

**В.А. Лапина¹, А.В. Трофимов², Т.А. Павич¹, П.П. Зак²,
Цаплев Ю.Б.², Н.Н. Трофимова², П.П., Першукевич¹**

¹ГНУ Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси,
Минск, Беларусь,

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ПОДХОДЫ
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СВЕТОИЗЛУЧАЮЩИХ
МАТЕРИАЛОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ
НА ОСНОВЕ НАНОУГЛЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ**

Введение

Развитие нанотехнологий дало новый толчок к созданию высоко-технологичных материалов с уникальными свойствами и к поиску

сфер их эффективного применения. Одной из таких сфер является биомедицинская оптика.

В настоящее время во многих научных центрах различных стран (США, Великобритания, Италия, Германия, Норвегия, Россия, Китай и др.) проводятся интенсивные исследования по созданию новых высокоэффективных (по селективности накопления в опухолях, физико-химическим свойствам, биосовместимости и оптической активности) фотоуправляемых материалов для целей биомедицинской оптики, как с целью диагностики, так и лечения социально-значимых заболеваний.

Среди них можно выделить исследования по созданию нового поколения оптически управляемых материалов на основе углеродных наночастиц [1]. Для увеличения селективности и общей эффективности нетоксичные люминесцентные материалы конъюгируют с различными наночастицами, что приводит к повышенному селективному их накоплению в опухолевой ткани (эффект повышенной проницаемости и удержания а также к увеличению их локальной концентрации [2]). Много различных типов наночастиц используются для доставки лекарственных препаратов в опухоли, как органической природы (липосомы, полимерные наночастицы, дендримеры), так и неорганической (фуллерены, нанотрубки, алмазные наночастицы и др.) [3]. Все они имеют как свои преимущества, так и недостатки. Так, липосомальные препараты относительно дороги, сложны в приготовлении, нестабильны, имеют невысокую «транспортную емкость». Дендримеры сложны в приготовлении, потенциально токсичны. Полимерные наночастицы сложны в приготовлении и функционализации, термодинамически нестабильны.

Большой интерес в настоящее время привлекают алмазные наночастицы. Они нетоксичны, биосовместимы, имеют относительно большую поверхность и легко функционализируются [4].

Различные биологически активные люминесцентные вещества могут быть иммобилизованы на поверхности таких наночастиц за счет как ковалентных, так и нековалентных взаимодействий. Применимость этих классов биоактивных соединений может быть расширена за счет создания гибридных наноструктур, основанных на алмазных частицах.

Нами предложены новые нанотехнологические подходы для биомедицины, в частности для конструирования оптически активных фотоуправляемых средств нового поколения на основе углеродных наночастиц. Так, синтез и биологическая активность таких средств была

нами продемонстрирована в работах [5, 6, 7] по созданию селективных фотосенсибилизаторов нового поколения на основе наноалмазных частиц.

1. Результаты

В данной работе наши исследования, были направлены на разработку фотоуправляемых сигнальных агентов нового поколения на примере синтеза оптически активных нанокомплексов на основе НА и люминесцирующих красителей.

В качестве люминесцентных красителей нами были выбраны кумарины, обладающие интенсивной флуоресценцией, что позволяет их использовать в биомедицине для создания флуоресцентных меток [8, 9]. Кумарины — природные соединения, в основе которых лежит бензоапирон (лактон ортооксикоричной кислоты).

Благодаря развитой химии поверхности наноалмазных частиц, а также наличию определенных химических групп в структуре предлагаемых красителей из классов кумаринов, возможна их конъюгация с образованием люминесцентных нанокомплексов, которые в состоянии связываться с различными органеллами живых клеток с их последующей диссоциацией. Модифицирование наноалмазов красителями при образовании конъюгатов, придаст им ряд новых свойств, как оптических, так и химических, которые позволят разработать новые гибридные флуоресцентные метки для изучения активности клеток.

