 4. Спектрофотометрическое титрование TPPS растворами ПВП в воде при 20°C. В ряду растворов 1-12 увеличивается концентрация ПВП (от 0 до 0.496 г/дл), концентрация TPPS фиксированная (4.920×10^{-6} М)

Методом малоуглового рассеяния нейтронов в области переданных импульсов $q = 0.1-4.3 \text{ нм}^{-1}$ исследованы тяжеловодные растворы ПВП, содержащие TPPS. Данные рассеяния нейтронов (зависимости сечений рассеяния σ от переданного импульса q) наилучшим образом аппроксимируются функцией

$$\sigma(q) = \frac{\sigma_1(0)}{1 + (R_c q)^2} + \frac{\sigma_2(0)}{(1 + (r_c q)^2)^2}, \quad (1)$$

где первое слагаемое соответствует модели Зимма для

гауссовой цепи с радиусом инерции $R_g = \sqrt{3}R_c$, а второе слагаемое характеризует плотные образования на масштабах в пределах сегмента полимерной цепи. $\sigma_1(0)$ и $\sigma_2(0)$ – составляющие сечения, экстраполированного к малым значениям импульса q , пропорциональные концентрации и сухому объему рассеивающих объектов. В растворах комплексов в диапазоне температур 20–90°C наблюдались явления ассоциации цепей

ПВП за счет невалентных взаимодействий с молекулами порфиринов, играющих роль внутри- и межцепных физических сшивок.

При измерениях вязкости (30°C) водных растворов ПВП с добавлением TPPS в пределе низких концентраций полимера обнаружен полиэлектролитный эффект – рост значений приведенной вязкости с понижением концентрации ПВП, означающий наличие в разбавленном растворе заряженных макромолекул ПВП за счет присоединения к ним молекул порфирина, несущих отрицательный заряд. Анализ результатов экспериментов и литературных данных (Кирш, 1998) о молекулярных взаимодействиях ПВП позволил заключить, что образование комплекса TPPS с ПВП в водных растворах происходит за счет водородных связей между поляризованными молекулами воды в гидратном слое полимера и отрицательно заряженными сульфогруппами порфирина, а также в некоторой степени ион-дипольных взаимодействий между компонентами.

Таким образом, появление заряда у полимерной цепи приводит к увеличению гидратного слоя вокруг нее и взаимному отталкиванию звеньев, что выражается в обнаруженном полиэлектролитном эффекте вязкости. Исследованные особенности конформации ПВП в составе комплекса представляются важными в связи с возможностью создания противовирусных препаратов на основе таких структур.

3.2. Исследование взаимодействия сульфированных дифталоцианинов лютеция и скандия с ДНК. Молекула ДНК является полианионом в водно-солевых растворах за счет своих фосфатных групп, поэтому в первом приближении не должна образовывать комплексы с отрицательно заряженными порфиринами и их аналогами, на что указывает и отсутствие литературных данных в этой области. Однако известно, что анионы сульфированных дифталоцианинов металлов ($MPC_2S_4^{4-}$) могут ассоциировать с биологическими и синтетическими объектами полимерной природы, поверхности которых несут отрицательный заряд (полистирольные латексы, модельные бислоиные липидные мембраны, монослой искусственного липида глицеролмоноолеата). Поэтому, несмотря на то, что ДНК не является основной мишенью для анионных порфиринов и их аналогов в случае их проникновения в клетку, установленная противовирусная активность MPC_2S_4 может определяться их взаимодействием в том числе и с ДНК. В связи с этим была поставлена задача исследовать взаимодействия между ДНК и сульфированными дифталоцианинами лютеция и скандия.

Спектрофотометрия и вискозиметрия растворов комплексов

Спектрофотометрическое титрование водно-солевых растворов (1 мМ NH_4Cl) $LuPC_2S_4$ и $ScPC_2S_4$ растворами ДНК в области длин волн 330–1100 нм показало небольшой

гипохромный эффект в полосе поглощения дифталоцианинов около 910 нм и небольшой гиперхромный эффект в полосе около 680 нм, без сдвига максимумов полос. Эти эффекты стабильно наблюдались в нескольких сериях опытов в исследованных системах, что достоверно указывает на взаимодействие MPC_2S_4 с ДНК.

