

АНАЛИЗ ГЕТЕРОАССОЦИИИ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ С АРОМАТИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ

Сидорова М.А., Прозозин А.В., Лантушенко А.О., Бучельников А.А., Евстигнеев М.П.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: lantushenko@mail.ru

Аннотация. На основании данных УФ-видимой спектроскопии проведено исследование взаимодействия аллотропной формы углерода C₆₀ (фуллерена) с ароматическими лигандами: противоопухолевым антибиотиком доксорубицином (DOX) и красителями профлавином (PF) и метиленовым голубым (MB). Предложена масштабированная модель гетероассоциации фуллерена с лигандами, учитывающая самоассоциацию кластеров C₆₀ с образованием различных по размерам агрегатов. Определены коэффициенты экстинкции смешанных растворов и константы гетероассоциации на основе анализа экспериментальных концентрационных зависимостей разностного поглощения.

Ключевые слова: фуллерен, доксорубицин, профлавин, метиленовый голубой, лиганд, гетероассоциация.

C₆₀ FULLERENE HETEROASSOCIATION WITH AROMATIC LIGANDS

Sidorova M.A., Pronozin A.U., Lantushenko A.O., Buchelnikov A.S., Evstigneev M.P.

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: lantushenko@mail.ru

Abstract. Hetero-association of C₆₀ fullerene with aromatic ligands: antitumour antibiotic doxorubicin and dyes proflavine and methylene blue, – was studied by UF/visible spectroscopy. The up-scaled hetero-association model was developed, in which formation of C₆₀ clusters with different aggregate size was taken into account. The extinction coefficients of mixed solution and hetero-association constants were determined by analysis of experimental concentration dependences of differential absorption.

Key words: fullerene, doxorubicin, proflavine, methylene blue, ligand, hetero-association.

Введение. В последние годы наблюдается повышенный интерес к физико-химическим свойствам немодифицированного фуллерена C₆₀ (см. рис. 1а), что обусловлено его широким использованием в медицине и нанобиотехнологии. Ранее было показано, что фуллерен проявляет антиоксидантные свойства [1], способен подавлять рост злокачественных опухолей [2]. Кроме того, введение в организм больных раком мышей растворенного в воде фуллерена совместно с противоопухолевым препаратом доксорубицином усиливает действие последнего и приводит к торможению роста метастаз, увеличению продолжительности жизни животных и усилению защитных эффектов на различных клеточных уровнях [3]. В работе [4] было предположено, что ключевым механизмом, обуславливающим данный медико-биологический синергизм, является гетероассоциация фуллерена с антибиотиком.

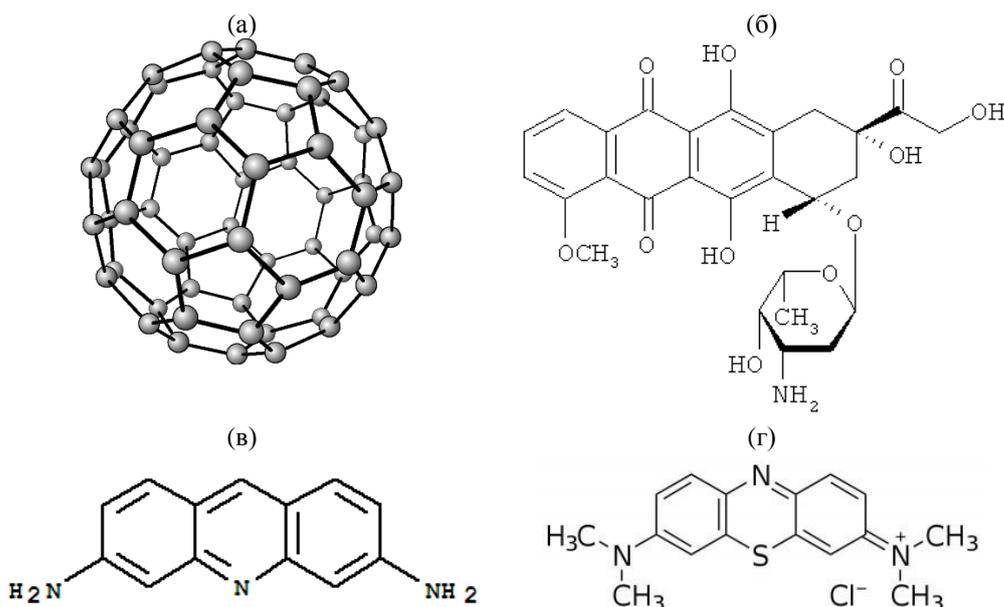


Рисунок 1 – Структуры фуллерена (а), доксорубицина (б), профлавина (в), метиленового голубого (г)

Знание термодинамических параметров нековалентного комплексообразования C_{60} с другими ароматическими БАС важно для понимания механизма биологического синергизма при их одновременном введении и может рационализировать поиск других противоопухолевых лекарственных веществ, которые потенциально могут изменять свою биологическую активность при совместном использовании с молекулами C_{60} .

