

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА SERS-ПОДЛОЖКАХ МЕТОДАМИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕИВАНИЯ

Мосунов А.А.¹, Елецкая А.А.¹, Бондаренко А.В.²

¹Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: aamosunov@sevsu.ru

² Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

ул. П. Бровки, 6, г. Минск, 220013, Республика Беларусь

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. В работе описано исследование комплексообразования биологически активных веществ (антибиотика топотекана, акридинового красителя профлавина, аналога витамина В₂ (рибофлавина), алкалоида кофеина), относящихся к различным классам соединений с использованием рамановской спектроскопии. Данное исследование важно для объяснения механизмов модуляции биологической активности препаратов, при их использовании в режиме комплексной терапии. В работе описана одна из методик усиления сигнала комбинационного рассеяния, путем нанесения исследуемого вещества на пластину с наноматериалами благородных металлов. Также дано краткое описание технологии изготовления данных подложек. В статье описан порядок проведения эксперимента на 3D сканирующем лазерном рамановском микроскопе Confotec® NR500, а также дан краткий анализ некоторых из полученных спектров. Сделаны предположения о причинах некоторой неудачи экспериментальной части и намечены пути решения данной проблемы.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, SERS-подложка, комплексообразование.

В последние годы методы рамановской спектроскопии (спектроскопии комбинационного рассеяния) стали широко признанным исследовательским инструментом. Они нашли свое применение в биологии, медицине, фармацевтике, криминалистике, химии биополимеров и наноматериалов, биотехнологиях и многих других областях науки и практической деятельности человека. Процесс комплексообразования биологически активных веществ является одним из основных способов модуляции их биофизической активности *in vivo* и *in vitro*. На данный момент разработано огромное количество экспериментальных методик исследования данного процесса, а также построено множество математических моделей разного уровня сложности, для описания связывания макромолекул. Одним из сравнительно новых подходов является использование рамановской спектроскопии в комплексе со специальными наноматериалами (SERS-подложками), предназначенными для увеличения значения полезного сигнала в тысячи и даже миллионы раз (для некоторых систем).

Цель работы – исследовать методами рамановской спектроскопии комплексообразование биологически активных соединений: антибиотика топотекана, акридинового красителя профлавина, аналога витамина В₂ (рибофлавина), алкалоида кофеина.

Рамановская спектроскопия представляет собой молекулярную спектроскопию для наблюдения за неэластично рассеянным светом и позволяет идентифицировать вибрационные состояния (фононы) молекул.