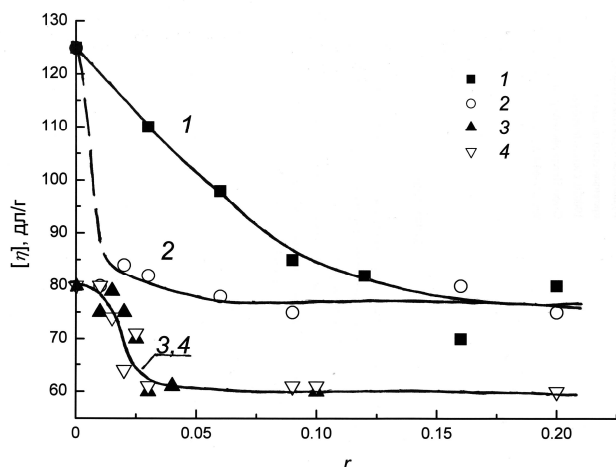


Рис. 5. Зависимость характеристической вязкости ДНК $[\eta]$ от r : 1 и 3 — с LuPc_2S_4 , 2 и 4 — с ScPc_2S_4 , 1 и 2 — в 1 мМ NH_4Cl , 3 и 4 — в 5 мМ NH_4Cl

По данным вискозиметрии в растворе (1 мМ NH_4Cl) добавление LuPc_2S_4 приводит к постепенному уменьшению характеристической вязкости ДНК $[\eta]$ от 130 до 80 дл/г. При введении ScPc_2S_4 величина $[\eta]$ падает до 80 дл/г уже при соотношении компонентов $r = 0.01$ (одна связанная молекула дифталоцианина на 100 пар оснований ДНК), и при дальнейшем увеличении r она не меняется (рис. 5).

В результате введения LuPc_2S_4 и ScPc_2S_4 в раствор происходит компактизация молекулы ДНК в составе комплексов почти в два раза по объему. Вискозиметрия при большей ионной силе (5 мМ NH_4Cl) дает меньший эффект компактизации ДНК — 25% (от 80 до 60 дл/г) при добавлении дифталоцианинов.

Малоугловое рассеяние нейтронов в растворах комплексов

Рассеяние нейтронов в диапазоне переданных импульсов $q = 0.1\text{--}3.0 \text{ нм}^{-1}$ измеряли на растворах ДНК при 20–40°C в тяжеловодной среде (D_2O , 1 мМ NH_4Cl) с добавлением ScPc_2S_4 . Экспериментальная область значений обратных импульсов $2\pi/q = 2\text{--}60 \text{ нм}$ была выбрана так, чтобы анализировать внутреннюю структуру макромолекулы на масштабах от поперечного диаметра нити ДНК до размера сегмента $L \sim 100 \text{ нм}$. В целом цепь ДНК (молекулярная масса 13 МДа, контурная длина $\sim 7 \text{ мкм}$, $N \sim 65$ сегментов Куна) имеет радиус инерции $R_{gDNA} = (NL^2/6)^{1/2} \sim 300 \text{ нм}$. Данные рассеяния нейтронов при 20°C показали изменение конформации ДНК в результате взаимодействия с молекулами ScPc_2S_4 . При $q < 1 \text{ нм}^{-1}$ интенсивность рассеяния $I(q)$ описывалась функцией Гинье

$$I(q) = I_0 e^{-\frac{(qR_g)^2}{3}}, \quad (2)$$

где параметр $I_0 = I_{q \rightarrow 0}$ пропорционален концентрации ДНК в растворе и сухому объему рассеивающего объекта – сегмента с радиусом инерции R_g . Установлено, что для комплекса ДНК + ScPc₂S₄ значение $R_{gcom} = 14.4 \pm 0.6$ нм на 20% ниже, чем $R_{gDNA} = 17.3 \pm 0.8$ нм для ДНК.