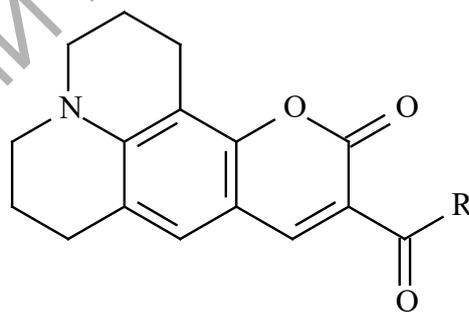


Рисунок 1 – Лактон ортооксикоричной кислоты, где, R = EtO (K314), CH₃ (K334), HO (K343)

Нами были использованы следующие люминофоры из класса кумаринов: кумарин 314 (K314), кумарин 334 (K334), кумарин 343 (K343) фирмы Aldrich. Выбранные кумарины являются гидрофобными соединениями, величина $\log P$ равна 2.3 – 2.9. При этом молекулы K314, K334 и K343 в основном состоянии обладают сравнительно большим дипольным моментом в 8 – 13 Д. Максимум поглощения

(λ_{abs}) для этой группы соединений в ДМСО находится при 440–455 нм (см. рис. 2). Коэффициент экстинкции у К314, К334 превышает 47000, а у К343 – 30000 л·моль⁻¹·см⁻¹. Максимумы флуоресценции (λ_{lum}) растворов в ДМСО лежат в интервале 486–500 нм.

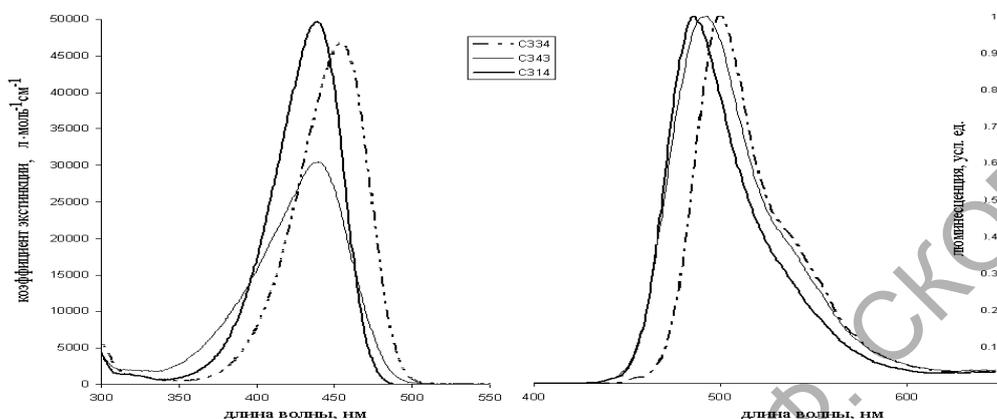


Рисунок 2 – Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) кумаринов в ДМСО

Квантовые выходы люминесценции для выбранных кумаринов оказались достаточно высокими: в ДМСО для кумарина 314 равен 0,84, для кумарина 334 – 0,9, для кумарина 343 – 0,94, а в воде для кумарина 314 равен 0,79, для кумарина 334 – 0,6, для кумарина 343 – 0,75.

2. Синтез конъюгата

Анализ физико-химических свойств как НА, так и кумаринов, показал, что для синтеза конъюгата наиболее подходящим красителем является кумарин 343, так как в нем присутствуют карбоксильные группы, а в оболочке наноалмазных частиц присутствуют амино-группы, что свидетельствует о целесообразности проведения конъюгирования этих компонентов по данным группам.

Синтез комплекса наноалмаз – кумарин проводили в 2 стадии: 1) активация карбоксильной группы на кумарине 343; 2) присоединение кумарина 343 по активированной карбоксильной группе к НА частицам по имеющимся на них поверхности свободным амино-группам.

На рисунке 3 приведены спектры поглощения полученного конъюгата. Из спектра видно, что произошли существенные изменения в системе при комплексообразовании: наблюдаются сдвиги полос поглощения, исчезновение пика поглощения в области 420 нм, что

свидетельствует об образовании новых оптических центров в изучаемой системе.