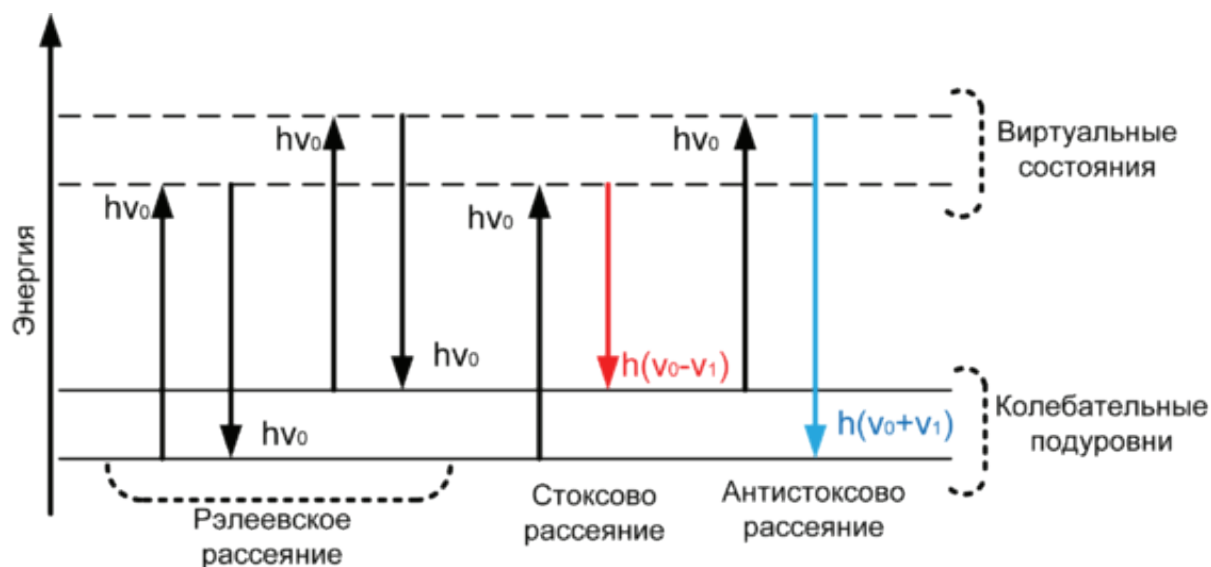


Рисунок 1. Диаграмма Яблонского, схема электронных переходов

Поэтому рамановская спектроскопия является бесценным аналитическим инструментом для молекулярного получения отпечатков пальцев и контроля изменений в молекулярной структуре связей (например, изменений состояний и нагрузок).

При воздействии на вещество электромагнитного излучения возможны различные электронные переходы, схематически представленные на диаграмме Яблонского (рис. 1).

Стоксово рассеяние наблюдается при переходе молекулы с нижнего на верхний колебательный уровень в результате поглощения и рассеяния кванта света. Антистоксово рассеяние происходит при переходе молекулы с верхнего на нижний колебательный уровень. Интенсивность антистоксовых линий является очень низкой, т.к. вероятности перехода с верхних на нижние колебательные уровни малы, вследствие больших заселенностей нижних уровней [1]. Поэтому в практике рамановской спектроскопии используют стоксовы линии.

Самый эффективный способ добиться усиления сигнала рамановского рассеяния – поместить анализируемую молекулу вблизи наночастиц (НЧ) благородных металлов. При этом существует два подхода к реализации этого способа. Первый заключается в том, что металлическую НЧ располагают на острие иглы атомно-силового микроскопа и зондируют исследуемые молекулы, регистрируя с них сигнал рамановского рассеяния. В этом случае метод будет называться зондово-усиленная рамановская спектроскопия или TERS-спектроскопия (от англ. – tip enhanced Raman scattering). Во втором случае исследуемые молекулы помещают на поверхность НЧ металла и регистрируют рамановское рассеяние обычным способом. Этот метод называется поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия или SERS-спектроскопия (от англ. – surface enhanced Raman scattering). SERS-спектроскопия – самая удачная разновидность рамановской спектроскопии, которая одновременно позволяет получать максимальное усиление сигнала и наиболее удобна с точки зрения широкого применения на практике, поэтому именно о ней и пойдет речь в дальнейшем. Известно, что усиление сигнала при SERS-спектроскопии может происходить в результате переноса заряда между металлической НЧ и адсорбированной на ней молекулой (адсорбционно-химический механизм). При этом увеличение интенсивности рамановского сигнала достигает трех порядков. Однако больший вклад в усиление сигнала вносится благодаря возникновению в металлических НЧ плазмонных эффектов под воздействием внешнего электромагнитного излучения в результате коллективных колебаний свободных электронов. В случае поверхностно-ограниченных наноструктур, которыми являются НЧ, такие колебания приводят к периодическому изменению заряда на их поверхности. При совпадении частоты коллективных колебаний свободных электронов (квант таких колебаний называется плазмон) и частоты падающего света возникает поверхностный плазмонный резонанс, который приводит к многократному увеличению локального электромагнитного поля вблизи наноструктур. Таким образом НЧ металла выступают в качестве «наноантенн», благодаря которым усиление может достигать 14 порядков.

В целом механизмы взаимного влияния антиопухолевых препаратов на медико-биологическую активность друг друга могут иметь как ковалентный, так и нековалентный характер, проявляясь в специфической и неспецифической форме. Однако на сегодняшний день представления о механизмах совместного влияния различных биологически активных соединений при их одновременном использовании остаются достаточно поверхностными [2, 3]. Это связано с тем, что, во-первых, молекулярные мишени их действия в клетке могут быть различными и не всегда однозначно определенными, а во-вторых, в настоящее время до конца не выяснен даже механизм действия каждого из препаратов в отдельности.