В области импульсов $q > 1$ нм⁻¹ распределение интенсивности подчиняется зависимости

$$I(q) = \frac{A}{q} e^{-\frac{(qr_g)^2}{2}}, \quad (3)$$

описывающей рассеяние на объектах типа жестких стержней. Фактор A/q характеризует рассеяние в пределе тонкого стержня с поперечным радиусом инерции сечения r_g . Приближение данных этой моделью показывает, что эффективный радиус ДНК при взаимодействии с ScPc₂S₄ увеличился в ~ 2 раза, от $r_{gDNA} = 0.70 \pm 0.09$ нм для ДНК (диаметр нити $D_{DNA} = 2\sqrt{2} r_{gDNA} \sim 2$ нм) до $r_{gcom} = 1.3 \pm 0.1$ нм для комплекса ДНК + ScPc₂S₄.

Увеличение поперечного размера нити ДНК может объясняться посадкой молекул ScPc₂S₄ на ее поверхность, что возмущает также ее конформационные свойства. Об этом свидетельствует обнаруженное уменьшение длины сегмента ДНК. В составе комплекса молекула ДНК становится менее жесткой, скручиваясь в более компактный клубок, что согласуется с данными для характеристической вязкости. Выводы, сделанные из данных, полученных при 20°C, справедливы и при более высоких температурах. Нагревание растворов до 40°C не возмущает существенно конформации ДНК и комплекса.

Динамическое рассеяние света

В тяжеловодных растворах (1 мМ NH₄Cl, 20°C) ДНК и комплексов ДНК + ScPc₂S₄ методом динамического рассеяния света были найдены коэффициенты диффузии и гидродинамические радиусы молекул по Стоксу: $D_\tau = (5.0 \pm 0.6) \times 10^{-9}$ см²/с, $R_h = 430 \pm 50$ нм для ДНК; $D_\tau = (9.1 \pm 1.0) \times 10^{-9}$ см²/с, $R_h = 240 \pm 30$ нм для комплекса. Введение ScPc₂S₄ вызвало уменьшение размеров молекулы ДНК почти в два раза, что находится в согласии с данными вискозиметрии в легкой воде и данными рассеяния нейтронов.

Таким образом, совокупность данных доказывает образование комплекса ScPc₂S₄ с ДНК. В составе комплекса, стабильного в водно-солевом растворе при 20–40°C, молекула ДНК является более компактной относительно свободного состояния. Установлено, что LuPc₂S₄, взаимодействуя с ДНК, также образует комплексы, но более слабые, чем ScPc₂S₄.

Анализ причин образования комплексов приводит к выводу, что наиболее вероятно

они формируются путем внешнего связывания молекул MPC_2S_4 с поверхностью ДНК, возможно, посредством гидрофобных взаимодействий между компонентами и водородных связей с участием молекул растворителя. При этом важную роль должны выполнять электростатические взаимодействия, на что указывает уменьшение эффекта компактизации при увеличении внешней ионной силы, при котором происходит экранировка фосфатных групп ДНК противоионами. Интеркаляция молекул дифталоцианинов между парами оснований ДНК маловероятна из-за сравнительно крупных размеров молекул дифталоцианинов. Уменьшение жесткости ДНК может быть вызвано частичным связыванием MPC_2S_4 с основаниями ДНК в ее бороздках, а также связыванием далеких по цепи, но сблизившихся в пространстве участков ДНК в местах нахождения MPC_2S_4 . Следует отметить также возможное влияние анионного эффекта, связанного с влиянием анионов на дальние взаимодействия в цепи ДНК.

Для ПВП и ДНК эффекты воздействия порфиринов и их аналогов на конформацию противоположные: для ПВП – распрямление цепи из-за присоединения зарядов и возникновения их отталкивания, в случае же заряженной нити ДНК дополнительная посадка зарядов того же знака в некоторых точках цепи, наоборот, уменьшает размеры молекулы. Дополнительные заряды могут вызывать ток противоионов внутрь клубка и частичную нейтрализацию, что ведет к сжатию клубка. Вокруг длинной заряженной нити ДНК образуется логарифмически спадающий электростатический потенциал, а посадка молекул дифталоцианинов может создавать дополнительные точечные центры поля с высоким градиентом потенциала ($1/r$), что может усиливать ток противоионов внутрь клубка.

Глава 4. Синтез, структура и свойства магнитных наноразмерных комплексов фотодитазина. Глава посвящена решению задач получения, исследования структуры и свойств феррожидкостей на основе наночастиц магнетита в качестве магнитоуправляемых носителей сенсбилизаторов для ФДТ, в частности фотодитазина.