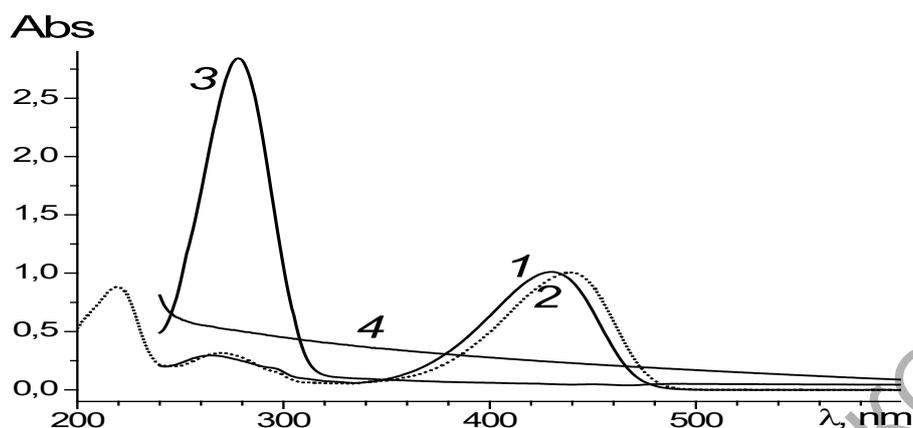


Рисунок 3 – Спектры поглощения: 1 и 2 – кумарин в фосфатном буфере (pH = 7,4) + 5% ДМСО и этаноле; 3 – конъюгат НА-кумарин 343 в фосфатном буфере (pH = 7,4) + 5% ДМСО; 4 – НА в фосфатном буфере pH = 7,4) + 5% ДМСО

На рисунках 4, 5 приведены спектры возбуждения люминесценции и люминесценции, из которых также видно, что произошли существенные изменения в природе излучающих центров при комплексообразовании. Подтверждением этого являются и данные, приведенные в таблице 1.

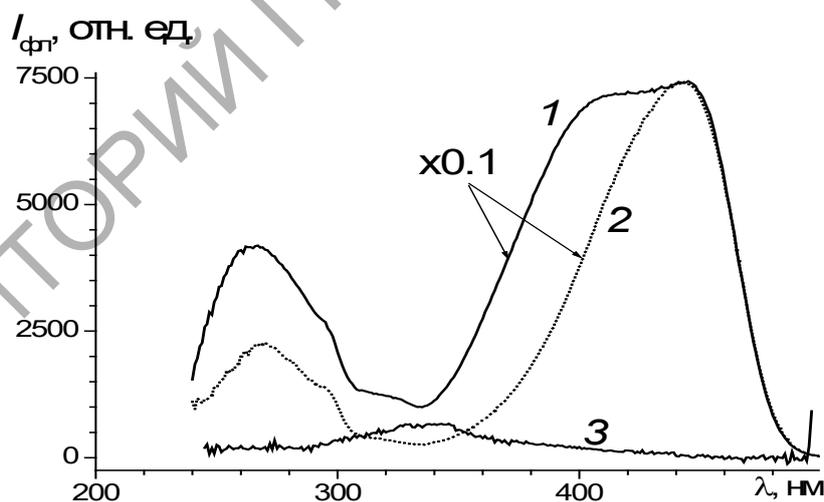


Рисунок 4 – Спектры возбуждения флуоресценции: 1 и 2 – кумарин в фосфатном буфере (pH = 7,4) + 5% ДМСО и этаноле ($\lambda_{\text{пер}} = 525 \text{ нм}$); 3 – конъюгат НА-кумарин 343 в фосфатном буфере (pH = 7,4) + 5% ДМСО ($\lambda_{\text{пер}} = 500 \text{ нм}$)

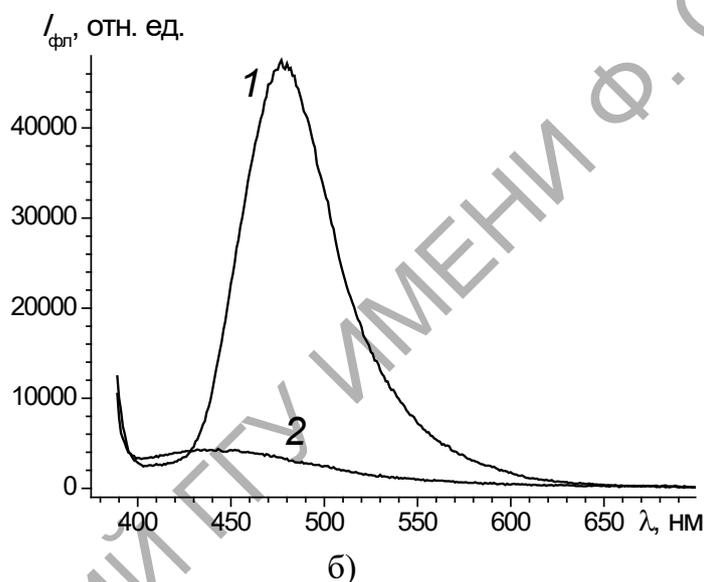
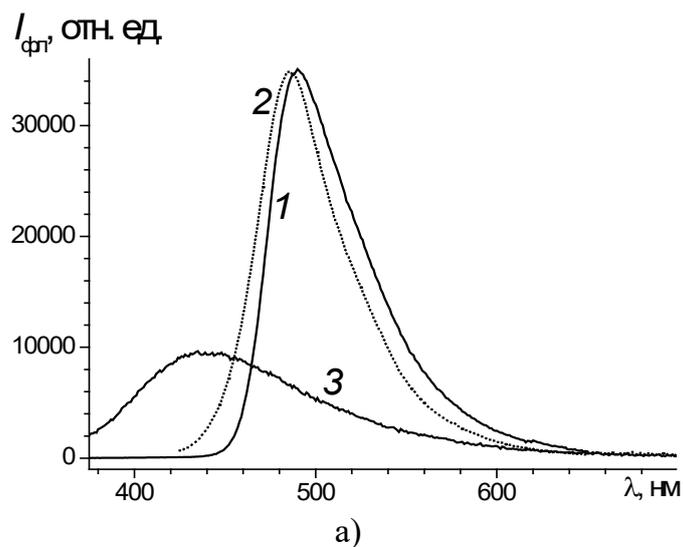