В настоящей работе методом УФ-видимой спектроскопии была исследована гетероассоциация фуллерена C_{60} с доксорубицином (рис. 1б), профлавином (см. рис. 1в) и метиленовым голубым (см. рис. 1г).

Материалы и методы. Водный раствор очищенного стабильного фуллерена (C_{60} FAS, концентрация 0.7 мг/мл) был приготовлен путем переноса молекул C_{60} из толуола в воду с использованием ультразвукового размешивания [5]. Раствор, полученный данным методом, остается стабильным в течение 18 месяцев при температуре 4 °С.

Доксорубин (DOX) (Ebewe, Австрия) с концентрацией 2 мг/мл (3.448 моль/л) разбавлялся дистиллированной водой до концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Титрование выполнялось раствором с концентрацией $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Метиленовый Голубой (MB) (Sigma, США). Раствор с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л был получен путем растворения 1 мг препарата в 26.75 мл бидистиллированной воды. При дальнейшем разбавлении был получен рабочий раствор с концентрацией $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Для титрования использовался раствор с концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Профлавин (PF) (Sigma, США). Раствор с концентрацией $2.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л был получен путем растворения 1 мг препарата в 16.28 мл бидистиллированной воды. При дальнейшем разбавлении был получен рабочий раствор с концентрацией $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Для титрования использовался раствор с концентрацией $1.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Спектрофотометрические эксперименты. Спектры были записаны на двулучевом спектрометре SQ-4802 (UNICO, США) в полиметилакриловых кюветках с длиной оптической части 1 см (Испания), в которых можно проводить измерения в диапазоне длин волн 280-800 нм. Температура поддерживалась постоянной 300 К. Молекулы фуллерена при миллимолярных концентрациях дают широкий спектр, перекрывающий весь УФ- и видимый диапазон, что обусловлено светорассеянием молекул фуллерена. Для того, чтобы исключить фоновое рассеяние, все спектры записывались для смеси лиганда и C_{60} по сравнению с раствором чистого фуллерена при равных концентрациях в кювете сравнения. При проведении экспериментов изменялась концентрация фуллерена при постоянной концентрации лигандов. Спектры записывались в области 300-750 нм с шагом 0.5 нм.

Результаты и обсуждение. Параметры гетероассоциации лиганд-фуллерен определяли путем анализа зависимости дифференциального поглощения (A) в смешанных растворах от концентрации фуллерена (C) (см. рис. 2) [4]. Уменьшение A с ростом C является типичным для стекинга ароматических молекул (гипохромный эффект) и показывает отсутствие каких-либо особенностей в поглощении лиганда или фуллерена внутри комплекса. Численное описание концентрационной зависимости A производилось с помощью модели гетероассоциации.

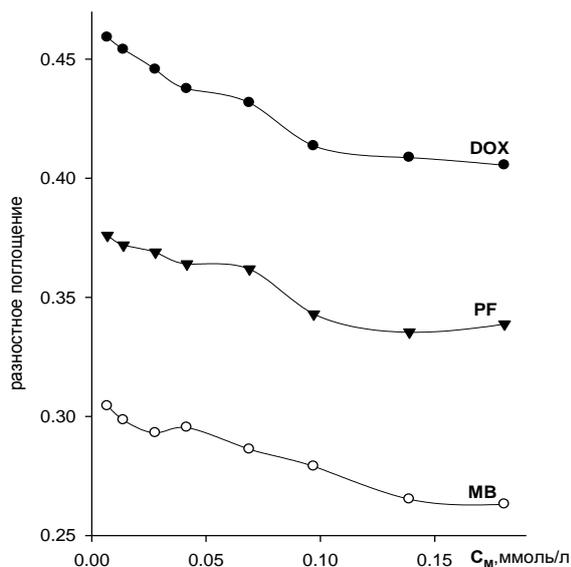


Рисунок 2 – Экспериментальная зависимость разностного поглощения от концентрации фуллерена при постоянной концентрации лигандов

Модель гетероассоциации фуллерена с лигандами, использованная в настоящей работе, была построена на основании масштабированной модели самоассоциации C_{60} , предложенной в работе [4]. В данной модели самоассоциация C_{60} , приводящая к образованию различных по размерам кластеров, учитывается наиболее строго.

