

НОВЫЙ БИОМАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ЧАСТИЦ КОМПЛЕКСА (ДНК-Gd).

1. Определение концентрации гадолиния в частицах

С.В. Акулиничев¹, В.М. Скоркин¹, В.Н. Никифоров³, В.И. Салянов²,
А.И. Евсеев², О.В. Кондрашина², Ю.М. Евдокимов²

¹ Институт ядерных исследований РАН,

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Введение

В работе [1] высказано предположение, согласно которому, частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии (ХЖКД) комплекса (ДНК-Gd) могут быть использованы для нейтронно-захватной терапии (НЗТ) опухолевых заболеваний. Такая возможность основана на том, что реакция захвата $^{157}\text{Gd} (n, \gamma) ^{158}\text{Gd}$, которая происходит при облучении потоком тепловых нейтронов образцов биоматериала, содержащих Gd, сопровождается излучением электронов и гамма-квантов [2]. Каждый захваченный нейтрон, кроме длиннопробежных гамма-квантов, создаёт 4,93 Оже-электронов с энергией 4,19 кэВ и 0,69 конверсионных электронов с энергией 46,3 кэВ [3]. Такое вторичное излучение может разрушить клетки опухоли вблизи частицы биоматериала. Кроме того, в случае ХЖКД можно контролировать содержание гадолиния в составе частиц при помощи метода кругового дихроизма.

Эффективность применения частиц ХЖКД в НЗТ зависит от сочетания ряда факторов: от локальной концентрации гадолиния в частицах, от величины поглощения вторичных электронов и гамма-квантов внутри самих частиц ХЖКД, и, наконец, от биологической

эффективности воздействия этого излучения на окружающие раковые клетки.

В настоящей работе начат цикл исследований свойств нового биоматериала на основе частиц ХЖКД комплекса (ДНК-Gd). На первом этапе этих исследований концентрация гадолиния в составе частиц ХЖКД, сформированных из комплекса (ДНК-Gd), была определена при помощи разных физических методов.

Материалы и методы

В работе использовали препарат двухцепочечной (дц) ДНК тимуса теленка (Sigma). Молекулярная масса ДНК после ультразвуковой деполимеризации, определённая при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле, составила $(0,5-0,8) \times 10^6$ Да.

Препарат GdCl_3 (чистота 99,99 %), использованный в качестве источника гадолиния, был получен из института Гиредмет.

ХЖКД ДНК формировали согласно методике [1]. Наличие в спектре кристаллической дисперсии (КД) интенсивной отрицательной полосы при $\lambda = 270$ нм свидетельствует об образовании ХЖКД. ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) формировали, обрабатывая частицы

ХЖКД исходной дц ДНК водным раствором $GdCl_3$. Холестрическая структура сохраняется при взаимодействии ионов Gd^{3+} с молекулами дц ДНК, фиксированными в пространственной структуре частиц ХЖКД.

Спектры поглощения регистрировали при помощи спектрофотометра Specord M40 (Германия), а спектры КД – при помощи портативного дихрометра СКД-2 (Институт спектроскопии РАН, Троицк, Московская область).

Рентгенографические данные, полученные ранее для исходных частиц ХЖКД ДНК, показывают, что концентрация ДНК в составе частиц ХЖКД близка к 400 мг/мл.

Количественное определение концентрации Gd^{3+} в образцах ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) проводили при помощи метода активационного анализа [4], атомно-эмиссионного спектрального анализа [5] и магнитометрического анализа [6].

