

А.Л. Петрановська¹, Є.В. Пилипчук¹, П.П. Горбик¹, О.М. Кордубан²

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ОРТО-ТІОКАРБОРАНУ НА НАНОКОМПОЗИТАХ МАГНЕТИТУ, ДОПОВАНИХ ОКСИДОМ ГАДОЛІНІЮ

¹ Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, E-mail: petranovska@ukr.net

² Інститут металофізики ім. Г.В. Курдюмова Національної академії наук України
пр. Академіка Вернадського, 36, Київ, 03142, Україна

Запропоновано спосіб іммобілізації орто-тіокарборану ($C_2B_{10}H_{11}SH$) на поверхні наноконкомпозитів складу Fe_3O_4/Gd_2O_3 за реакцією тіол-дисульфідного обміну. Для одержання вільних $-SH$ груп поверхня наноконкомпозитів Fe_3O_4/Gd_2O_3 попередньо модифікувалась мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою. Встановлено число реакційноздатних тіольних груп на поверхні наноконкомпозитів, а також кількість іммобілізованого орто-тіокарборану. Структуру синтезованих наноконкомпозитів підтверджено комплексом фізико-хімічних методів аналізу.

Ключові слова: нейтронозахватний агент, магнетит, гадоліній, карборан, модифікування, біосумісні покриття, B- та Gd-вмісні наноматеріали

ВСТУП

Нейтронозахватна терапія – спосіб лікування онкологічних захворювань, ідея якого була висловлена Г. Лочером ще у 1936 р., проте, є особливо актуальною сьогодні, оскільки розвиток нанотехнологій може значно поліпшити ефективність терапевтичних заходів. Суть ідеї полягає в наступному: якщо ввести в ракові клітини препарат, що містить стабільний ізотоп бору ^{10}B , а потім обробити його потоком теплових нейтронів, у результаті атом бору, захопивши нейтрон, перетворюється на радіоактивний ізотоп, який розпадається з утворенням літію, α -частинки (ядра гелію) і γ -кванта. Оскільки енергія γ -квантів складає не більше 17 % усієї енергії, що виділяється, основну лікувальну дію спричиняють α -частинки і ядра 7Li . Їхньою перевагою є невелика довжина пробігу (сумірна з розміром клітини), тому здорові клітини, що не містять у достатній концентрації атоми ефективного захоплювача нейтронів – бору або гадолінію, не руйнуються. Атоми бору мають переріз захоплення теплових нейтронів на 4–7 порядків вище, ніж атоми вуглецю, водню, кисню, азоту, що входять до складу біомолекул, з яких побудовані усі клітини [1]. Переріз захоплення теплових нейтронів ^{10}B – 3840 барн ($10^{-28} m^2$), ^{16}O – 0.00019 барн, ^{12}C –

0.0035 барн, 1H – 0.333 барн, ^{14}N – 1.83 барн. Найбільший переріз захоплення теплових нейтронів має ізотоп гадолінію ^{157}Gd – 254000 барн [2, 3]. Тому згубне для тканин вторинне випромінювання не спричиняє руйнівної дії на клітини, що не містять надлишкової кількості бору або гадолінію.

Таким чином, основна проблема нейтронозахватної терапії – отримання нетоксичних препаратів або наноконкомпозитів, що мають високі нейтронозахватні властивості і здатність селективно проходити в пухлинні клітини.

Препарати, що вводяться в тканини живого організму, повинні бути водорозчинні і нетоксичні. Тому дослідники на початку 50-х років зосередили свою увагу на борній кислоті та її похідних, так званих препаратах першого покоління. Однак у клінічних випробуваннях вони виявилися неефективними, перш за все, тому, що не забезпечували необхідну (досить високу) концентрацію атомів бору в пухлинах. Отже, потрібні були сполуки бору з великим числом його атомів в молекулі, здатні проникати в ракові клітини і затримуватися там, але такі, що не мають вираженої біологічної активності. У складі різних наноконкомпозитів в нейтронозахватній терапії як носії бор- або гадолінійвмісних сполук можуть

використовуватися нанотрубки, фулерени, різні органічні дендримери, вуглецеві і кремнієві нанодропи, ліпосоми, а також полімерні сполуки (наприклад, білкові вірусні капсиди або інші білки невірусного походження) [4].

На сьогоднішній день існує широкий вибір засобів на основі Gd та B, які використовуються в клінічній практиці. Здійснено поділ таких матеріалів на тих, які існують у молекулярній формі [5–7], та таких, які базуються на використанні нанорозмірних систем [8–14]. Хоча така класифікація умовна і не завжди відповідає реальному стану справ (деякі молекули за своїми розмірами можуть сягати декількох нанометрів), вона дозволяє краще прослідкувати розвиток наукових підходів до розробки засобів НЗТ [15–19].

Орто-карборан – борорганічна сполука складу $C_2B_{10}H_{12}$, безбарвна кристалічна речовина зі слабким запахом камфори, температура топлення 287–293 °С. Сполука є стійкою до дії сильних кислот і основ, а також окисників, витримує нагрівання до 450 °С. *Орто*-карборан має структуру майже правильного ікосаедра (грец. *eikosi* – двадцять, *hedra* – грань). Це багатогранник, зібраний з двадцяти трикутників і має дванадцять вершин. Основна властивість карборану полягає в тому, що валентні електрони, що зв'язують атоми бору і вуглецю, не належать конкретним атомам, а розподілені по всьому каркасу молекули, тобто делокалізовані. Вказана властивість є основною ознакою ароматичності, в даному випадку ароматичність має об'ємна структура, таким чином, карборан являє собою приклад об'ємної ароматичності. Єдина замкнута електронна система призводить до стабілізації молекули і є причиною високої хімічної стійкості каркаса. Електронна густина у карборані розподілена нерівномірно. Атоми вуглецю несуть позитивний заряд, в результаті водень в С-Н зв'язку набуває кислого характеру і легко заміщується лужним металом. Поява *орто*-карборану буквально відкрила в хімічній науці нову главу, присвячену сполукам, які мають об'ємну ароматичність та побудовані за допомогою трицентрових зв'язків. З точки зору біофункціоналізації, важливим похідним *орто*-карборану є *орто*-тіокарборан – $C_2B_{10}H_{11}-SH$.

