

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ C_{60} И ИХ КОВАЛЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ С КРАСИТЕЛЯМИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ МЕТОДОМ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 2016 г. Д. А. Полетаева, А. Ю. Рыбкин, В. И. Кукушкин, А. Ю. Белик,
Н. С. Горячев, Е. А. Хакина, П. А. Трошин, Р. А. Котельникова, А. И. Котельников

Представлено академиком РАН С.М. Алдошиным 30.07.2015 г.

Поступило 28.08.2015 г.

Проведено исследование возможностей применения метода спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) для детектирования водорастворимых производных фуллеренов и их ковалентных конъюгатов с ксантеновыми красителями в модельных биологических мембранах липосом и в структуре белка альбумина. Показано, что в липосомах и в структуре альбумина производные фуллеренов и их ковалентные конъюгаты с красителями проявляют характерные спектры ГКР, что позволяет осуществлять детектирование водорастворимых производных фуллерена в фосфатидилхолиновых липосомах при соотношении липид/производное фуллерена = 100, а также конъюгатов фуллерен-краситель в структуре липосомов и альбумина.

DOI: 10.7868/S0869565216030166

Известно, что водорастворимые производные фуллеренов C_{60} имеют широкий спектр биологической активности и являются перспективными с точки зрения создания на их основе эффективных лекарственных средств [1].

В ИПХФ РАН разработаны методы синтеза различных водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов C_{60} (ППФ) путем ковалентного присоединения к фуллереновому сфероиду пяти аддендов, несущих на себе отрицательные заряды [2, 3]. Такие соединения имеют рекордную растворимость в воде (выше 100 мг/мл), малотоксичны и проявляют различные виды биологической активности, в том числе противовирусную, антибиотическую и нейропротекторную [4, 5]. На основе синтеза ковалентных конъюгатов производных фуллерена и красителей ведутся работы по созданию фотодинамических препаратов нового поколения для лечения онкологических заболеваний [6–8]. В связи с этим актуальна разработка высокочувствительных экспериментальных методов,

позволяющих исследовать процессы переноса подобных производных фуллеренов через биологические мембраны, их накопление в структуре белков и клеток.

Однако фуллерены и их производные имеют слабое поглощение в видимой или в ближней ультрафиолетовой области спектра и практически не обладают флуоресценцией, что затрудняет их наблюдение традиционными спектральными методами.

В силу уникальной сферической структуры фуллерены C_{60} имеют характерный спектр рамановского рассеяния, состоящий преимущественно из одной высокоинтенсивной линии в области $1462–1469\text{ см}^{-1}$ [9, 10]. При нанесении анализируемых молекул на поверхность серебряных или золотых наночастиц возникает эффект гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, в англоязычной транскрипции SERS), в результате интенсивность сигнала может усилиться на 5–6 порядков [10–13]. В ряде случаев удается регистрировать спектры ГКР отдельных молекул фуллеренов C_{60} [14].

В работе [15] нами было показано, что полизамещенные производные фуллерена, в которых сферическая симметрия нарушена, тем не менее обладают хорошо регистрируемым спектром ГКР, что позволяет уверенно детектировать их в водных растворах в диапазоне концентраций $10^{-6}–10^{-5}$ М. В этой же работе продемонстрировано,

*Институт проблем химической физики
Российской Академии наук,
Черноголовка Московской обл.
Институт физики твердого тела
Российской Академии наук,
Черноголовка Московской обл.
e-mail: kotel@icp.ac.ru*