Результаты и их обсуждение

Нейтронно-активационный анализ образцов п ХЖКД комплекса (ДНК-Gd)

Образцы ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) разной массы готовили, фильтруя разные объёмы дисперсии ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) через нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0,22 мкм, Sigma), что приводило к иммобилизации частиц дисперсии комплекса на фильтре (отсутствие аномальной полосы в спектре КД фильтрата свидетельствовало о том, что практически все частицы дисперсии иммобилизованы на фильтре). После фильтрования ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) осадок на фильтре промывали двойным объёмом дистиллированной воды для освобождения от неспецифически адсорбированного Gd^{3+} , высушивали на воздухе в течение одного часа и использовали в качестве образцов для дальнейших анализов. Для учета неспецифически адсорбированного на нитроцеллюлозном фильтре гадолиния готовили контрольный образец. Раствор $GdCl_3$ с концентрацией, соответствующей его концентрации в препаратах ХЖКД и объёму образца 1, фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр, промывали двойным объёмом дистиллированной воды, высушивали на воздухе в течение одного часа и использовали в качестве контрольного образца.

Активацию образцов, содержащих ЖКД комплекса (ДНК-Gd), проводили на нейтронном генераторе НГ-400 при энергии быстрых нейтронов 14,8 МэВ [7]. Для получения быстрых нейтронов на НГ-400 использовали титан-третийевую мишень. Плотность потока быстрых нейтронов с энергией 14,8 МэВ на образцы составила $\sim 2 \cdot 10^9$ н/см² с. Примесь нейтронов других энергий составила менее 1 %. Для калибровки использовали фольгу (0,11 мм) из чистого гадолиния. Каждый анализируемый образец ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) размещали между двумя калибровочными образцами. Это позволяло исключить искажение величины нейтронного потока при активации образцов.

Использование гадолиния в НЗТ определяется, прежде всего, наличием в естественном гадолинии нуклида ^{157}Gd (15,7 %), имеющего наибольшее среди встречающихся в природе изотопов сечение захвата тепловых нейтронов (255 000 барн). Кроме ^{157}Gd в естественном гадолинии содержится ряд других стабильных изотопов: ^{154}Gd (2,2 %), ^{155}Gd (14,7 %), ^{156}Gd (20,5 %), ^{157}Gd (15,7 %), ^{158}Gd (24,9 %), ^{160}Gd (21,9 %).

При облучении образцов потоком быстрых нейтронов стабильный изотоп ^{160}Gd , находящийся в естественном гадолинии комплекса (ДНК-Gd), превращается в результате реакции $^{160}Gd(n,2n)^{159}Gd$ в радионуклид ^{159}Gd . Сечение этой реакции составляет $\sigma = 1,75$ барн. Радионуклид ^{159}Gd имеет период полураспада $T_{1/2} = 18,6$ час и при распаде испускает гамма-кванты с энергией 363,6 кэВ; поэтому по интенсивности гамма-излучения с энергией 363,6 кэВ от активированных быстрыми нейтронами образцов ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) можно определить концентрацию нуклида ^{160}Gd , а по ее величине – концентрацию естественного гадолиния в ХЖКД комплекса (ДНК-Gd).

Спектр гамма-излучения измеряли коаксиальным Ge-детектором IGC-45 (ORTEC) со следующими параметрами: объем Ge – 200 см³, эффективность $\varepsilon = 45,5$ %, разрешение – 2,2 кэВ (для энергии 1,33 МэВ).

В табл. 1 приведены результаты активационного анализа образцов ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) в разных условиях облучения. Для некоторых образцов анализ проводили несколько раз и при определении массы гадолиния в образце проводили усреднение по нескольким измерениям.

Таблица 1

Результаты измерения при нейтронно-активационном анализе состава образцов биоматериала

№ образца	Масса образца, мг	Продолжительность, мин			Измеренная активность, импульсы
		облучения	выдержки	измерения	
1'	35,8	65,6 30	920 143,5	60 30	9496 815
1	32,3	65,6	980	30	5187
	32,1	20	116,6	10	1030
	3, 7	20	88	30	539
2	31,4	65,6	1020	30	3607
	31,6	20	91	20	1492
	31,1	20	31,1	30	238
3	30,1	65,6	1060	30	1977
		30	92,4	30	146
Контроль	29,5	65,6	1090	30	220
		30	1240	30	71
Пустой	28,9	65,6	1160	30	*

* – Гадолиний не обнаружен с чувствительностью $2 \cdot 10^{-3}$ % масс.