Для проведения исследований были приготовлены растворы всех исследуемых веществ в одинаковой концентрации – 5 мМ. Для исследования комплексообразования равные объемы растворов каждого препарата были смешаны в пробирке, после чего исходные растворы были разбавлены в два раза, для обеспечения равной концентрации препаратов в комплексе и чистом виде. Растворы смешивали в следующих комбинациях: профлавин-кофеин, профлавин-топотекан, профлавин-флавиномононуклеотид. Приготовленные таким образом растворы наносились на SERS-подложки на основе посеребренного пористого кремния, которые были изготовлены следующим образом.

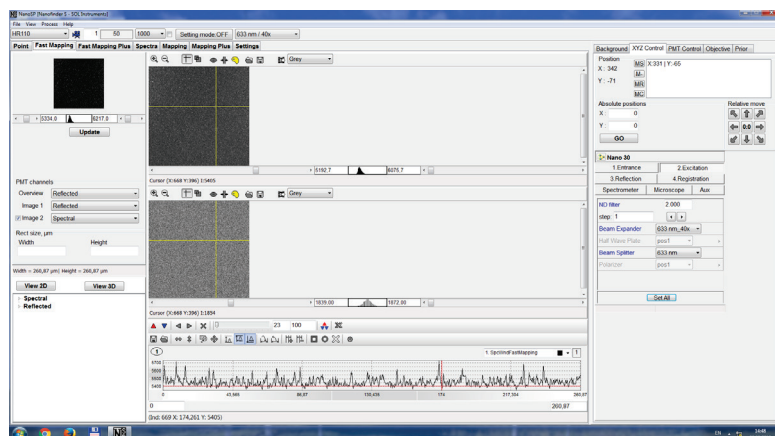


Рисунок 2. Пример поиска «горячей» точки на SERS-подложке

Для формирования пористого кремния были использованы пластины сильно легированного кремния монокристаллического электронного типа проводимости и кристаллографической ориентацией поверхности (100). Пористый кремний изготавливался путем электрохимического анодного травления (анодирования) образца кремниевой пластины размером 3×3 см во фторопластовой ячейке. Непосредственно перед проведением процесса анодирования образец кремниевой пластины подвергался обработке в растворе фтористоводородной кислоты (5 %) в течение 30-60 с для удаления с его поверхности пленки естественного оксида кремния SiO₂. Плотность тока анодирования поддерживалась на уровне 100 мА/см², длительность анодирования составляла 85 с. В качестве раствора для анодирования был использован раствор, состоящий из HF (45 %), дистиллированной воды и изопропилового спирта, которые были смешаны в объемном соотношении 1:3:1. После анодирования раствор удалялся из ячейки и образец последовательно промывался в дистиллированной воде и изопропиловом спирте в течение 1-2 мин. Полученный пористый кремний представлял собой упорядоченный массив каналов пор диаметром 70-100 нм, перпендикулярных поверхности образца. Глубина пор составляла 5 мкм, а пористость полученного материала варьировалась в пределах 70-75 %. Необходимо отметить, что пористый кремний в данной работе использовался в качестве формообразующей подложки для создания плазмонных частиц серебра. Для этого было использовано иммерсионное осаждение. После промывки пористого кремния в ячейку добавлялся водно-спиртовой раствор 3 мМ AgNO₃. Время выдержки образцов в растворе составляло 70 мин.

Регистрация SERS-спектров проводилась на 3D сканирующем лазерном рамановском микроскопе Confotec® NR500 лаборатории молекулярной и клеточной биофизики Севастопольского государственного университета. Изучение экспериментальных образцов производилось с использованием лазера с длиной волны $\lambda = 633$ нм. Мощность лазера соответствовала 10 мВт. Диаметр пятна лазера составлял около 1030 нм. В процессе исследования были получены микрофотографии всех образцов на инвертированном оптическом микроскопе Nikon Ti-S с использованием объектива Canon UPlan FLN 40x, NA = 0,75 и цветной CCD камеры для микроскопа с высоким разрешением (2048x1536, 1/1,8", 12 бит). Кроме того для каждой SERS-подложки с нанесенным на нее аналитом были построены рамановские изображения для быстрого поиска так называемых «горячих» точек. Эти точки появляются в местах, где расстояние между наночастицами серебра составляет 2-10 нм, в результате чего происходит наложение электромагнитных полей и обеспечивается наибольшее усиление рамановского сигнала. Пример такого сканирования приведен на рисунке 2.