Перетворення карборану вивчені досить детально, і тому шляхи його спрямованого хімічного модифікування багато в чому визначені [20–22]. Найбільш бажаними, згідно біохімічних досліджень [23, 24], функціональними групами, які повинні забезпечити накопичення препарату в пухлинних клітинах, є тіольні- (-SH), аміно-(-NH₂), ізоціанатні (-NCO), карбоксильні (-COOH) і ізоціанатні (-NCS) групи. Крім того, вирішальне значення може мати розташування функціональних груп відносно боранового ядра.

Розвиток нанотехнологій сприяє залученню наявних напрацювань у галузі хімії карборану до створення новітніх високоефективних терапевтичних засобів для нейтронозахватної терапії, здатних проходити крізь мембрани судин в пухлинні клітини і накопичуватися в них у високій концентрації.

Ефективне вирішення проблеми спрямованої доставки препаратів можливе за допомогою магнітного поля з використання магніточутливих наноконструктивів. Крім того, в деяких випадках за рахунок використання магнітних наночастинок можна досягнути розширення властивостей отриманих композитів. Прикладом такого розширення є можливість мультимодальної МРТ діагностики в T_1/T_2 режимах в наноконструктивах з ядром Fe_3O_4 та вкритих Gd.

Метою роботи є синтез B- та Gd-вмісних наноматеріалів, перспективних для їх застосування в НЗТ та МРТ.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Найбільш поширений спосіб отримання наночастинок магнетиту - рідиннофазовий, в основу якого покладено процес співосадження солей двох-і тривалентного заліза водним розчином амоніаку. Розмір одержуваних частинок складає від 3 до 23 нм при середньому розмірі ~ 10.8 нм. У цій області розмірів частинки магнетиту при кімнатній температурі знаходяться в суперпарамагнітному стані. Вони характеризуються практично нульовою залишковою намагніченістю (M_r). Така характеристика важлива для медико-біологічних застосувань, наприклад, при направленому транспорті лікарських препаратів по кровоносних судинах малого

діаметра, в яких вкрай небажана агрегація частинок.

Синтез нанокompозиту магнетит/гадоліній. Допування поверхні магнетиту іонами гадолінію здійснювали за допомогою солі-нітрату гадолінію. До розчину суміші солей двох-і тривалентного заліза (1 М : 2 М) додавали 1 моль розчину $Gd(NO_3)_3$, ретельно перемішували, нагрівали до 80–90 °С і повільно осаджували розчином амоніаку при постійному перемішуванні. Утворений осад нанокompозиту Fe_3O_4/Gd_2O_3 промивали дистильованою водою до нейтрального рН та відділяли за допомогою постійного магніту, обробляли ультразвуком двічі, з перервою 5–10 хв, протягом 5 хв. Середній розмір частинок складав ~ 13 нм.

Модифікування нанокompозиту магнетит/гадоліній мезо-2,3-димеркапто-сукциновою кислотою. До суспензії нанодисперсного Fe_3O_4/Gd_2O_3 в толуолі додавали розчин мезо-2,3-димеркапто-сукцинової кислоти (ДМСК) (співвідношення 1:1) в диметилсульфоксиді (ДМСО). Реакцію проводили протягом 30 хв при кімнатній температурі протягом 24 год, осад $Fe_3O_4/Gd_2O_3/ДМСК$ промивали етанолом, дистильованою водою.

Кількісний аналіз функціональних –SH груп здійснено методом йодометричного титрування. Наважку одержаного нанокompозиту (0.03 г) розчиняли у 20 мл ДМСО. Додавали 50 мл 0.1н розчину йоду. Паралельно проводили контрольний дослід. Суміш витримували протягом 30 хв за кімнатної температури при перемішуванні у закритій ємності без доступу світла. Надлишок йоду відтитровували 0.1 н розчином тіосульфату натрію у присутності крохмалю. Вміст тіольних груп (%) розраховували за формулою:

$$(V_{\text{хол.}} - V_0) NM \cdot 100 / g \cdot 1000,$$

де $V_{\text{хол.}}$ та V_0 – об'єми розчинів тіосульфату натрію, витрачені на титрування контрольного розчину та проби відповідно, мл; N – нормальність розчину тіосульфату натрію; M – мольна маса тіолу; g – наважка нанокompозиту, г.

Імобілізація тіолів за реакцією тіол-дисульфідного обміну. Співвідношення реагентів у реакції тіол-дисульфідного обміну корелює (1:1) з кількістю тіольних

функціональних груп поверхні. Реакція проводиться у буферному розчині (рН = 8) протягом 2 год для утворення інтермедіатної сполуки з дисульфідним зв'язком. В результаті реакції утворюється піридин-2-тіон, який, не вступаючи в подальші реакції, може виступати показником повноти проходження реакції активації поверхні.

Імобілізація орто-тіокарборану (Merck Schuchardt) на поверхні нанокompозиту. Імобілізацію орто-тіокарборану ($C_2B_{10}H_{11}SH$) на поверхні магніточутливого нанокompозиту здійснено за реакцією тіол-дисульфідного обміну. На першому етапі проведена активація поверхні наночастинок, вкритих ДМСК, 2,2'-дипіридилдисульфідом із утворенням піридилдисульфід-активованого ДМСК покриття. Наважку дипіридил-дисульфід розчиняли у суміші фосфатного буферу (рН 7.2) та етанолу (2:3). Поступово при перемішуванні додавали нанокompозит $Fe_3O_4/Gd_2O_3/ДМСК$ ($g = 30$ мг). Реакція відбувається за кімнатної температури протягом 8 год. Одержаний осад промивали фосфатним буфером до зникнення жовтого забарвлення в промивних водах.

На другому етапі відбувається реакція карборану (0.04 ммоль) у суміші фосфатного буферу та етанолу (2:3) з активованою поверхнею наночастинок, яка призводить до утворення нанокompозиту складу $Fe_3O_4/Gd_2O_3-S-S-H_{11}B_{10}C_2$. Реакція проведена при кімнатній температурі протягом 5 год у динамічному режимі, одержаний нанокompозит промивали фосфатним буфером.

Фізичну імобілізацію орто-тіокарборана здійснювали методом імпрегнації з спиртового розчину карборану (0.04 ммоль) у 20 мл етанолу на роторному випаровувачі при 30 °С (наважка композиту $Fe_3O_4/Gd_2O_3/ДМСК$ складала $g = 50$ мг).