На основании этих результатов, пользуясь формулой (1), определяли массу гадолиния в образцах [2]:

$$m_{Gd} = m_H \cdot A_{Gd} \cdot T_H \cdot \eta / T_{Gd} \cdot A_H, \quad (1)$$

где: m_{Gd} , A_{Gd} , T_{Gd} – соответственно масса, активность и продолжительность измерения образцов ХЖКД комплекса (ДНК-Gd); m_H , A_H , T_H – соответственно масса, активность и продолжительность измерения калибровочных образцов; η – поправка на распад ^{159}Gd в образцах за время измерения и время выдержки, которую можно определить как [8]: $\eta = \exp(0,693 \cdot \Delta T / T_{1/2})$; где ΔT – разость времен выдержки исследуемых ХЖКД и калибровочных образцов, $T_{1/2}$ – период полураспада радионуклида ^{159}Gd . (Продолжительность выдержки исследуемых ХЖКД и калибровочных образцов близки, и поэтому ΔT мало, т.е. поправка η близка к 1 [2]).

В результате параллельных анализов была определена масса гадолиния:

- ✓ в 1' образце – 0,90, 0,73 мг;
- ✓ в 1-м образце – 0,84, 0,77, 0,76 мг;
- ✓ во 2-м образце – 0,50, 0,47, 0,53 мг;
- ✓ в 3-м образце – 0,24, 0,23 мг;
- ✓ в контрольном образце – 0,024, 0,032 мг;
- ✓ в пустом образце гадолиний не обнаружен с точностью $2 \cdot 10^{-3}$ %.

Проводя усреднение по этим измерениям, определили массу гадолиния в образцах ХЖКД: в 1'-ом – 0,815 мг; в 1-м образце – 0,793 мг; во 2-

ом – 0,50 мг; в 3-ем – 0,235 мг; в контрольном – 0,028 мг.

Количество оставшегося неспецифически адсорбированного Gd^{3+} на нитроцеллюлозном фильтре определяется массой гадолиния в контрольном образце. Вычитая массу гадолиния в контрольном образце, получили окончательно массу гадолиния, связанного в комплекс с ДНК в исследованных образцах:

- ✓ в 1' образце – 0,79 мг;
- ✓ в 1-м образце – 0,77 мг;
- ✓ во 2-м образце – 0,47 мг;
- ✓ в 3-м образце – 0,21 мг.

Атомно-эмиссионный спектральный анализ состава образцов ХЖКД комплекса (ДНК-Gd)

Для уточнения содержания гадолиния в составе ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) был проведен атомно-эмиссионный спектральный анализ некоторых образцов. Образцы ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) подвергали озолению при температуре $\sim 400^\circ C$ с последующим растворением в 5 М соляной кислоте. Концентрацию гадолиния в полученном растворе определяли на плазменном атомно-эмиссионном спектрометре JY-38P.

В табл. 2 сопоставлены результаты определения содержания гадолиния в образцах ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) при помощи двух разных методов. Результаты определения гадолиния в образцах практически совпадают в

Таблица 2

Содержание гадолиния в частицах комплекса (ДНК-Gd)

№ образца	Масса ДНК, мг	Масса гадолиния, мг		Средняя масса гадолиния, мг	Концентрация гадолиния, С	г
		Активационный анализ	Атомно-эмиссионный анализ			
1'	0,943	0,79±0,10	0,70±0,07	0,745±0,06	44,1	1,63
1	0,995	0,77±0,10	–	0,77±0,10	43,6	1,59
2	0,590	0,47±0,06	–	0,47±0,06	44,3	1,64
3	0,295	0,21±0,03	0,17±0,03	0,19±0,02	39	1,32

пределах погрешностей этих методов (~0,03–0,1 мг).