В первой серии опытов были синтезированы и исследованы комплексы магнитной жидкости с другим порфирином – сульфированным тетрафенилпорфином дигидрохлоридом (TPPS), обладающим, помимо фотодинамической активности, антивирусными свойствами, что может быть использовано в дальнейшем при создании антивирусных препаратов с возможностью направленной доставки.

В ходе приготовления феррожидкостей частицы магнетита, полученные методом Массара (химическая конденсация солей Fe^{2+} и Fe^{3+}), стабилизировали одним из двух способов.

В первом случае активирование магнетита производили добавлением 2 М соляной кислоты при нагревании до 100°C. Полученный ферроколлоид хорошо связывает и TPPS, и фотодитазин, но ухудшает фототоксические свойства фотодитазина. В опытах на культурах клеток наблюдали отсутствие флуоресценции фотодитазина в комплексе с магнитной жидкостью этого типа и воздействия на клетки, что свидетельствовало о потере фотодитазином способности генерировать синглетный кислород, хотя избирательность накопления препарата в опухолевых клетках сохранялась.

Было установлено, что для использования в биомедицинских целях оптимальным является другой метод стабилизации магнетита – смесью растворов лимонной кислоты и гидрофосфата натрия. Комплексы полученной таким способом феррожидкости с фотодитазином в водной среде (90% D₂O и 10% H₂O по объему) исследовали методом малоуглового рассеяния нейтронов (дифрактометры «Мембрана-2» и «Yellow Submarine»). Для повышения эффективности и биологической совместимости препарата в состав комплексов вводили плуроник (тройной блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида), способный связывать фотодитазин и увеличивать его фототоксичность в модельных системах. Были изучены 4 образца магнитных коллоидов различного состава: 1 – ферроколлоид, 2 – ферроколлоид с плуроником, 3 – ферроколлоид с плуроником и фотодитазином, 4 – ферроколлоид с фотодитазином. Зависимости сечения рассеяния нейтронов σ от переданного импульса q (рис. 6) на образцах 1 и 4 (без плуроника) удовлетворительно описываются функцией, характеризующей кластерные структуры феррочастиц

$$\sigma(q) = \frac{\sigma(0)}{(1 + (qR_c)^2)^2} \left(1 + \sum_{i=1}^5 A_i \frac{\sin qR_i}{qR_i} \right), \quad (4)$$

где $\sigma(0)$ – сечение рассеяния в нулевой угол, $\frac{1}{(1 + (qR_c)^2)^2}$ – формфактор частицы магнетита с радиусом корреляции R_c , связанным с ее геометрическим радиусом соотношением $R = \sqrt[4]{9/2} R_c \approx 1.5R_c$. Функция $1 + \sum_{i=1}^5 A_i \frac{\sin qR_i}{qR_i}$ – структурный фактор, описывающий парные пространственные корреляции частиц на пяти различных характерных расстояниях R_i . A_i – среднее количество частиц, коррелирующих с любой выбранной частицей на расстоянии R_i .

Данные рассеяния на образцах 2 и 3, содержащих плюроник, подчиняются качественно другой структурной модели, которой отвечает закон рассеяния

$$\sigma(q) = \left(s_1 \frac{3(\sin qr_1 - qr_1 \cos qr_1)}{(qr_1)^3} + s_2 \frac{3(\sin qr_2 - qr_2 \cos qr_2)}{(qr_2)^3} \right)^2 \left(1 + A \frac{\sin qR_m}{qR_m} \right). \quad (5)$$

Здесь формфактор характеризует сферические образования (кластеры) в виде

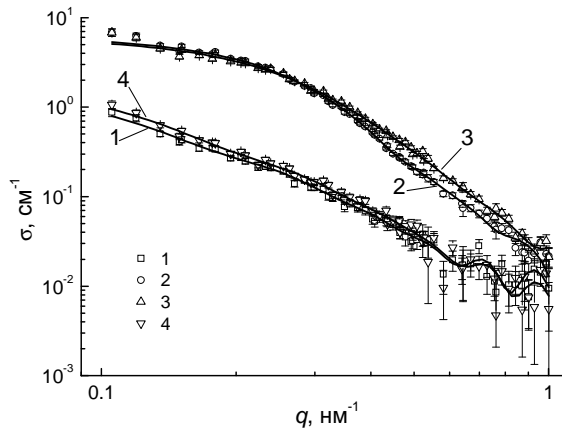


Рис. 6. Сечения рассеяния на образцах 1–4 в зависимости от переданного импульса q