Імобілізацію 2-меркаптонікотинової кислоти ($C_6H_4NO_2SH$) (Merck Schuchardt) на поверхні магніточутливого нанокompозиту $Fe_3O_4/Gd_2O_3/ДМСК$ здійснено реакцією тіол-дисульфідного обміну за методикою, вказаною вище.

На другому етапі відбувається реакція 2-меркаптонікотинової кислоти (6.4 мг = 0.04 ммоль) з модифікованою поверхнею наночастинок, яка призводить до утворення нанокompозиту складу

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3\text{-S-S-NO}_2\text{H}_4\text{C}_6$. Повнота проходження реакції контролювалася спектрофотометрично за концентрацією піридин-2-тіону, утвореного в ході реакції.

Фізичні методи дослідження нанокмпозитів. Спектрофотометричний (СФ) аналіз. Вимірювання оптичної густини (D) та запис спектрів поглинання піридилтіону ($\lambda = 343$ нм, $\epsilon = 8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) здійснено на Spectrometer Lambda 35 UV/Vis Perkin Elmer Instruments.

Рентгенофазовий аналіз (РФА) проводили методом порошкової дифрактометрії на автоматизованому приладі ДРОН-УМ1 з геометрією зйомки за Бреггом-Брентано у випромінюванні $\text{CoK}\alpha$ лінії аноду ($\lambda = 1.79021 \text{ \AA}$) з Fe фільтром у відбитому пучку. Значення середнього розміру областей когерентного розсіювання або кристалітів оксидів заліза, були розраховані за методикою, заснованою на рівнянні Шеррера.

Метод рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (РФС). Електронний спектрометр ЕС-2402 з енергоаналізатором ($E_{\text{MgK}\alpha} = 1253.6 \text{ eV}$, $P = 200 \text{ Вт}$, $\rho = 2 \cdot 10^{-7} \text{ Па}$) RHOIBOS-100_SPECS. Спектрометр оснащений іонною гарматою IQE-11/35 і джерелом повільних електронів FG-15/40 для компенсації зарядки поверхні діелектриків.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНС ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток нанотехнологій сприяє залученню наявних напрацювань у галузі хімії карборану до створення новітніх високоефективних терапевтичних засобів для нейтронозахватної терапії, здатних проходити крізь мембрани судин в пухлинні клітини і накопичуватися в них у високій концентрації. Перспективним напрямком створення таких засобів є іммобілізація молекул карборану на поверхні магніточутливого носія з вмістом гадолінію [25, 26].

Хімічне конструювання наночастинок магнетиту проводилось у три етапи: допування магнетиту іонами гадолінію, модифікування композиту $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3$ мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою для отримання вільних -SH груп на поверхні та подальшою функціоналізацією поверхні нанокмпозиту $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3$ /ДМСК орто-тіокарбораном за реакцією тіол-

дисульфідного обміну з дипіридил-дисульфідом.

При допуванні магнетиту іонами гадолінію, на поверхні нанорозмірних частинок магнетиту утворюється аморфна фаза оксиду/гідроксиду гадолінію, яка після термічної обробки ($T \sim 900\text{--}1000 \text{ }^\circ\text{C}$) перетворюється в фазу GdFeO_3 . Метод рідинно-фазового співосадження солей Gd^{3+} , Fe^{2+} і Fe^{3+} дозволяє регулювати вміст гадолінію в композиті. Так, при додаванні 1 моля солі гадолінію товщина оболонки складає ~ 1.9 нм, а на частинках з подвоєним вмістом гадолінію (2 моля) – ~ 5.0 нм. Середній розмір частинок нанокмпозиту становить 12.9 нм (при додаванні 1 моля солі гадолінію). Магнітні характеристики синтезованих нанокмпозитів корелюють з відповідними даними магнетиту [27].

SH-групи органічних сполук мають високу та різноманітну реакційну здатність: легко окиснюються з утворенням дисульфідів, сульфенових, сульфінових або сульфокислот; легко вступають в реакції алкілування, ацилювання, тіол-дисульфідного обміну, утворюють меркаптиди (при реакції з іонами важких металів), меркаптани, меркаптоли (при реакції з альдегідами і кетонами).

Для одержання функціональних -SH груп на поверхні частинок нанокмпозиту $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3$ для подальшої іммобілізації молекул тіокарборану, проведено модифікування поверхні мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою.

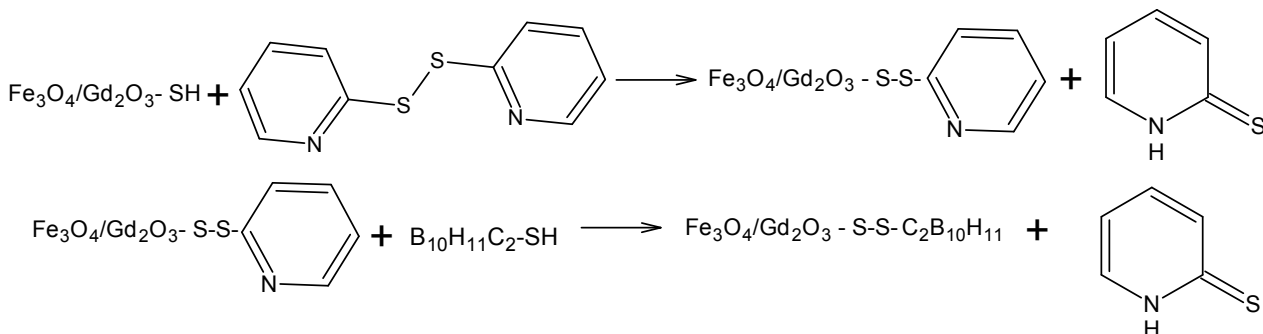
ДМСК приєднується до поверхні композиту за рахунок зв'язування карбоксильної групи кислоти з гідроксильною групою поверхні частинки [28]. Вільні тіольні групи можуть бути використані для ковалентної іммобілізації заданих сполук.

Для підтвердження наявності реакційноздатних тіольних груп на поверхні синтезованого нанокмпозиту та подальших розрахунків для реакції іммобілізації тіокарборану проводили кількісний аналіз SH- груп за методом Кімболла-Крамера-Ріда, який ґрунтується на реакції: $2\text{RSH} + \text{I}_2 \rightarrow \text{RSSR} + 2\text{HI}$. Аналіз показав, що кількість тіольних груп у нанокмпозиті дорівнює 2.4 ммоль/г. Для порівняння визначено

концентрацію –SH груп у ДМСК, яка складає 17 ммоль/г.