Величину $г$, равную отношению молярной концентрации гадолиния, связанного в комплекс с ДНК, к молярной концентрации оснований ДНК определяли из соотношения:

$$г = С \cdot M_{\text{НК}} / (1 - С) \cdot M_{\text{Gd}}, \quad (2)$$

где: $С$ – средняя концентрация гадолиния в комплексе (ДНК-Gd) в массовых %, M_{Gd} – молекулярная масса гадолиния, равная 158 Да и $M_{\text{НК}}$ – молекулярная масса одного нуклеотида ДНК, равная 326 Да.

Расчет показывает, что для разных образцов величина $г$ близка к 1,5.

Следовательно, в насыщающих условиях на один нуклеотид (на одну фосфатную группу) молекулы ДНК в составе комплекса (ДНК-Gd) приходится $\approx 1,5$ атома гадолиния.

Магнитометрическое определение концентрации гадолиния в частицах ХЖКД, образованных в разных условиях

Образцы ХЖКД ДНК для магнитометрического анализа готовили, добавляя разные количества исходного раствора соли GdCl_3 ($C_{\text{GdCl}_3} = 1 \text{ М}$) к определенному объему ХЖКД ДНК при перемешивании так, чтобы величина $г_{\text{общ}}$ ($г_{\text{общ}}$ – отношение молярной концентрации добавленного GdCl_3 к молярной концентрации оснований ДНК), составляла 0, 10, 30 и 100. Затем частицы ХЖКД комплексов (ДНК-Gd) осаждали при помощи низкоскоростного центрифугирования (5000 об/мин; 40 мин; 15°C). Отсутствие аномальной полосы в спектре КД супернатанта свидетельствовало о том, что практически все частицы дисперсии находились в осадке. Осадки дважды промывали дистиллированной водой для освобождения от

неспецифически адсорбированного Gd^{3+} ; после каждой промывки вновь проводили центрифугирование (15000 об/мин, 10 мин, 15°C); подсушивали осадки в вакуум-экситаторе в течение 30 мин и использовали в качестве образцов для магнитометрического анализа.

Методика измерения намагниченности заключалась в охлаждении образцов ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) в нулевом магнитном поле до температуры кипения жидкого гелия, с последующим включением намагничивающего поля (ZFC) и измерением намагниченности (в неизменном поле) как функции температуры, повышающейся вплоть до комнатных температур. После этого температуру образца понижали и в том же поле регистрировали температурную зависимость намагниченности вплоть до гелиевых температур (FC). В случае наших образцов Gd ДНК измеренные кривые (ZFC, FC) совпадают.

Измерения магнитного момента намагниченного образца проводили на сквид-магнитометре [9]. Исследуемый образец массой 3–5 мг, помещенный в специальную кварцевую ампулу диаметром 5 мм, располагали по оси антидьюара в камере, температуру которой можно менять от 2,2 К до 350 К. Однородное магнитное поле создавали ниобий-титановой трубкой, находящейся в основной гелиевой ванне.

При перемещении ампулы из одной петли в другую измеряли магнитный поток, создаваемый намагниченным образцом, который пропорционален магнитному моменту образца. Магнитное поле измеряли датчиком Холла с погрешностью 2 %, температуру – с помощью Cu–CuFe термопары с погрешностью 0,1 К.