Предполагается, что агрегированная форма кластера фуллеренов близка к сфере. Она характеризуется минимальной площадью доступной поверхности по сравнению с любыми другими геометрическими формами одного и того же объема и, как следствие, гидрофобно наиболее благоприятной ассоциацией в растворе [4]. Равновесие агрегатов C_{60} в растворе рассматривается как связывание некоторого минимального кластера с облаком из одиночных молекул фуллерена. Минимальный кластер содержит M фуллеренов, и рост размеров кластера обусловлен связыванием облаков с макроскопической константой K_R . Титрование раствора фуллерена раствором лиганда рассматривается как разбавление исходной концентрации фуллерена C_0 ($C_0 = 0.14$ мМ) на коэффициент разбавления r . Соответственно разбавляются исходные концентрации кластеров C_{M0} и облаков C_{R0} .

Будем рассматривать гетероассоциацию лиганда с кластерами фуллера как связывание облака из D лигандов с макроскопической константой гетероассоциации K_H . Тогда искомым микроскопическую константу гетероассоциации можно представить как $K_h = K_H/D$. Учитывая сказанное, полная система уравнений закона сохранения массы трехкомпонентной системы: «кластеры фуллера C_M » – «облака лиганда C_D » – «облака фуллеренов C_R » запишется в виде:

$$\begin{cases} C_0 = MC_{M0} + RC_{R0} \\ \frac{C_{M0}}{r} = \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} C_{M1} (K_R C_{R1})^i (K_H C_{D1})^j \\ \frac{C_{R0}}{r} = C_{R1} + \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} i C_{M1} (K_R C_{R1})^i (K_H C_{D1})^j \\ C_{D0} = C_{D1} D + \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} j \cdot D \cdot C_{M1} (K_R C_{R1})^i (K_H C_{D1})^j \end{cases} \quad (1)$$

где C_{D1} – концентрация несвязанных облаков лиганда; C_{D0} – концентрация лиганда.

В системе (1) индексы i и j означают, соответственно, количество облаков фуллеренов и лиганда, связавшихся с кластером из M фуллеренов. Произведем процедуру масштабирования по аналогии с [6] путем домножения каждого слагаемого в первых трех уравнениях (1) на M . В скобках множителя $(K_h C_{D1})^j$ умножаем и делим на D .

$$\begin{cases} C_0 = C'_{M0} + B \cdot C'_{R0} \\ \frac{C'_{M0}}{r} = \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} C'_{M1} (K'_R C'_{R1})^i (K_h C'_{D1})^j \\ \frac{C'_{R0}}{r} = C'_{R1} + \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} i C'_{M1} (K'_R C'_{R1})^i (K_h C'_{D1})^j \\ C_{D0} = C'_{D1} + \sum_{i=0}^{\infty} \sum_{j=0}^{\infty} j \cdot H \cdot C'_{M1} (K'_R C'_{R1})^i (K_h C'_{D1})^j \end{cases} \quad (2)$$

где $B = \frac{R}{M}$; $K'_R = \frac{K_R}{M}$; $H = \frac{D}{M}$; $C'_{M0} = C_{M0} \cdot M$; $C'_{R0} = C_{R0} \cdot M$; $C'_{M1} = C_{M1} \cdot M$; $C'_{R1} = C_{R1} \cdot M$; $C'_{D1} = C_{D1} \cdot D$;
 $K_h = \frac{K_H}{D}$.

Раскроем суммы в системе (2).

$$\begin{cases} C_0 = C'_{M0} + B \cdot C'_{R0} \\ \frac{C'_{M0}}{r} = \frac{C'_{M1}}{(1 - K'_R C'_{R1})(1 - K_h C'_{D1})} \\ \frac{C'_{R0}}{r} = C'_{R1} + \frac{C'_{M1} K'_R C'_{R1}}{(1 - K'_R C'_{R1})^2 (1 - K_h C'_{D1})} \\ C_{D0} = C'_{D1} + \frac{C'_{M1} H K_h C'_{D1}}{(1 - K'_R C'_{R1})(1 - K_h C'_{D1})^2} \end{cases} \quad (3)$$