Імобілізація на поверхні ДМСК молекул орто-тіокарборану здійснювалася згідно реакції тіол-дисульфідного обміну з дипіридилдисульфідом. Тіолвмісні

біомолекули можуть бути іммобілізовані за допомогою дисульфідного зв'язку до поверхні магніточутливого носія. Таке зв'язування відбувається як двостадійний процес, схематично наведений на схемі. Оптимальний для проведення реакції pH = 6–9.



На першому етапі проходить реакція тіолдисульфідного обміну сульфогідрилвмісної поверхні з дипіридилдисульфідом з утворенням піридилсульфідної поверхні. Відхідна група – піридин-2-тіон не вступає у подальші реакції з поверхнею наночастинки. На другому етапі піридилсульфідний залишок на поверхні обмінюється з тіолвмісною молекулою в розчині – орто-тіокарбораном. Піридин-2-тіон виступає знову як відхідна група, що утворюється в результаті другого етапу реакції тіол-дисульфідного обміну. Таким чином, хід реакції контролюється за концентрацією піридин-2-тіону у контактному розчині кожного етапу реакції. Концентрацію карборану розраховували за даними спектрофотометричних вимірювань оптичної густини та спектрів поглинання піридилтіону при довжині хвилі 343 нм. Коефіцієнт екстинкції піридилтіону $\varepsilon = 8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $C_M = D/\varepsilon$. Кількість іммобілізованого орто-тіокарборану складає 0.07 ммоль/г.

Дослідження синтезованих нанокompозитів $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3\text{-S-S-H}_{11}\text{B}_{10}\text{C}_2$ здійснено рентгенофазовим аналізом. Дифрактограми вихідного карборану та синтезованого нанокompозиту наведені на рис. 1. З аналізу рентгенографічних даних випливає, що карборан в початковому стані характеризується кристалічною структурою. На дифрактограмі $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3\text{-S-S-H}_{11}\text{B}_{10}\text{C}_2$ в області кутів дифракції, що відповідає

положенню основних піків карборану, спостерігається виражене дифузне гало з кількома максимумами на його фоні. Їх кутове положення близьке до положення найбільш інтенсивних піків кристалічного карборану.

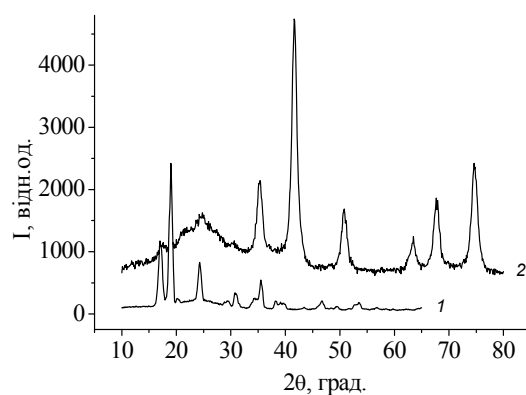


Рис. 1. Дифрактограми карборану (1), нанокompозиту $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ДМСК}/\text{карборан}$ (2)

З урахування вмісту карборану у нанокompозиті, геометрії його молекули та спостережуваної дифракційної картини випливає, що в результаті іммобілізації структура карборану стає аморфною (або кристалічна структура руйнується). Крім того, дифузне гало на зазначеній дифрактограмі може відповідати і іншій аморфній фазі, що утворюється в процесі синтезу нанокompозиту, наприклад оксиду гадолінію.

Методом рентгенівської фотоелектронної спектроскопії проведено дослідження та аналіз РФ-спектрів синтезованих композитів та показана наявність бору і S-S зв'язків на поверхні нанокompозиту.

Для аналізу РФ-спектрів було синтезовано зразок порівняння – композит $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Gd}_2\text{O}_3/\text{ДМСК}$ з фізично адсорбованим орто-тіокарбораном (контроль). Кількість іммобілізованого орто-тіокарборану складала 0.8 ммоль/г.

РФ-спектри $\text{S}2p$ -рівнів нанокompозиту з фізично адсорбованим карбораном (1) (зразок порівняння) та наночастинок композиту з хімічно зв'язаним карбораном (2), як результати розкладання спектрів на компоненти представлено на рис. 2.

Спектри $\text{S}2p$ -рівнів були розкладані на компоненти, їх ширина на половині висоти ΔE становила відповідно 1.4 eV. Розкладання проводилося методом Гаусса-Ньютона. Площа компонент визначалася після вирахування фону за методом Ширлі [29, 30].

Вертикальними лініями виділено тільки $\text{S}2p_{3/2}$ компоненти, невідмічені сигнали належать компоненті $\text{S}2p_{1/2}$. У спектрах присутні сигнали від чотирьох нееквівалентних станів іонів сірки. Домінування компоненти в області $E_{3s} = 163.7$ eV (рис. 2, 2, комп. 3), що відповідає фрагменту зв'язку -S-S-, свідчить про хімічний зв'язок карборану на поверхні нанокompозиту, модифікованого ДМСК.

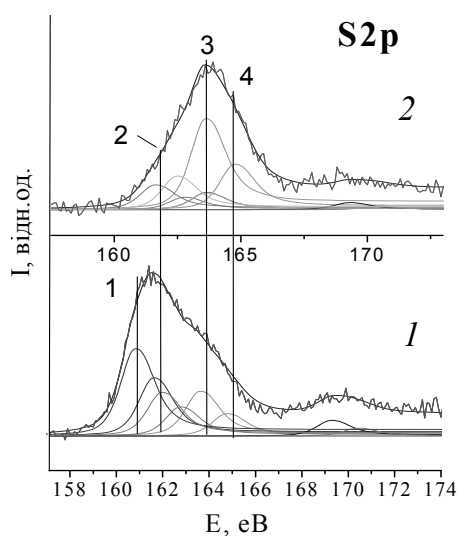


Рис. 2. $\text{S}2p$ -спектри нанокompозитів з фізично адсорбованим (1) та з хімічно зв'язаним карбораном (2)

Компоненти з $E_{3s} = 162.5$ eV та $E_{3s} = 163.8$ eV відповідають зв'язку C=S, що можна порівняти зі сполукою тіону – проміжного етапу іммобілізації карборану (не спостерігаються в рис. 2, 1), а присутність слабого сигналу (~4%) в області $E_{3s} = 169.4$ eV, можна пов'язати з присутністю слідів розчинника DMSO.