центральной частицы магнетита (радиуса r_1) с оболочкой (радиуса r_2), внутри которой находятся другие магнитные частицы, окруженные плюроником. Структурный фактор описывает корреляции кластеров на характерном расстоянии R_m . Состав образцов и параметры аппроксимации данных рассеяния функциями (4, 5) приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Состав и структурные параметры образцов 1 и 4 (без плюроника)

Образец	$C_{\text{магн}}$, г/дл	$C_{\text{плюр}}$, г/дл	$C_{\text{фот}}$, г/дл	$\sigma(0)$, см^{-1}	R_c , нм	A_1	R_1 , нм
1	2.49	0	0	0.18 ± 0.03	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.3	8.0 ± 0.4
4	2.49	0	0.049	0.29 ± 0.09	2.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4	7.9 ± 0.7

Образец	A_2	R_2 , нм	A_3	R_3 , нм	A_4	R_4 , нм	A_5	R_5 , нм
1	2.0 ± 0.4	14.2 ± 0.7	2.3 ± 0.5	20.6 ± 0.6	2.4 ± 0.6	28.3 ± 0.6	1.3 ± 0.4	36.7 ± 1.0
4	1.4 ± 0.6	14.1 ± 1.2	1.9 ± 0.7	20.2 ± 0.8	2.0 ± 0.6	28.2 ± 0.7	0.9 ± 0.4	37.5 ± 1.3

В образцах 1 и 4 (без плюроника) частицы магнетита диаметром $2R_p = 6-7 \text{ нм} \approx 3R_c$ формируют кластеры с характерными расстояниями между центрами частиц 8, 14, 20, 28, 37 нм ($R_1 - R_5$), приближенно кратными их диаметрам. Значения параметров $A_{1-4} \sim 2$ показывают, что в системе каждая феррочастица в среднем имеет на каждом из характерных расстояний R_{1-4} примерно две соседние частицы, что реализуется в цепных кластерах. Параметр $A_5 < 2$ показывает, что пространственная корреляция, присущая цепному кластеру, нарушается на расстоянии $\sim R_5$, составляющем около 5 диаметров частицы. Следовательно, кластеры представляют собой цепные структуры, включающие до 10 частиц. Введение фотодитазина в систему (образец 4) слабо возмущает структурные параметры образца, ослабляя тенденцию к ассоциации частиц.

Состав и структурные параметры образцов 2 и 3 (с плуроником)

Образец	$C_{\text{магн}}$, г/дл	$C_{\text{плур}}$, г/дл	$C_{\text{фот}}$, г/дл	s_1 , см ^{-1/2}	r_1 , нм	s_2 , см ^{-1/2}	r_2 , нм	A	R_m , нм
2	2.49	0.54	0	0.53 ± 0.09	3.1 ± 0.4	1.02 ± 0.07	7.3 ± 0.4	1.77 ± 0.12	9.08 ± 0.11
3	2.50	0.51	0.049	0.74 ± 0.06	3.57 ± 0.19	1.02 ± 0.05	8.0 ± 0.4	0.96 ± 0.12	9.7 ± 0.3

Образцы 2 и 3 (с плуроником) содержат феррочастицы тех же размеров $2r_1 \approx 2R_p \sim 6\text{--}7$ нм, покрытые оболочкой плуроника. Взаимодействие полимерных оболочек приводит к образованию глобулярных кластеров, строение которых описывается сферически симметричной моделью в виде центральной частицы с оболочкой, имеющей внешний диаметр $\sim 15\text{--}16$ нм ($2r_2$). Расчеты с учетом вкладов центральной частицы и