Рисунок 5 – Спектры флуоресценции: а) 1 и 2 – кумарин в фосфатном буфере (рН = 7,4) + 5% ДМСО и этаноле; 3 – конъюгат НА–кумарин 343 в фосфатном буфере (рН = 7,4) + 5% ДМСО ($\lambda_{\text{возб}} = 310$ нм); б) Спектры флуоресценции: 1 – кумарин в этаноле; 2 – конъюгат НА–кумарин 343 в фосфатном буфере (рН = 7,4) + 5% ДМСО ($\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм)

Таблица 1 – Характеристические времена затухания (τ_1 , и τ_2) при $\lambda_{\text{возб}} = 310$ нм и регистрации свечения при $\lambda_{\text{рег}} = 500$ нм

Название образца	τ_1 , нс	τ_2 , нс
Кумарин в фосфатном буфере	4.65	–
Кумарин в этаноле	3.66	–
Конъюгат НА–кумарин 343 в фосфатном буфере	1.57	6.28
НА в фосфатном буфере	1.23	–

Заключение

Таким образом, из представленных данных видно, что произошло комплексообразование за счет образования ковалентных связей между молекулами кумарина 343 и алмазными наночастицами, так как наблюдаются существенные изменения в их спектрально-люминесцентных свойствах. Полоса люминесценции комплекса значительно сдвинута в коротковолновую область относительно полосы, характерной для свободного кумарина. Это позволит различать поведение свободного кумарина и связанного кумарина в составе комплекса в изучаемых системах.

Для возможного использования полученных люминесцентных комплексов в качестве оптических агентов для визуализации процессов, протекающих в живых клетках, необходимы дальнейшие исследования.

Литература

1. Zhang, Y. Multifunctional Carbon-Based Nanomaterials: Applications in Biomolecular Imaging and Therapy/ M. Wu, J. Zhu, X. Zhang// ACS Omega. – 2018. – Vol. 3, № 8. – P. 126–9145
2. Tyng, Li. Nanoparticles for Photodynamic Therapy. Handbook of Biophotonics. Vol.2; Photonics for Health Care, – 2012. – Published by Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA.
3. Couleaud, P. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents / C. Frochot, M.L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob// Trends Biotechnol. – 2008. – Vol. 26. – P. 612–621.
4. Lapina, V.A. Adsorption and Structural Characteristics of the Surface of Modified Nanodiamond Powders / G.S. Ahremkova, T.M. Gubarovich // Russian Journal of Physical Chemistry, A. – 2010. –Vol. 84, № 2. – P. 267–271.
5. Mkandawire, J M. Selective targeting of green fluorescent nanodiamond conjugates to mitochondria in HeLa cells/ J. Opitz, V.A. Lapina et al. // J. Biophoton. – 2009. – Vol 2, №10 – P. 596–606.
6. Лапина, В.А. Фотосенсибилизаторы нового поколения: конъюгаты хлорина е6 с алмазными наночастицами / С.Б. Бушук, Т.А. Павич, А.В. Воробей // ЖПС. – 2016. – Т. 83, №3. – С. 347–353.
7. Lapina, V.A. New Generation of Photosensitizers: The Conjugate of Folic Acid with Nanoparticles and Chlorine E6 / T.A. Pavich, S.B. Bushuk, A.V. Vorobey, B.A. Bushuk// J Appl Biotechnol Bioeng. – 2016. – Vol. 4, № 1. – 00090. DOI: 10.15406/jabb.20 2016.

8. Добрецов, Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. – М.: Наука. –1989. –277 с.

9. Wagner, B.D. The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems // Molecules. – 2009. – Vol. 14, № 1. – P. 210–237.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