Сигнали $E_{3s} = 161.8$ та 162.9 eV відповідають фрагменту групи -SH ДМСК поверхні.

Наявність домінуючого сигналу в області $E_{3s} = 160.9, 161.6$ eV (рис. 2, 1) характеризує зв'язок Fe-S, утворений при модифікуванні поверхні магнетиту ДМСК покриттям. Відсутність даного сигналу на рис. 2, 2 пояснюється проведенням реакції з дипіридилдисульфідом. Зменшення інтенсивності сигналів $E_{3s} = 161.8$ та 162.9 eV, що відповідає фрагменту групи -SH ДМСК поверхні, вказує на приєднання карборанів по реакції тіол-дисульфідного обміну.

Два нееквівалентних стани бору (рис. 3) характеризуються максимумами $E_{3s} = 187.9$ eV (фрагмент зв'язку B-SH) та $E_{3s} = 189.7$ eV (фрагмент зв'язку B-S-S-). Зсув максимуму лінії 1 в область високих E_{3s} пояснюється зміщенням електронної густини з атома бору на атом сірки в фрагменті зв'язку B-S-S-.

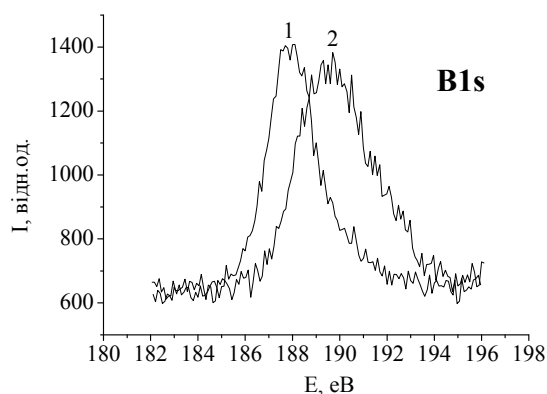
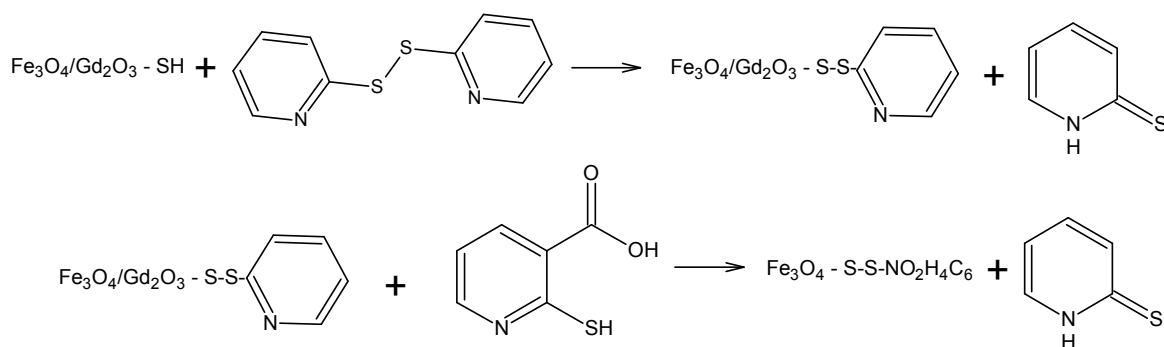


Рис. 3. $\text{B}1s$ -спектри нанокompозитів з фізично адсорбованим карбораном (1) та з хімічно зв'язаним карбораном (2).

Незважаючи на встановлення факту хімічної іммобілізації карборану, розрахунки показують, що в процесі його хемосорбції задіяно лише 3% активних -SH груп поверхні композиту. Це можна пов'язати з об'ємною

структурою орто-тіокарборану, та низькою стеричною доступністю -SH груп поверхні.

Для підтвердження гіпотези про причини низької кількості іммобілізованої речовини було проведено модельний експеримент за реакцією тіол-дисульфідного обміну. В модельному експерименті, замість ароматичного карборану, що займає відносно



Концентрацію іммобілізованої 2-меркаптонікотинової кислоти розраховували за даними спектрофотометричних вимірювань концентрації піридин-2-тіону, утвореного в ході реакції. Кількість іммобілізованої 2-меркаптонікотинової кислоти складає 1.1 ммоль/г, що перевищує кількість іммобілізованого карборану в 15 разів.

Аналіз даних експерименту свідчить про те, що кількість іммобілізованої 2-меркаптонікотинової кислоти суттєво перевищує відповідне значення для орто-тіокарборану. Можна припустити, що це пов'язано з плоскою структурою 2-меркаптонікотинової кислоти та розміром самої молекули. Так, сполука з площинною ароматичністю, зв'язуючись із тіольною групою на поверхні носія, стерично «блокує» меншу кількість сусідніх реакційноздатних груп, ніж об'ємноароматичний каркас молекули карборану (0.8 нм). Одержані в ході дослідження результати збігаються з попередньо проведеними розрахунками.

Ковалентна іммобілізація орто-тіокарборану за допомогою реакції тіол-дисульфідного обміну, яка була використана для одержання нанокompозиту Fe₃O₄/Gd₂O₃-S-S-H₁₁B₁₀C₂, підтверджена методами СФ, РФА та РФС досліджень.

великий об'єм у просторі, було обрано теж ароматичну молекулу, але з плоскою просторовою структурою – 2-меркаптонікотиновою кислотою (2-МНК).

Схема іммобілізації 2-МНК на поверхні нанокompозиту Fe₃O₄/Gd₂O₃/ДМСК наведена нижче:

Нанокompозити такої будови можуть бути використані як ефективні агенти для нейтронозахватної терапії.

ВИСНОВКИ

З метою створення новітніх агентів для бор-нейтронозахватної терапії здійснено хімічне конструювання магніточутливих наноструктур на основі ультрадисперсного Fe₃O₄ з регульованим вмістом гадолінію та молекулою з 10 атомами бору, складу Fe₃O₄/Gd₂O₃-S-S-H₁₁B₁₀C₂.

Імобілізацію орто-тіокарборана здійснено за реакцією тіол-дисульфідного обміну з дипіридилдисульфідом на поверхні нанокompозиту Fe₃O₄/Gd₂O₃, попередньо модифікованого мезо-2,3-димеркапто-сукциновою кислотою для одержання вільних SH-груп. Кількість іммобілізованого карборану становила 0.07 ммоль/г. Методами РФ спектроскопії підтверджено наявність бору та S-S зв'язків на поверхні нанокompозиту.