Магнитный момент образца определяли как:

Таблица 3

Результаты магнитометрического анализа препаратов холестерических жидкокристаллических фаз комплексов (ДНК-Gd)

№ образца	$r_{\text{общ}}$	C_{CW}	N_{Gd}	$N_{\text{ДНК}}$	r	Масса образца, мг
1	0	–	–	$3,734 \cdot 10^{15}$	–	5
2	10	$3,10837 \cdot 10^{-5}$	$2,374 \cdot 10^{18}$	$2,241 \cdot 10^{15}$	0,44	3
3	30	$7,06471 \cdot 10^{-5}$	$5,397 \cdot 10^{18}$	$2,241 \cdot 10^{15}$	1,003	3
4	100	$10,5022 \cdot 10^{-5}$	$8,022 \cdot 10^{18}$	$2,241 \cdot 10^{15}$	1,49	3

$$p_m = 4,419 \cdot 10^{-9} \cdot N_{\text{KB}}, \quad (\text{А} \cdot \text{м}^2), \quad (3)$$

где N_{KB} – отсчет квантового магнитометра.

Удельную намагниченность получали делением величины p_m на массу образца в килограммах. Удельную магнитную восприимчивость определяли как:

$$\chi'_{\text{уд}} = \mu_0 \cdot J_{\text{уд}} / B, \quad (\text{м}^3 / \text{кг}) \quad (4)$$

или

$$\chi_{\text{уд}} = \chi'_{\text{уд}} / 4\pi \cdot 10^{-3}, \quad (\text{emu} / \text{г}), \quad (5)$$

где B – магнитная индукция (Тл), $J_{\text{уд}}$ – удельная намагниченность ($\text{А} \cdot \text{м}^2 / \text{кг}$ или $\text{emu} / \text{г}$) и μ_0 – магнитная постоянная ($4\pi \cdot 10^{-7}$ Генри/м).

На рис. 1 в качестве примера приведена температурная зависимость удельной магнитной восприимчивости (в единицах СГС) для образца № 2 холестерической жидкокристаллической фазы комплекса (ДНК-Gd).

Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются зависимостью Кюри–Вейсса (см. рис. 1) с параметрами C_{CW} , приведенными в табл. 3.

Полученная зависимость позволяет провести некоторые оценки. Обозначим через N число парамагнитных центров в образце. Постоянная Кюри–Вейсса связана с N известным соотношением:

$$C_{\text{CW}} = (\mu_{\text{eff}})^2 \cdot N / (3 \cdot k), \quad (6)$$

где k – постоянная Больцмана.

Отсюда следует, что число парамагнитных центров определяется из соотношения:

$$N = 3 \cdot k \cdot C_{\text{CW}} / (\mu_{\text{eff}})^2. \quad (7)$$

В соответствии с методикой [9] можно определить число парамагнитных центров в образце, а также число парамагнитных цен-

тров, т.е. ионов гадолиния, приходящихся на одну молекулу ДНК (на один виток ДНК). Число витков в молекуле ДНК составляет $8 \cdot 10^5 / 6,6 \cdot 10^3 = 120$. Следовательно, на одну фосфатную группу молекулы приходится (в условиях насыщения, образец № 2) ~1,5 атома гадолиния. Эта величина уменьшается по мере уменьшения степени связывания гадолиния с ДНК (образцы № 3 и № 4), (см. табл. 3).

Таким образом, результаты трех разных физических методов определения концентрации гадолиния в составе ХЖКД комплекса (ДНК-Gd³⁺) свидетельствуют о том, что в условиях насыщения, на одну фосфатную группу молекулы ДНК приходится более одного атома гадолиния (~1,5). Если принять, что в составе ХЖКД комплекса (ДНК-Gd³⁺) концентрация ДНК не меняется и соответствует известной концентрации ДНК в составе частиц ХЖКД “чистой” ДНК, т.е. составляет ~350 мг/мл, то