Выражая C'_{R0} и C'_{M1} из первого и второго уравнений (3) соответственно, получаем

$$\begin{cases} \frac{C_0 - C'_{M0}}{rB} = C'_{R1} + \frac{K'_R C'_{R1} C'_{M0}}{r(1 - K'_R C'_{R1})} \\ C_{D0} = C'_{D1} + \frac{K_h H C'_{D1} C'_{M0}}{r(1 - K_h C'_{D1})} \end{cases} \quad (4)$$

Решение (4) дает полный набор мономерных концентраций

$$\left\{ \begin{aligned} C'_{R1} &= \frac{r + C'_{M0}BK_F + (C_0 - C'_{M0})K_F - \sqrt{[r + C'_{M0}BK_F + (C_0 - C'_{M0})K_F]^2 - 4rK_F(C_0 - C'_{M0})}}{2rBK_F} \\ C'_{D1} &= \frac{r + C'_{M0}HK_h + C_{D0}K_h r - \sqrt{[r + C'_{M0}HK_h + C_{D0}K_h r]^2 - 4r^2K_h C_{D0}}}{2rK_h} \\ C'_{M1} &= \frac{C'_{M0}}{r} (1 - K_F BC'_{R1})(1 - K_h C'_{D1}) \end{aligned} \right. \quad (5)$$

где $K_F = 56000 \text{ M}^{-1}$; $B = 0.914$; $C_0 = 0.14 \text{ mM}$; $C'_{M0} = 0.009 \text{ mM}$. Неизвестными являются переменные H и K_h , которые представляют собой подгоночные параметры при минимизации экспериментальной кривой.

Наблюдаемая оптическая плотность лиганда в видимой области:

$$A = (\varepsilon_m - \varepsilon_h) C'_{D1} + \varepsilon_h C_{D0}, \quad (6)$$

где коэффициент экстинкции в комплексе ε_h является третьим подгоночным параметром.

В настоящей работе расчеты проводились по модели (6) с учетом (5), т.е. при минимизации экспериментальной кривой использовались 3 подгоночных параметра: K_h , ε_h и H (см. табл. 1). В качестве ограничения для параметра H использовались значения числа N заполнения поверхности C_{60} молекулами лиганда [4].

Таблица 1 – Расчетные параметры гетероассоциации ароматических лигандов с фуллереном C_{60} .

лиганд	H	$K_h, \text{л/моль}$	$\varepsilon_h, \text{л/моль} \cdot \text{см}$
DOX	3	16220	8.22
PF	7	9180	22.04
MB	5	5480	24.67

Полученные результаты находятся в хорошем соответствии со значениями параметров гетероассоциации фуллерена и этих же лигандов, полученными ранее с помощью полуэмпирической модели гетероассоциации [6], описывающей кластеризацию фуллерена существенно приближенно. Таким образом, рассмотренная в данной работе масштабированная модель гетероассоциации может быть использована для анализа комплекссообразования фуллерена с другими лигандами в водном растворе.

Список литературы / References:

1. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O., Prylutsky Y.I., Ritter U., Scharff P. Anti-oxidant properties of C_{60} fullerenes in vitro. *Fuller nanotub Carbon nanostr.*, 2008, vol. 16, no. 5-6, pp. 698-705.
2. Prylutska S., Burlaka A., Prylutsky Y.I., Ritter U., Scharff P. Pristine C_{60} fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp Oncol.*, 2011, vol. 33, pp.162-164.
3. Prylutska S., Burlaka A., Prylutsky Y.I. Comparative study of antitumor effect of pristine C_{60} fullerenes and doxorubicin. *Biotechnol.*, 2011, vol. 4, no. 6, pp. 82-87.
4. Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Voronin D.P., Rubin Y.V., Belous L.F., Prylutsky Y., Ritter U. Complexation of C_{60} Fullerene with Aromatic Drugs. *J. ChemPhysChem*, 2013, vol. 14, pp. 568-578.
5. Prylutsky Y.I., Petrenko V.I., Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Bulavin L.A., Litsis O.O., Evstigneev M.P., Cherepanov V.V., Naumovets A.G., Ritter U. On the origin of C_{60} fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir*, 2014, vol. 30, pp. 3967-3970.
6. Prylutsky Y.I., Buchelnikov A.S., Voronin D.P., Kostjukov V.V., Ritter U., Parkinson J. A., Evstigneev M. P. C_{60} fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 2013, vol. 15, pp. 9351-9360.