Синтезовані нанокompозити можуть бути застосовані як перспективний засіб селективного накопичування ¹⁵⁷Gd та ¹⁰B на тканинному рівні для використання у нейтронозахватної терапії онкозахворювань та комплексної T₁/T₂ МРТ діагностики у медицині.

Иммобилизация орто-тиокарборана на нанокompозитах магнетита, допированных оксидом гадолиния

А.Л. Петрановская, Е.В. Пилипчук, П.П. Горбик, А.Н. Кордубан

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, petranovska@ukr.net
Институт металлофизики им. Г.В. Курдюмова Национальной академии наук Украины
пр. Академика Вернадского, 36, Киев, 03142, Украина

Предложен способ иммобилизации орто-тиокарборана ($C_2B_{10}H_{11}-SH$) на поверхности нанокompозитов состава Fe_3O_4/Gd_2O_3 по реакции тиол-дисульфидного обмена. Для получения свободных $-SH$ групп поверхность нанокompозитов Fe_3O_4/Gd_2O_3 предварительно модифицировалась мезо-2,3-димеркаптосукциновой кислотой.

Определено число реакционноспособных тиольных групп на поверхности композита, а также количество иммобилизованного орто-тиокарборана. Структура синтезированных нанокompозитов подтверждена комплексом физико-химических методов анализа.

Ключевые слова: нейтронозахватный агент, магнетит, гадолиний, карборан, модифицирование, биосовместимые покрытия, B- и Gd-содержащие наноматериалы

Ortho-thiocarborane immobilization on the gadolinium oxide-doped magnetite nanocomposites

A.L. Petranovska, Ye.V. Pylypchuk, P.P. Gorbyk, O.M. Korduban

Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, petranovska@ukr.net
G.V. Kurdyumov Institute for Metal Physics of National Academy of Sciences of Ukraine
36 Academician Vernadsky blvd., Kyiv, 03680, Ukraine

Novel neutron capture agents for the boron and gadolinium neutron capture therapy magnetic nanostructures have been created. The magnetic nanocomposites obtained could be applied as carriers for targeted delivery of ^{157}Gd and ^{10}B in order to their retention in tissues. Such materials can find an application in neutron capture therapy of cancer and multimodal T_1/T_2 MRI.

The aim of research is the synthesis of B- and Gd-containing nanomaterials perspective for application in neutron capture therapy of cancer and MRI.

All reagents were of analytical grade and used without further purification. Demineralized water was used for preparation of all sample solutions.

Starch, sodium thiosulfate, 0.1 N iodine solution in water, Phosphate buffer (pH 7.2), DMSO, ethanol, $FeCl_3 \times 6H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$, $Gd(NO_3)_3 \times 6H_2O$, and aqueous NH_4OH (25 %) were purchased from local supplier (Himlaborreaktiv, Ltd). Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) was purchased from Sigma-Aldrich. Ortho-thiocarborane was purchased from Merck Schuchardt ohg. 2,2'-dipyridyldisulfide was purchased from Sigma. 2-Mercaptonicotinic acid ≥ 99.0 % (HPLC) was purchased from Sigma-Aldrich.

UV-Vis spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray powder diffraction (XRD) were used for analysis.

In order to obtain novel neutron capture agents magnetic nanostructures have been developed for the boron and Gd neutron capture therapy based on Fe_3O_4 with optional Gd content and molecules containing 10-boron atoms. Molecular formula of the composite is $Fe_3O_4/Gd_2O_3-S-S-H_{11}B_{10}C_2$.

Ortho-thiocarborane immobilization was carried out by thiol-disulphide exchanging reaction. The surface of Fe_3O_4/Gd_2O_3 composite was modified by meso-2,3 dimercaptosuccinic acid in order to create free SH groups on the surface. Dipyriddyldisulphide was used as @leaving@ molecule from the surface of DMSA- Fe_3O_4/Gd_2O_3 composite. The XPS spectroscopy studies confirmed presence of boron about and S-S bonds on the surface. According to our estimations, 0.07 mmol/g of carborane was immobilized.

Keywords: neutron capture agent, gadolinium, carborane, modified biocompatible coatings, B- and Gd-containing nanocomposites