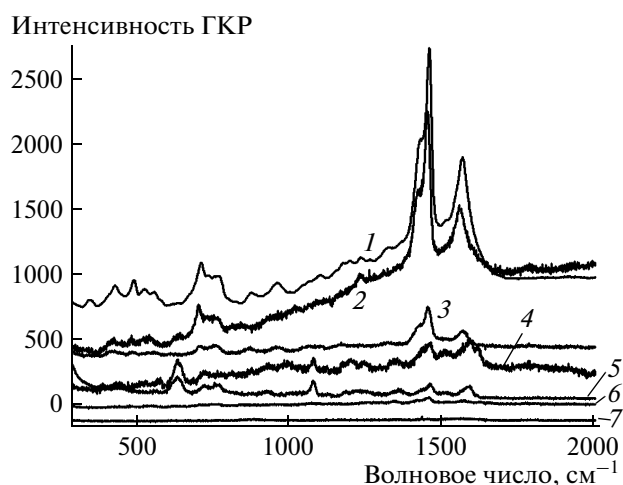


Рис. 1. Спектры ГКР ППФ-1 и ППФ-2 (возбуждение на 532 нм): 1 и 2 – ППФ-1 и ППФ-2 в воде, концентрация 10^{-5} М; 3 и 4 – ППФ-1 и ППФ-2 в липосомах, концентрация липидов 10^{-4} М, соотношение липид/ППФ = 10; 5 и 6 – ППФ-1 и ППФ-2 в липосомах, концентрация липидов 10^{-3} М, соотношение липид/ППФ = 100; 7 – ППФ-1 в альбумине, концентрация 10^{-4} М.

что ковалентный конъюгат ППФ-флуоресцеин, в котором люминесценция флуоресцеина потухает за счет переноса возбуждения на ядро фуллерена, тем не менее, обладает высокоинтенсивным спектром ГКР, аналогичным спектру ГКР флуоресцеина, что позволяет уверенно детектировать

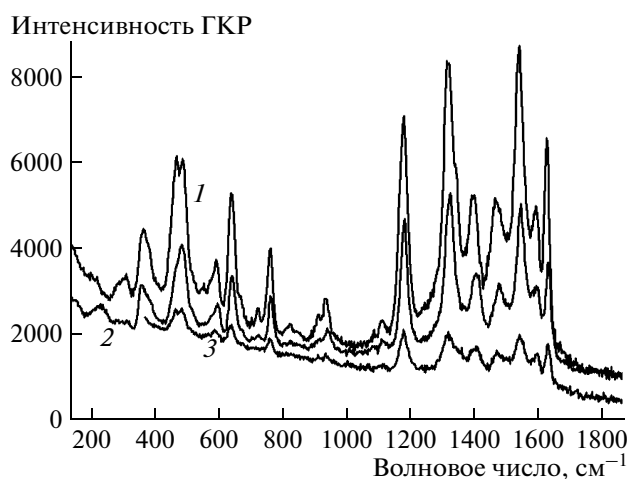


Рис. 2. Спектры ГКР ППФ-ФИТЦ (возбуждение на 532 нм): 1 – в воде, концентрация ППФ-ФИТЦ $2 \cdot 10^{-6}$ М; 2 – в липосомах, концентрация липидов 10^{-4} М, соотношение липид/ППФ = 10; 3 – в альбумине, концентрация ППФ-ФИТЦ 10^{-5} М.

данные производных фуллерена в концентрациях до 10^{-8} М. Это открывает возможность широкого использования метода ГКР для исследования взаимодействия производных фуллеренов с биологическими структурами различного уровня организации.

Данное сообщение посвящено анализу возможности применения метода спектроскопии ГКР для детектирования водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов и их ковалентных конъюгатов с красителями в структуре модельных биологических мембран и при образовании комплексов этих производных с белком альбумином.

В работе использовались соединения ППФ-1 и ППФ-2, которые были получены путем присоединения к фуллереновому сфероиду пяти аддендов, имеющих в водных растворах отрицательные заряды [2, 3]. Соединения ППФ-ФИТЦ и ППФ-ЭИТЦ получены путем ковалентного присоединения к одному из аддендов ППФ-2 ФИТЦ (флуоресцеин-5-изотиоцианата) или ЭИТЦ (эозин-5-изотиоцианата) через этилендиаминовый линкер, в результате чего получается меченое красителем водорастворимое производное фуллерена. Структура вновь синтезированных ППФ-1, ППФ-2, ППФ-ФИТЦ и ППФ-ЭИТЦ доказывалась методами ИК-спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H и ^{13}C и электроспрей масс-спектрометрии.