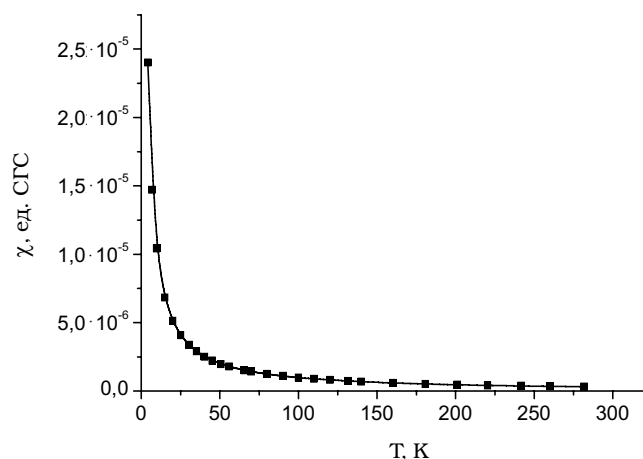


Рис. 1. Температурная зависимость удельной магнитной восприимчивости (ед. СГС) образца № 2 холестерической жидкокристаллической фазы комплекса (ДНК-Gd)

отсюда следует, что концентрация гадолиния в частицах ХЖКД комплекса (ДНК-Gd³⁺) может достигать 250 мг/мл.

Полученные результаты позволили уточнить оценки концентрации гадолиния проведенные ранее [2]. Они показывают, что в условиях насыщения локальная концентрация гадолиния в частицах ХЖКД комплекса (ДНК-Gd) может достигать 250 мг/мл, что значительно превышает его концентрацию в медицинских препаратах, использованных ранее для НЗТ меланомы подопытных животных [10]. Как было сказано выше, концентрация гадолиния, доставленного в опухоль, определяет эффективность лучевой терапии. Увеличение этой концентрации позволяет уменьшить требуемый поток тепловых нейтронов, что, в свою очередь, уменьшает вредное воздействие облучения на здоровые ткани.

Хотя полученные нами результаты не полностью характеризуют все физические параметры ХЖКД комплекса (ДНК-Gd), они служат указанием на перспективность использования образцов ХЖКД комплекса (ДНК-Gd), которые можно назвать новым биоматериалом для НЗТ даже при существующих источниках тепловых нейтронов.

Авторы выражают благодарность А.В. Андрееву за участие в проведении измерений.

Список литературы

1. Евдокимов Ю.М. и соавт. Жидкокристаллические дисперсии молекул ДНК с гадолинием – потенциальная платформа для нейтрон-захватывающей терапии. // ДАН, 2005, **402**, № 5, С. 1–4.
2. Yevdokimov Yu.M. et al. Particles of liquid-crystalline dispersions formed by (nucleic acid-rare earth element) complexes as a potential platform for neutron capture therapy. // Int. J. Biol. Macromol., 2005, **370**, P. 165–173.
3. Greenwood R.C., Reich C.W., Baader H.A. et al. // Nuclear. Phys., 1978, **A 304**, P. 327–428.
4. Andreev A.V., Makarov S.A. Analysis of multi-component systems by fast neutron activation. // Chech. J. of Phys., 1999, **49**, part1, P. 377. http://nuclphys.sinp.msu.ru/nuc_tech/activ_analy.htm.
5. Путьшев А.А., Данилова Д.А. Атомно-эмиссионный спектральный анализ с индуктивно связанной плазмой и тлеющим разрядом по Гримму. – Екатеринбург: ГОУ ВПО УГТУ-УПИ, 2002, С. 202.
6. Кузнецов В.Д. ПТЭ, 1985, № 4, С. 196–201.
7. Андреев А.В., Барит И.Я., Варич О.М. Ускоритель ионов на 400 кВ для элементного анализа. // Атомн. энергия, 1989, **66**, вып. 2, С.133.
8. Бенецкий Б.А., Поташёв С.И., Симонов В.А. и соавт. Препринт ИЯИ-1126/2004, 16 с.
9. Никифоров В.Н., Кузнецов В.Д., Нечипуренко Ю.Д., Саянов В.И., Евдокимов Ю.М. // Письма в ЖЭТФ, 2005, **81**, вып.6, С. 328–330.
10. Tokumitsu H. et al. // Cancer Letters, 2000, **150**, P. 177.