ЛІТЕРАТУРА

1. *Fauconnier N., Pons J., Roger J.* Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid // *J. Colloid Interface Sci.* – 1997. – V. 194, N 2. – P. 427–433.
2. *Halbreich A., Sabolovic, D., Sestier A.* Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview. – New York: Plenum, 1997.
3. *Fukumori Y. Ichikawa H.* Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis // *Adv. Powder Technol.* – 2006. – V. 17, N 1. – P. 1–28.
4. *Туранская С.П., Турелик М.П., Петрановская А.Л. и др.* Нанокompозиты в нейтронзахватной терапии // *Сб. Поверхность.* – 2010. – Вып. (2)17. – С. 355–374.
5. *Theodoropoulos D., Rova A, Smith James R., Barbu E. et al.* Towards boron neutron capture therapy: The formulation and preliminary in vitro evaluation of liposomal vehicles for the therapeutic delivery of the dequalinium salt of bis-nido-carborane // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – V. 23, N 22. – P. 6161–6166.
6. *Bialek-Pietras M., Olejniczak A., Tachikawa S. et al.* Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: Metallacarboranes bearing cobalt, iron and chromium and their cholesterol conjugates // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – V. 21, N 5. – P. 1136–1142.
7. *Ueno M., Ban H., Nakai K. et al.* Dodecaborate lipid liposomes as new vehicles for boron delivery system of neutron capture therapy // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – V. 18, N 9. – P. 3059–3065.
8. *Dou H., Zhong Wei, Yang Liu et al.* Synthesis, cytotoxic activities and cell cycle arrest profiles of half-sandwich N-sulfonamide based dithio-o-carborane metal complexes // *Bioorg. Med. Chem.* – 2012. – V. 20, N 15. – P. 4693–4700.
9. *Easson M., Fronczek F., Jensen T. et al.* Synthesis and in vitro properties of trimethylamine- and phosphonate-substituted carboranylporphyrins for application in BNCT // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – V. 16, N 6. – P. 3191–3208.
10. *Luguya R., Jensen T., Smith K. et al.* Synthesis and cellular studies of a carboranylchlorin for the PDT and BNCT of tumors // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – V. 14, N 17. – P. 5890–5897.
11. *Bialek-Pietras M., Olejniczak A., Tachikawa S. et al.* Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: Metallacarboranes bearing cobalt, iron and chromium and their cholesterol conjugates // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – V. 21, N 5. – P. 1136–1142.
12. *Пилипчук С.В., Петрановська А.Л., Горбик П.П. та ін.* Гадоліній-борвмісні нанокompозити на основі магнетиту // *Металлофізика и новейшие технологии.* – 2014. – Т. 36, № 6. – С. 767–777.
13. *Пилипчук С.В., Зубчук Ю.О., Петрановська А.Л. та ін.* Синтез та властивості нанокompозитів Fe₃O₄/гідроксоапатит/памідронова кислота/діетилентриамінпентаоцтова кислота/Gd³⁺ // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2015. – Т. 6, № 3. – С. 326–335.
14. *Лавренчук Г.Й., Шевченко Ю.Б., Петрановська А.Л. та ін.* Вплив нанорозмірних магніточутливих композитів, що містять ¹⁵⁷Gd, на морфофункціональні властивості клітин *in vitro* // *Ядерна фізика та енергетика.* – 2014. – Т. 15, № 2. – С. 163–170.
15. *Пилипчук С.В., Горбик П.П.* В- та Gd-вмісні наноматеріали і нанокompозити для нейтронзахопної терапії // *Поверхня.* – 2014. – Вып. 6(21). – С. 150–184.
16. *Nemoto H., Cai J., Nakamura H. et al.* The synthesis of a carborane gadolinium – DTPA complex for boron neutron capture therapy // *J. Organomet. Chem.* – 1999. – V. 581, N 1–2. – P. 170–175.
17. *Woodburn K., Phadke A., Morgan A.* An in vitro study of boronated porphyrins for potential use in boron neutron capture therapy // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1993. – V. 3, N 10. – P. 2017–2022.
18. *Ol'shevskaya V., Nikitina R., Savchenko A. et al.* Novel boronated chlorin e6-based photosensitizers: Synthesis, binding to albumin and antitumour efficacy // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – V. 17, N 3. – P. 1297–1306.
19. *Takahashi K., Nakamura H., Furumoto Sh. et al.* Synthesis and in vivo biodistribution of BPA–Gd–DTPA complex as a potential MRI contrast carrier for neutron capture therapy // *Bioorg. Med. Chem.* – 2005. – V. 13, N 3. – P. 735–743.
20. *Narayanasamy S., Thirumagal B., Johnsamuel J. et al.* Hydrophilically enhanced 3-carboranyl thymidine analogues (3CTAs) for boron neutron capture therapy (BNCT) of cancer // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – V. 14, N 20. – P. 6886–6899.
21. *Leśnikowski Z., Paradowska E., Olejniczak A. et al.* Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: metallacarboranes and their nucleoside conjugates // *Bioorg. Med. Chem.* – 2005. – V. 13, N 13. – P. 4168–4175.
22. *Tietze L., Bothe U., Griesbach U. et al.* Ortho-Carboranyl Glycosides for the Treatment of Cancer by Boron Neutron Capture Therapy // *Bioorg. Med. Chem.* – 2001. – V. 9, N 7. – P. 1747–1752.
23. *Reddy V. Roforth M., Tan C., Reddy M.* Synthesis of functionalized carboranes as potential anticancer and bnct agents // *Inorg. Chem.* – 2007. – V. 46, N 2. – P. 381–383.

24. Bartha R., Yanga W., Bartha G. et al. Thymidine kinase as a molecular target for boron neutron capture therapy of brain tumors // PNAS. – 2008. – V. 105, N 45. – P. 17493–17497.
25. Hwang K., Lai P., Chiang C. et al. Yuan Neutron capture nuclei-containing carbon nanoparticles for destruction of cancer cells // Biomaterials. – 2010. – V. 31, N 32. – P. 8419–8425.
26. Meo C., Panza L., Capitani D. et al. Hyaluronan as carrier of carboranes for tumor targeting in boron neutron capture therapy // Biomacromolecules. – 2007. – V. 8, N 2. – P. 552–559.
27. Горбык П.П., Петрановская А.Л., Пилипчук Е.В. и др. Синтез магниточувствительных Gd-содержащих наноструктур // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2011. – Т. 2, № 4. – С. 385–392.
28. Усов Д.Г., Петрановська А.Л., Турелик М.П. та ін. Синтез та фізико-хімічні властивості нанокompatитів на основі магнетиту, модифікованого мезо-2,3-димеркаптосукциновою кислотою // Сб. Поверхність. – 2009. – Вып. 1(16). – С. 320–327.
29. Нефедов В.И. Рентгеноэлектронная спектроскопия химических соединений. – Москва: Химия, 1984. – 398 с.
30. Wagner C., Moulder J., Davis L., Riggs W. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. – New York: Perking-Elmer Corp., 1979. – 234 p.