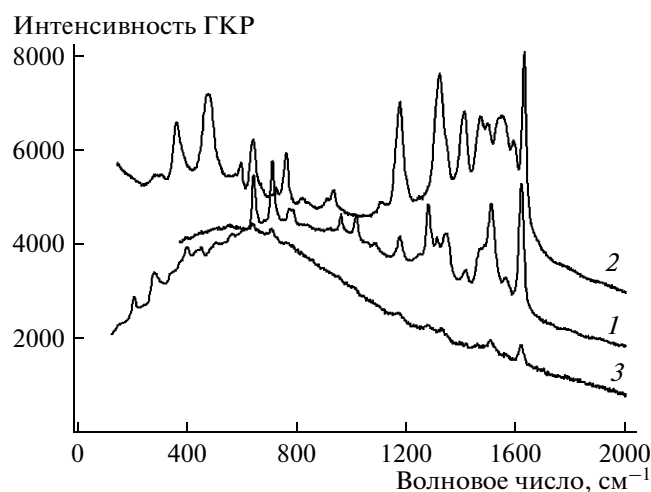
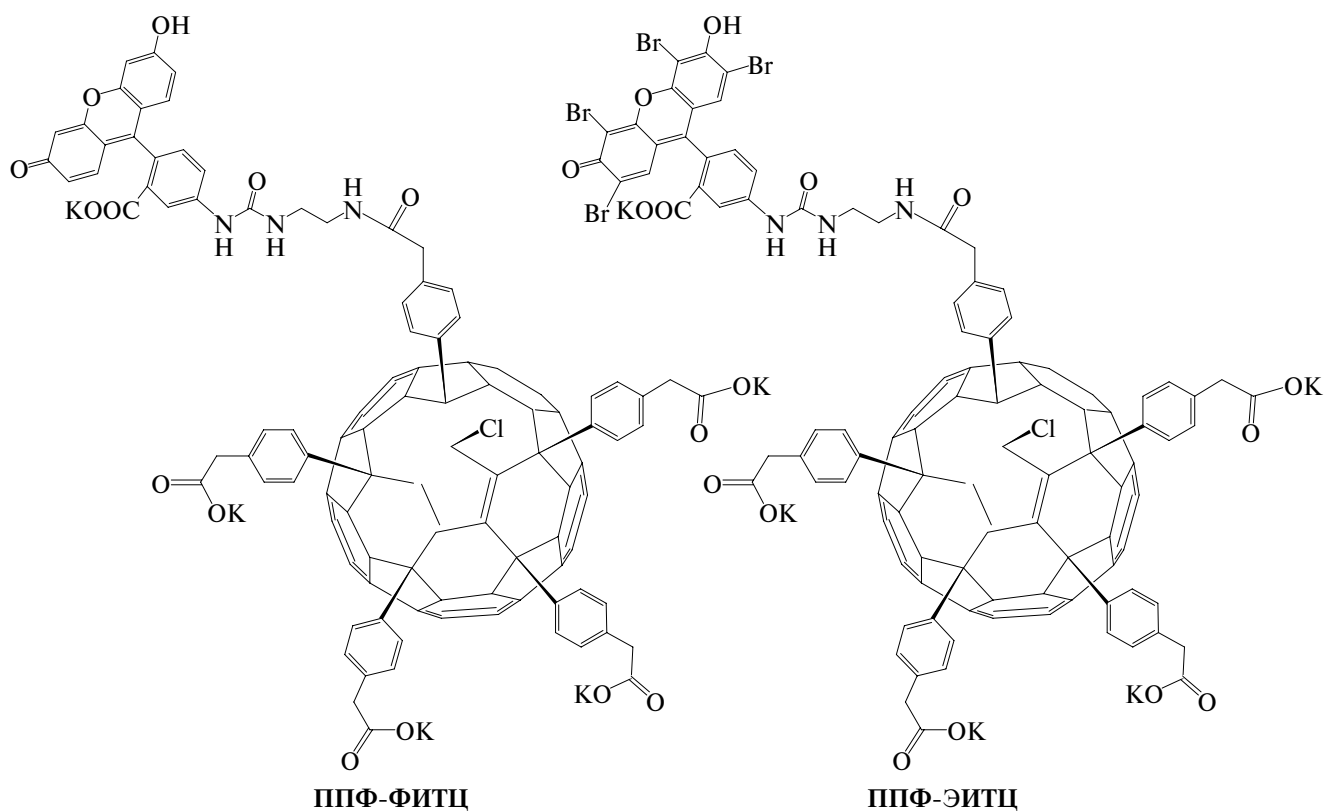
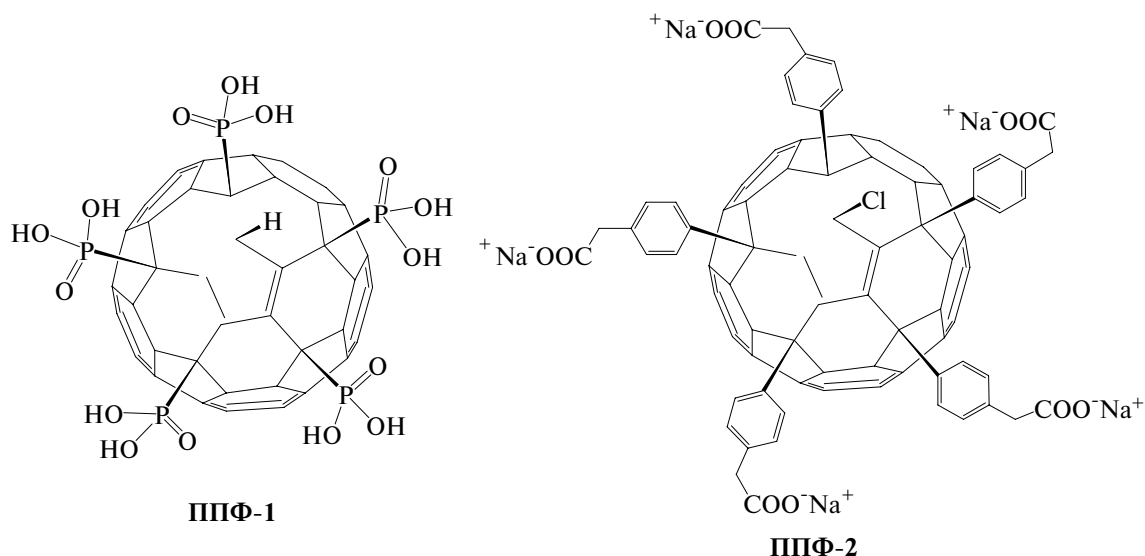