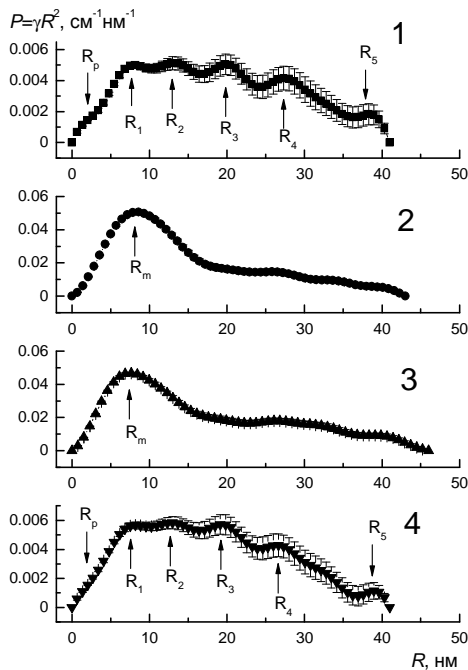


Рис. 7. Корреляционные функции образцов 1–4 в зависимости от расстояния R

корреляционные функции феррожидкостей (рис. 7) подтверждают наличие цепных корреляций в системах без плуроника. Введение плуроника радикально меняет структуру ферроколлоида: вместо протяженных цепных кластеров доминируют компактные глобулярные структуры. Об этом свидетельствует исчезновение множества максимумов, отвечающих радиусам корреляции R_{1-5} , и появление единственного максимума, соответствующего радиусу глобулярного кластера.

оболочки в рассеяние, s_1 и s_2 , и плотностей длин ядерного рассеяния для компонентов системы показали, что в оболочке кроме плуроника содержится около 6 частиц магнетита, ассоциированных с центральной частицей. Таким образом, основным структурным элементом системы является сборка из примерно 7 частиц магнетита, окруженных оболочкой из плуроника. В феррожидкостях 2 и 3 существуют корреляции между сборками на расстоянии $R_m \sim 10$ нм, следовательно, в растворе преобладают малые группы из $(A+1) \sim 2\text{--}3$ борок. Как видно из данных табл. 2, фотодитазин ослабляет взаимодействия частиц (образец 3), как и в случае образцов без плуроника.

Восстановленные из данных рассеяния

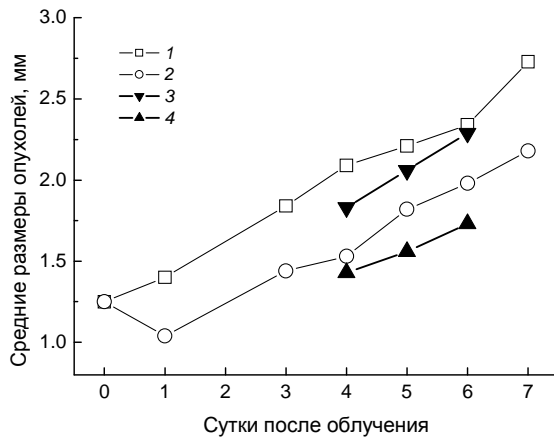


Рис. 8. Динамика размеров опухолей после ФДТ. 1 – контрольная группа, 2 – использование фотодитазина, 3 – магнетит + фотодитазин, 4 – магнетит + фотодитазин + магнитное поле

доставке магнитным полем становится выше по сравнению с исходным фотодитазином. Использование плуроника в составе комплексов увеличивает терапевтическое воздействие, наблюдались случаи полного исчезновения опухоли (вместе с лапкой, из-за ее небольших размеров, некротическая ампутация) уже на третьи сутки после облучения. На седьмые сутки после облучения в группе животных с применением плуроника опухоль на лапке оставалась только у 3 из 10 животных. Отмечено воздействие препарата на область, не подвергавшуюся ФДТ (другая лапка) с перевитой опухолью (системный эффект).

Использование фотодитазина в составе препарата, содержащего магнетит, открывает перспективу совместного применения методов ФДТ и гипертермии для воздействия на опухоль, когда происходит также термическая гибель клеток, вызванная нагреванием частиц магнетита лазерным облучением или приложенным внешним магнитным полем. Комплексное применение двух методов способно дать еще больший эффект при лечении онкологических заболеваний.

В приложении приведен расчет состава оболочки магнитных частиц с плуроником и фотодитазином по данным рассеяния нейтронов.