Помимо нахождения «горячих» точек для получения качественного спектра необходимо выбрать оптимальный режим регистрации спектра. Это можно сделать путем варьирования следующего набора параметров: оптимальное количество сканов, продолжительность каждого скана, интервал между сканированиями, режим накопления сигнала, а также степень ослабления мощности лазерного излучения, возбуждающего образец, чтобы избежать его выгорания в процессе регистрации. Наилучшим образом все параметры удалось подобрать для антибиотика топотекана, в результате чего был получен спектр, приведенный на рисунке 3.

Данный спектр практически полностью соответствует спектру из литературных данных [4], приведенному на рисунке 4.

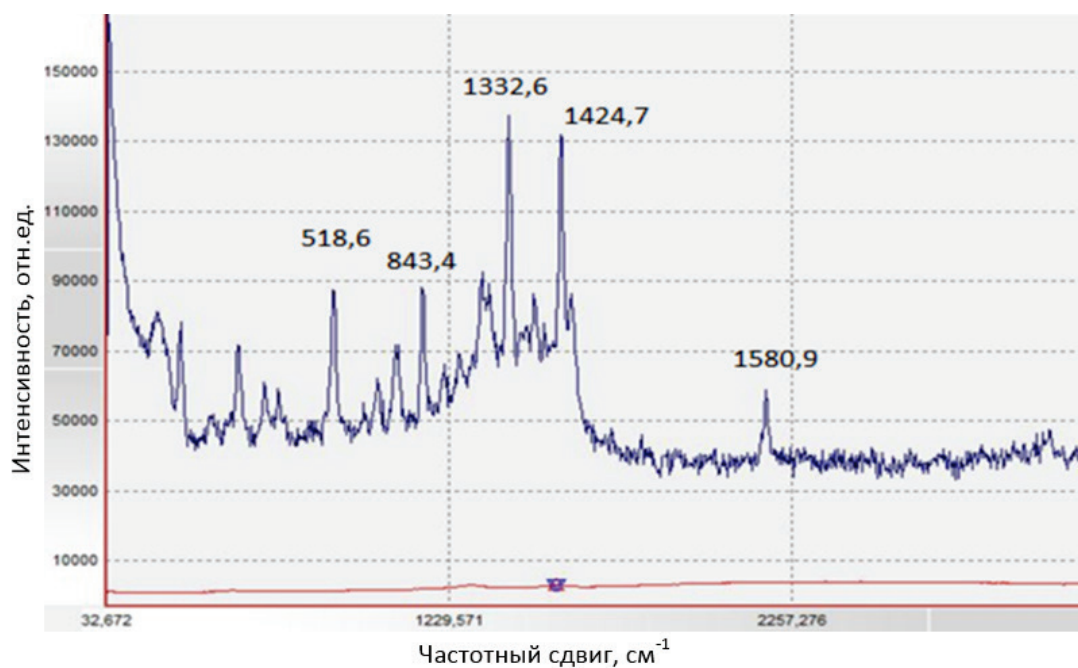


Рисунок 3. SERS-спектр антибиотика топотекана

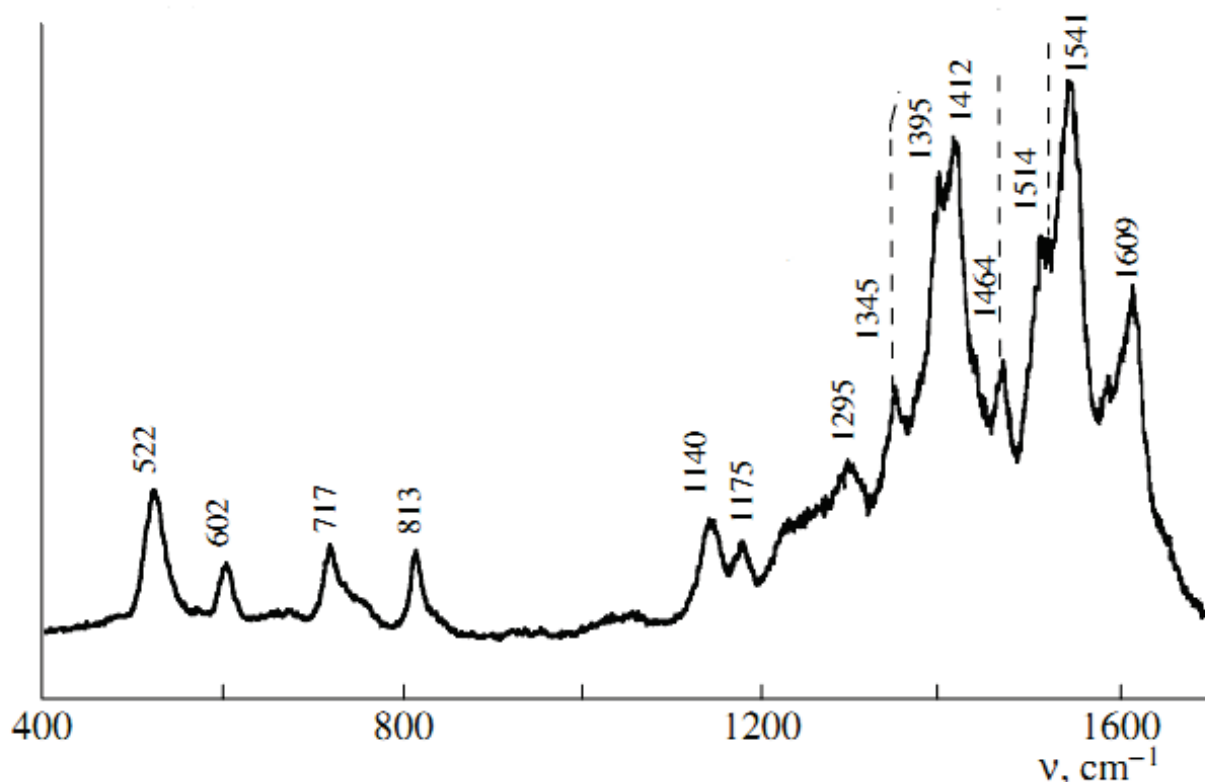


Рисунок 4. SERS-спектр водного раствора топотекана из работы [6] (концентрация раствора 10^{-4} М, длина волны возбуждающего лазера 514,5 нм)

В данном комплексе видно заметное ослабление интенсивности сигнала антибиотика в чистом виде (кривая 1) и в комплексе (кривая 2). Невысокое качество сигнала комплекса, наравне с низким качеством сигнала профлавина не позволяет проводить дальнейший анализ данного комплекса. Если судить по спектру 2, то на нем видны полосы аморфного углерода около 1376 и 1556 cm^{-1} , которые свидетельствуют о выгорании молекул аналита или о том, что на подложках адсорбировалось в процессе хранения достаточно большое количество органических молекул из окружающей среды. Более низкий сигнал может свидетельствовать о том, что в случае со спектром 1 сигнал регистрировался из «горячей» точки при оптимальных режимах в то время, как спектр 2 был получен в области, которая не характеризуется высокой SERS-активностью. Модулированный сигнал на спектре 3 вероятно обусловлен тем, что в области его регистрации не находились наночастицы серебра, так как в их присутствии должен гаситься фон люминесценции и присутствовать полосы, соответствующие хотя бы продуктам горения аналита. В то же время периодическая вариация сигнала характерна для спектров, регистрируемых с пористого кремния.

В качестве примера приведем сравнение трех спектров: профлавина, топотекана и их комплекса (рис. 5).