Рис. 3. Спектры ГКР ППФ-ЭИТЦ (возбуждение на 532 нм): 1 – в воде, концентрация ППФ-ЭИТЦ $2 \cdot 10^{-6}$ М; 2 – в липосомах, концентрация липидов 10^{-4} М, соотношение липид/ППФ-ЭИТЦ = 10; 3 – в альбумине, концентрация ППФ-ЭИТЦ 10^{-5} М.



Соединения ППФ вводились в структуру фосфатидилхолиновых липосомов посредством их введения в водный раствор в соотношении липид/ППФ = 10 или липид/ППФ = 100. Встраивание ППФ в белок альбумин осуществлялось путем их смешивания в буферном растворе Трис-HCl, 0.02 М, рН = 7.5, при соотношении белок/ППФ = 1.5.

Проба наносилась на подложку в объеме 1 мкл и выдерживалась на воздухе 5 мин до полного вы-

сыхания. Регистрации спектров ГКР описана в работе [15].

Известно, что явление ГКР возникает вследствие резонансного взаимодействия электромагнитного диполя возбужденной молекулы и плазмонных колебаний подложки. Эффект наблюдается при непосредственном контакте молекулы анализируемого вещества с поверхностью подложки и интенсивность сигнала ГКР резко сни-

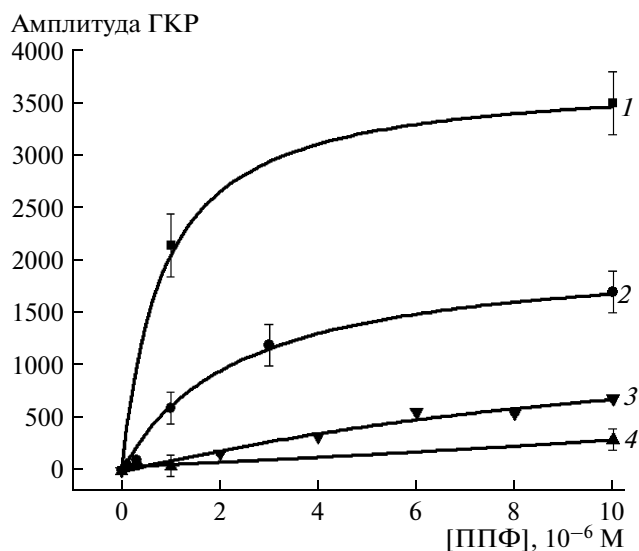


Рис. 4. Зависимость амплитуды сигнала ГКР от концентрации ППФ в структуре липосомов (концентрация лецитина 10^{-4} М, возбуждение на 532 нм). 1 – ППФ-ФИТЦ, 2 – ППФ-ЭИТЦ, 3 – ППФ-1, 4 – ППФ-2. В качестве амплитуды бралась величина пиков в спектре ГКР, измеряемая как разница максимума и минимума интенсивности ГКР на следующих волновых числах: 1462 и 1500 см^{-1} для ППФ-1 и ППФ-2, 415 и 471 см^{-1} для ППФ-ФИТЦ и ППФ-ЭИТЦ.