Заключение

1. Установлено образование комплексов сульфированного тетрафенилпорфина с поли-N-винилпирролидоном с использованием методов рассеяния нейтронов, спектрофотометрии и молекулярной гидродинамики. Определен характер

Функциональные свойства

полученных феррожидкостей были тестированы в ходе доклинических испытаний на мышах с перевитой опухолью Эрлиха в лапках. Сравнительная динамика размеров опухоли после ФДТ при использовании образцов без плуроника показана на рис. 8. Установлено, что хотя магнетит несколько снижает эффективность фотодитазина (на него, вероятно, приходится часть синглетного кислорода), эффективность такого препарата при его направленной

конформационных изменений полимера, установлен кооперативный характер и найдены количественные характеристики связывания. Показано, что в разбавленных водных растворах макромолекулы полимера являются полиэлектролитными вследствие присоединения к ним молекул тетрафенилпорфина посредством водородных связей сульфогрупп порфирина с поляризованными молекулами воды из гидратной оболочки полимера.

2. Впервые получены и исследованы комплексы анионных сульфированных дифталоцианинов металлов (MPC_2S_4) с ДНК. Методом малоуглового рассеяния нейтронов установлена ассоциация молекул $LuPc_2S_4$ и $ScPc_2S_4$ с ДНК, что ведет к увеличению наблюдаемого поперечного диаметра, к уменьшению жесткости и к компактизации цепи ДНК в водно-солевом растворе, подтвержденной данными вискозиметрии и динамического рассеяния света. Предложены гипотезы, которые объясняют наблюдаемые эффекты ассоциации.
3. Разработаны биосовместимые магнитные жидкости на основе магнетита, стабильные в диапазоне температур 20–70°C и сохраняющие функциональные свойства фотодитазина как фотосенсибилизатора.
4. Установлены структурные особенности магнитных коллоидов методом рассеяния нейтронов в зависимости от состава и условий синтеза. Определены размеры и строение кластерных структур магнетита. Из анализа данных рассеяния нейтронов в импульсном и реальном пространстве найдены корреляционные функции и построены структурные модели наноразмерных ассоциатов феррочастиц.
5. Впервые создан магнитоуправляемый сенсбилизатор, содержащий фотодитазин и плуроник, адаптированный для применения в фотодинамической терапии. Определено строение комплекса, размеры составляющих комплекс частиц и комплекса в целом.
6. В серии доклинических испытаний фотодитазина в комплексах с магнитным носителем и плуроником установлено его повышенное терапевтическое действие на опухолевые клеточные культуры, показано торможение роста размеров опухолей у мышей по сравнению с результатами традиционной терапии с использованием чистого фотодитазина, что свидетельствует об увеличении эффективности препарата в составе комплекса. Отмечено повышение эффективности комплекса фотодитазина с магнетитом с применением внешнего магнитного поля для доставки препарата к опухоли.