REFERENCES

1. Fauconnier N., Pons J., Roger J. Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid. *J. Colloid Interface Sci.* 1997. **194**(2): 427.
2. Halbreich A., Sabolovic, D., Sestier A. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview.* (New York: Plenum, 1997).
3. Fukumori Y. Ichikawa H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv. Powder Technol.* 2006. **17**(1): 1.
4. Turanskaya S., Turelyk M., Petranovskaya A., Turov V., Gorbyk P. Nanocomposites in neutron capture therapy. *Surface.* 2010. **17**(2): 355. [in Russian].
5. Theodoropoulos D., Rova A., Smith J.R., Barbu E., Calabrese G., Vizirianakis I.S., Tsibouklis J., Fatouros D.G. Towards boron neutron capture therapy: The formulation and preliminary in vitro evaluation of liposomal vehicles for the therapeutic delivery of the dequalinium salt of bis-nido-carborane. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. **23**(22): 6161.
6. Białek-Pietras M., Olejniczak A., Tachikawa S., Nakamura H., Leśnikowski Z.J. Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: Metallacarboranes bearing cobalt, iron and chromium and their cholesterol conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 2013. **21**(5): 1136.
7. Ueno M., Ban H., Nakai K., Inomata R., Kaneda Y., Matsumura A., Nakamura H. Dodecaborate lipid liposomes as new vehicles for boron delivery system of neutron capture therapy. *Bioor. Med. Chem.* 2010. **18**(9): 3059.
8. Dou H., Zhong W., Yang L., Wang T., Yan H., Hou Y. Synthesis, cytotoxic activities and cell cycle arrest profiles of half-sandwich N-sulfonamide based dithio-o-carborane metal complexes. *Bioorg. Med. Chem.* 2012. **20**(15): 4693.
9. Easson M., Fronczek F., Jensen T., Vicente M.G.H. Synthesis and in vitro properties of trimethylamine- and phosphonate-substituted carboranylporphyrins for application in BNCT. *Bioorg. Med. Chem.* 2008. **16**(6): 3191.
10. Luguяa R., Jensen T., Smith K., Vicente M.G. Synthesis and cellular studies of a carboranylchlorin for the PDT and BNCT of tumors. *Bioorg. Med. Chem.* 2006. **14**(17): 5890.
11. Białek-Pietras M., Olejniczak A., Tachikawa S., Nakamura H., Leśnikowski Z.J. Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: Metallacarboranes bearing cobalt, iron and chromium and their cholesterol conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 2013. **21**(5): 1136.
12. Pylypchuk I.V., Petranovska A.L., Gorbyk P.P., Korduban O.M., Rogovtsov A.A., Shevchenko Y.B. Gadolinium and boron containing nanocomposites based on magnetite. *Metallofiz. Noveishie Tekhnol.* 2014. **36**(6): 767. [in Ukrainian].
13. Pylypchuk Ie.V., Zubchuk Yu.O., Petranovskaya A.L., Turanska S.P., Gorbyk P.P. Synthesis and properties of Fe₃O₄/hydroxyapatite/pamidronic acid/diethylenetriaminepentaacetic acid/Gd³⁺ nanocomposites. *Him. Fiz. Tehnol. Poverhni.* 2015. **6**(3): 326. [in Ukrainian].

14. Lavrenchuk H.I., Shevchenko Yu.B., Petranovs'ka A.L., Pylypchuk E.V., Kozlovs'ka I.V. Impact of ^{157}Gd containing nanoscale magnetosensitive composites on morfofunctional properties of cells in vitro. *Nuclear Physics and Atomic Energy*. 2014. **15**(2): 163. [in Ukrainian].
15. Pylypchuk Ie., Gorbyk P. B- and Gd-containing nanomaterials and nanocomposites for neutron capture therapy. *Surface*. 2014. **6**(21): 150. [in Ukrainian].
16. Nemoto H., Cai J., Nakamura H., Fujiwara M., Yamamoto Y. The synthesis of a carborane gadolinium – DTPA complex for boron neutron capture therapy. *J. Organomet. Chem*. 1999. **581**(1–2): 170.
17. Woodburn K., Phadke A., Morgan A. An in vitro study of boronated porphyrins for potential use in boron neutron capture therap. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 1993. **3**(10): 2017.
18. Ol'shevskaya V., Nikitina R., Savchenko A., Malshakova M.V., Vinogradov A.M., Golovina G.V., Belykh D.V., Kutchin A.V., Kaplan M.A., Kalinin V.N., Kuzmin V.A., Shtil A.A. Novel boronated chlorin e6-based photosensitizers: Synthesis, binding to albumin and antitumour efficacy. *Bioorg. Med. Chem*. 2009. **17**(3): 1297.
19. Takahashi K., Nakamura H., Furumoto Sh., Yamamoto K., Fukuda H., Matsumura A., Yamamoto Y. Synthesis and in vivo biodistribution of BPA–Gd–DTPA complex as a potential MRI contrast carrier for neutron capture therapy. *Bioorg. Med. Chem*. 2005. **13**(3): 735.
20. Narayanasamy S., Thirumamagal B., Johnsamuel J., Byuna Y., Al-Madhoun A.S., Usova E., Cosquer G.Y., Yan J., Bandyopadhyaya A.K. Hydrophilically enhanced 3-carboranyl thymidine analogues (3CTAs) for boron neutron capture therapy (BNCT) of cancer. *Bioorg. Med. Chem*. 2006. **14**(20): 6886.
21. Leśnikowski Z., Paradowska E., Olejniczak A., Studzińska M., Seekamp P., Schüssler U., Gabel D., Schinazi R.F., Plešek J. Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: metallacarboranes and their nucleoside conjugates. *Bioorg. Med. Chem*. 2005. **13**(13): 4168.
22. Tietze L., Bothe U., Griesbach U., Nakaichi M., Hasegawa T., Nakamura H., Yamamoto Y. *Ortho*-Carboranyl Glycosides for the Treatment of Cancer by Boron Neutron Capture Therapy. *Bioorg. Med. Chem*. 2001. **9**(7): 1747.
23. Reddy V. Roforth M., Tan C., Reddy M. Synthesis of functionalized carboranes as potential anticancer and bnct agents. *Inorg. Chem*. 2007. **46**(2): 381.
24. Bartha R., Yang W., Wu G., Swindall M., Byun Y., Narayanasamy S., Tjarks W., Tordoff K., Moeschberger M.L., Eriksson S., Binns P.J., Riley K.J. Thymidine kinase as a molecular target for boron neutron capture therapy of brain tumors. *PNAS*. 2008. **105**(45): 17493.
25. Hwang K., Lai P., Chiang C., Wang P.J., Yuan C.J. Neutron capture nuclei-containing carbon nanoparticles for destruction of cancer cells. *Biomaterials*. 2010. **31**(32): 8419.
26. Meo C., Panza L., Capitani D., Mannina L., Banzato A., Rondina M., Renier D., Rosato A., Crescenzi V. Hyaluronan as carrier of carboranes for tumor targeting in boron neutron capture therapy. *Biomacromolecules*. 2007. **8**(2): 552.
27. Gorbyk P., Petranovskaya A., Pylypchuk Ie., Abramov N., Oranskaya E., Korduban A. Synthesis of magnetosensitive Gd-containing nanostructures. *Him. Fiz. Tehnol. Poverhni*. 2011. **2**(4): 385. [in Russian].
28. Usov D., Petranovskaya A, Turelyk M., Korduban A., Gorbyk P. Synthesis and physico-chemical properties of nanocomposites on the base of magnetite, modified by *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Surface*. **1**(16): 320. [in Ukrainian].
29. Nefedov V. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy of chemical compounds*. (Moscow: Chemistry, 1984). [in Russian].
30. Wagner C., Moulder J., Davis L., Riggs W. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. (New York: Perking-Elmer Corp., 1979).

Надійшла 19.09.2016, прийнята 18.04.2017