жается при удалении молекул вещества от подложки на расстояние более 30 нм [16].

Производные фуллеренов с полярными аддендами являются амфифильными соединениями, которые, имея хорошую растворимость в воде, в то же время эффективно встраиваются в биологические мембраны и могут накапливаться в них за счет гидрофобных взаимодействий углеродного сфероида с углеводородными хвостами липидов, образующих двухслойную структуру мембраны [17]. Кроме того, такие соединения могут внедряться в гидрофобные сайты белков, например в сывороточный альбумин.

Вследствие специфического встраивания производных фуллеренов в структуру мембраны или белка их локальная концентрация вблизи поверхности подложки и соответственно интенсивность сигнала ГКР должна сильно зависеть от природы матрицы и способа нанесения пробы на подложку.

В результате проведенных исследований было установлено, что при введении исследуемых ППФ-1 и ППФ-2 в структуру липосомов удается регистрировать их спектры ГКР, при этом форма спектров остается аналогичной спектрам ГКР водных растворов ППФ (рис. 1). Интенсивность регистрируемых спектров ППФ-1 и ППФ-2 в структуре липосомов достаточно слабая и при оптимальных условиях регистрации возможна регистрация сигнала фуллерена на частотах в области

1447 см^{-1} и 1556 см^{-1} при соотношении липид/ППФ от 10 до 100. При встраивании ППФ-1 в гидрофобный сайт альбумина их спектры ГКР наблюдать не удается.

Значительно более интенсивные спектры ГКР наблюдаются для ковалентных структур ППФ-краситель, если в качестве красителей используются ксантеновые красители ФИТЦ или ЭИТЦ. Как видно из рис. 2 и рис. 3, спектры ГКР данных соединений могут уверенно регистрироваться при концентрации ППФ-краситель 10^{-6} М и концентрации липидов 10^{-4} М (соотношение липид/ППФ-краситель = 100), а в структуре альбумина – в концентрации 10^{-6} – 10^{-5} М (рис. 2, 3).

В спектре ГКР ковалентного конъюгата ВПФ-ЭИТЦ при возбуждении на 532 нм заметен вклад флуоресценции ковалентно присоединенного к фуллерену эозина (рис. 3), что не мешает уверенной регистрации спектров ГКР ППФ-ЭИТЦ в модельных биологических системах.

Исследование амплитуды сигналов ГКР для исследуемых производных фуллеренов в структуре липосом от их концентрации показывает различный характер этих зависимостей для ППФ и их конъюгатов с красителями (рис. 4).

При исследовании спектров ГКР ППФ и их конъюгатов с красителями в структуре модельных биологических мембран необходимо принять во внимание, что при встраивании ППФ в структуру мембран или белков интенсивность спектра ГКР определяется локальной концентрацией молекул ППФ вблизи поверхности подложки [17]. В структуре мембраны молекулы ППФ разбавлены молекулами липида пропорционально их молярному соотношению. Поэтому, например, при соотношении липид/ППФ = 100 поверхностная концентрация ППФ в пробе будет в 100 раз меньше по сравнению с нанесением ППФ из водного раствора. Объемная концентрация ППФ при послойном нанесении мембран будет определяться расположением ППФ в бислое мембран и размерами фосфатидилхолиновых липосомов, что в целом может приводить к значительным вариациям амплитуды сигнала ГКР в различных экспериментах.

При встраивании молекул ППФ или ковалентных конъюгатов ППФ-краситель в гидрофобные сайты альбумина, имеющего молекулярный вес ~ 65000 дальтон и диаметр молекулы более 5 нм, вероятность непосредственного контакта ППФ или красителя с поверхностью подложки значительно уменьшается. При этом линейные размеры ППФ в ~ 5 раз меньше размера молекулы альбумина, что приведет к снижению поверхностной концентрации ППФ в одном монослое макромолекул альбумина на подложке в 25 раз. Последующий, второй монослой макромолекул белка будет находиться на расстоянии более 5 нм от поверхности подложки, а объемная концентрация в це-