Публикации по теме диссертации

1. Сибилева М. А., Кульвелис Ю. В., Сибилев А. И., Москалев П. Н., Пешехонов В. Т. Конформация молекулы ДНК в водно-солевом растворе в присутствии сульфированного дифталоцианина скандия. III Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2004». 27 января – 1 февраля 2004 г. Москва. Сборник материалов конференции. Т. 1. С. 303.
2. Sibileva M. A., Kul'velis Yu. V., Sibilev A. I., Moskalev P. N. Complexes of sulfonated lutecium and scandium diphthalocyanines with poly(N-vinylcaprolactam) and DNA // Russ. J. Phys. Chem. — 2005. — V. 79. Suppl. 1. — P. S60—S65.
3. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Тörök Gy., Москалев П. Н., Сибилев А. И. Исследования взаимодействия ДНК с сульфированными дифталоцианинами лютеция и скандия методами спектрофотометрии, вискозиметрии и рассеяния нейтронов. I Всероссийская школа-конференция «Молодые ученые – новой России. Фундаментальные исследования в области химии и инновационная деятельность». 26–29 сентября 2005. Иваново. Материалы конференции. С. 131.
4. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Тörök Gy., Сибилев А. И., Москалев П. Н., Мельников А. Б. Механизмы взаимодействия ДНК и биополимеров с порфиринами: данные нейтронного рассеяния и физико-химических методов. XIX Совещание по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния. 12–15 сентября 2006. Обнинск. Сборник материалов совещания. С. 73.
5. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Сибилев А. И., Москалев П. Н., Торок Д., Мельников А. Б. Исследование структуры водно-солевых растворов ДНК с сульфированным дифталоцианином скандия. Препринт ПИЯФ-2669. Гатчина, 2006. 20 с.
6. Kulvelis Yu. V., Lebedev V. T., Sibilev A. I., Moskalev P. N., Török Gy., Klyubin V. V. Poly-N-vinylpyrrolidone complexes with sulfonated tetraphenylporphines. Saint-Petersburg International Workshop on Nanobiotechnologies, 27–29 November 2006. St-Petersburg. Abstracts. P. 82.
7. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Торок Д., Мельников А. Б. Образование комплексов ДНК и поли-N-виниламидов с водорастворимыми порфиринами и фталоцианинами. Четвертая Всероссийская Каргинская конференция «Наука о полимерах 21-му веку», 29 января – 2 февраля 2007. Москва. Сборник материалов конференции. Т. 2. С. 396.
8. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Торок Д., Мельников А. Б. Исследование структуры водно-солевых растворов ДНК с сульфированным дифталоцианином скандия // Журн. структ. химии. 2007. — Т. 48. № 4. — С. 789—795.

9. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Торок Д., Клубин В. В. Комплексы поли-N-винилпирролидона с сульфированными тетрафенилорфинами // Кристаллография. — 2007. — Т. 52. № 3. — С. 515—518.
10. Кульвелис Ю. В., Трунов В. А., Лебедев В. Т., Орлова Д. Н., Гельфонд М. Л., Мелик-Нубаров Н. С., Жиентаев Т. М. Исследование мезоструктуры феррожидкостей с порфиринами и их возможное применение в фотодинамической терапии онкологических заболеваний. VI Национальная конференция по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов. 12–17 ноября 2007. Москва. Материалы конференции. С. 294.
11. Кульвелис Ю. В., Трунов В. А., Лебедев В. Т., Орлова Д. Н., Гельфонд М. Л., Мелик-Нубаров Н. С., Жиентаев Т. М. Синтез и исследование мезоструктуры феррожидкостей с порфиринами и их возможное применение в фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Препринт ПИЯФ-2736. Гатчина, 2007. 21 с.
12. Кульвелис Ю. В., Трунов В. А., Лебедев В. Т., Орлова Д. Н., Торок Д., Гельфонд М. Л., Мелик-Нубаров Н. С., Жиентаев Т. М. Синтез и исследование структуры комплексов феррожидкостей с фотодитазином и перспективы их применения в фотодинамической терапии. XIV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул. 15–21 июня 2008. Челябинск. Материалы конференции. С. 144.
13. Kulvelis Yu. V., Trunov V.A., Lebedev V.T., Orlova D.N., Török Gy., Gelfond M.L., Melik-Nubarov N. S., Zhiyentayev T. M. Synthesis and structural study of ferrofluid complexes with photodithazine and their future application in photodynamic therapy. V International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines. 6–11 July 2008. Moscow. Abstracts. P. 438.
14. Кульвелис Ю. В., Трунов В. А., Лебедев В. Т., Орлова Д. Н., Торок Д., Гельфонд М. Л., Мелик-Нубаров Н. С., Жиентаев Т. М. Разработка препаратов для повышения эффективности фотодинамической терапии (ФДТ). XX совещание по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния. 3–19 октября 2008. Гатчина. Сборник материалов совещания. С. 72.
15. Кульвелис Ю. В., Лебедев В. Т., Трунов В. А., Гельфонд М. Л. Синтез и исследование структуры и свойств магнитных наноккомплексов фотодитазина. Сообщение ПИЯФ-2799. Гатчина, 2009. 29 с.
16. Кульвелис Ю. В., Трунов В. А., Лебедев В. Т., Орлова Д. Н., Гельфонд М. Л. Синтез и исследование структуры феррожидкостей с порфиринами и перспективы их применения в фотодинамической терапии // Поверхность. Рентген., синхр. и нейтр. иссл. — 2009. — № 5. — С. 55—62.