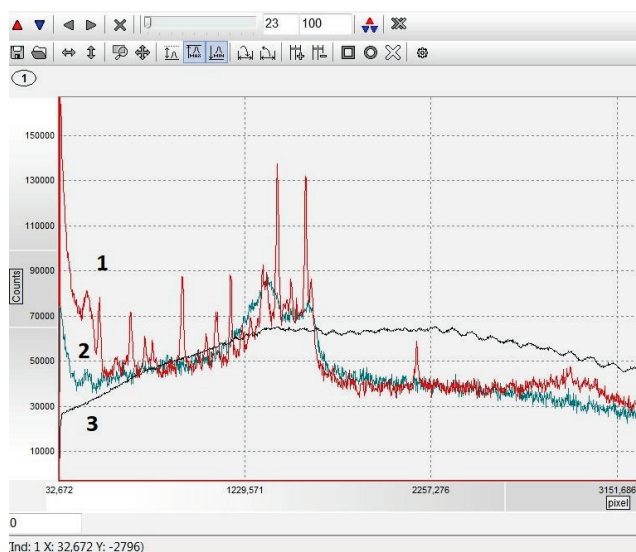


Рисунок 5. Сравнение спектров антибиотика топотекана (кривая 1), акридинового красителя профлавина (кривая 2) и их смеси (кривая 3)

В настоящий момент продолжается работа по подбору оптимальных режимов для получения качественных спектров всех анализируемых химических соединений и их комплексов. Также планируется провести повторные измерения с предварительной химической очисткой подложек.

Список литературы / References:

1. Сушинский М.М. *Комбинационное рассеяние света и строение вещества*. М.: Наука, 1981, 183 с. [Sushinsky M.M. *Combination scattering of light and the structure of matter*. М.: Nauka, 1981, 183 p. (In Russ.)]
2. Евстигнеев М.П. *Межмолекулярные взаимодействия биологически активных ароматических веществ и ДНК в водном растворе*. дис. ...докт. физ.-мат. наук: 03.00.02, Севастополь, 2006, 341 с. [Evstigneev M.P. *Intermolecular interactions of biologically active aromatic substances and DNA in aqueous solution*. Diss. ... doctor phys.-math. sci.: 03.00.02, Sevastopol, 2006, 341 p. (In Russ.)]
3. Эрнандес Сантьяго А.А. *Механизмы взаимодействия и конкурентного связывания с ДНК ароматических антиопухолевых препаратов*. Дис. кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02, Севастополь, 2006, 133 с. [Ernandes Sant' yago A.A. *Mechanisms of interaction and competitive binding with DNA of aromatic antitumor drugs*. Diss. ... candidate phys.-math. sci.: 03.00.02, Sevastopol, 2006, 133 p. (In Russ.)]
4. Mochalov K.E., Strel'tsov S.A., Ermishov M.A., Grokhovskioe S.L., Zhuze A.L., Ustinova O.A., Sukhanova A.V., Nabiev I.R., V.A. Olecenikov Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy of Topotecan-DNA Complexes: Binding to DNA Induces Topotecan Dimerization. *Optics and Spectroscopy*, 2002, vol. 93, no. 3, pp. 416-423.

INVESTIGATION OF THE COMPLEX FORMATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON SERS-SUBSTRATES BY RAMAN METHODS

Mosunov A.A.¹, Eletskaia A.A.¹, Bondarenko A.V.²

¹Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: aamosunov@sevsu.ru

²Belarusian State University of Informtics and Radioelectronics

P. Brovki str., 6, Minsk, 220013, Belarus

Abstract. In the article described investigation of complexation of biologically active agents (antibiotic topotecan, acridine dye proflavine, an analogue of vitamin B2 (riboflavin), the alkaloid caffeine), belonging to different classes of compounds using Raman spectroscopy. This study is important for explaining the mechanisms of modulation of biological activity of drugs, when they are used in the mode of complex therapy. The paper describes one technique for amplification of Raman signal, by applying a test substance to the plate with noble metals nanomaterials. A brief description of the technology for manufacturing these plates is also given. This article describes how to conduct an experiment on 3D laser scanning Raman microscope Confotec® NR500, as well as a brief analysis of some of the obtained spectra. The assumptions about the reasons for some failure of the experimental part are made and the ways of solving this problem are outlined.

Key words: *Raman-spectroscopy, SERS-substrate, complexation.*