лом уменьшается в 125 раз. Эти факторы позволяют объяснить резкое снижение интенсивности сигнала ГКР при встраивании ППФ в структуру альбумина и нанесении макромолекул белка на поверхность подложки.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать заключение, что, благодаря уникальной структуре углеродного каркаса фуллерена, их водорастворимые производные различной природы обладают характерным спектром ГКР, который может уверенно регистрироваться при нанесении данных соединений на специальным образом подготовленные подложки. При этом удается достичь чувствительности $\sim 10^{-5}$ М, что находится на пределе возможностей проведения фармакокинетических исследований. Чувствительность методики значительно возрастает, если к фуллереновому сфероиду ковалентно присоединяется ксантеновый краситель, флуоресцеин или эозин. В этом случае в спектрах ГКР наблюдается интенсивный сигнал красителя, без заметного вклада сигнала фуллерена, при этом сигнал ГКР ковалентной структуры регистрируется даже в случае, если флуоресценция красителя полностью потушена. Так как сигнал ГКР ксантеновых красителей примерно на порядок превосходит по интенсивности сигнал фуллерена, данные соединения можно уверенно регистрировать при концентрациях до 10^{-6} М и ниже, в том числе в структуре биологических мембран и белков, что приближается по чувствительности к методу флуоресценции и позволяет уверенно проводить фармакокинетические исследования на экспериментальных животных.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 14-04-31587-мол_а и Программой Президиума РАН №1 “Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Da Ros T.* Twenty Years of Promises: Fullerene in Medicinal Chemistry. In: *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. B.: Springer Science + Business Media B.V., 2008. P. 1–22.

2. *Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.C.* // *J. Raman Spectrosc.* 1996. V. 27. № 3/4. P. 351–371.
3. *Fang Y., Huang Q., Wang P., Li X., Yu N.* // *Chem. Phys. Lett.* 2003. V. 381. № 3/4. P. 255–261.
4. *Chase S.J., Bacsa W.S., Mitch M.G., Pilione L.J., Lannin J.S.* // *Phys. Rev. B.* 1992. V. 46. № 12. P. 7873–7877.
5. *Akers K.L., Cousins L.M., Moskovits M.* // *Chem. Phys. Lett.* 1992. V. 190. № 6. P. 614–620.
6. *Zhixun L., Yan F.* // *Chem. Phys.* 2006. V. 321. P. 86–90.
7. *Zhixun L., Loo B.H., Peng A., Ma Y., Fu H., Yao J.* // *J. Raman Spectrosc.* 2011. V. 42. № 3. P. 319–323.
8. *Kornev A.B., Khakina E.A., Troyanov S.I., Kushch A.A., Deryabin D.G., Peregudov A.S., Vasilchenko A., Martynenko V.M., Troshin P.A.* // *Chem. Commun.* 2012. V. 48. P. 5461–5463.
9. *Khakina E.A., Yurkova A.A., Peregudov A.S., Troyanov S.I., Trush V., Vovk A.I., Mumyatov A.V., Martynenko V.M., Balzarini J., Troshin P.A.* // *Chem. Commun.* 2012. V. 48. P. 7158.
10. *Fedorova N.E., Klimova R.R., Tulenev Yu.A., Chichev E.V., Kornev A.B., Troshin P.A., Kushch A.A.* // *Mendeleev Commun.* 2012. V. 22. P. 254.
11. *Kornev A.B., Peregudov A.S., Martynenko V.M., Balzarini J., Hoorelbeke B., Troshin P.A.* // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. P. 8298.
12. *Баринов А.В., Горячев Н.С., Полетаева Д.А., Рыбкин А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А., Шмитт Ф.И., Ренгер Г., Эйхлер Г.И., Котельников А.И.* // *Рос. нанотехнологии.* 2012. Т. 7. №7. С. 66–70.
13. *Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А.* // *ДАН.* 2013. Т. 452. № 4. С. 408–412.
14. *Kotelnikov A.I., Rybkin A.Yu., Khakina E.A., Kornev A.B., Barinov A.V., Goryachev N.S., Ivanchikhina A.V., Peregudov A.S., Martynenko V.M., Troshin P.A.* // *Org Biomol Chem.* 2013. V. 11. № 26. P. 4397–4404.
15. *Кукушкин В.И., Ваньков А.Б., Кукушкин И.В.* // *Письма в ЖЭТФ.* 2013. Т. 98. № 6. С. 383–388.