

УДК 544.52

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНОЙ НАНОСТРУКТУРЫ  
НА ОСНОВЕ ПОЛИКАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ФУЛЛЕРЕНА  
И ФТАЛОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ФОТОСЕНС**

© 2013 г. А. И. Котельников, А. Ю. Рыбкин, Н. С. Горячев,  
А. Ю. Белик, А. Б. Корнев, П. А. Трошин

Представлено академиком С.М. Алдошиным 25.02.2013 г.

Поступило 11.03.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565213240158

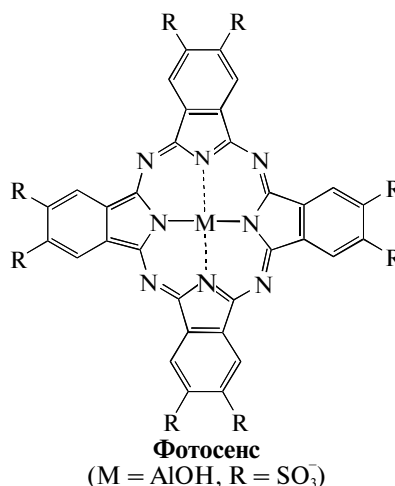
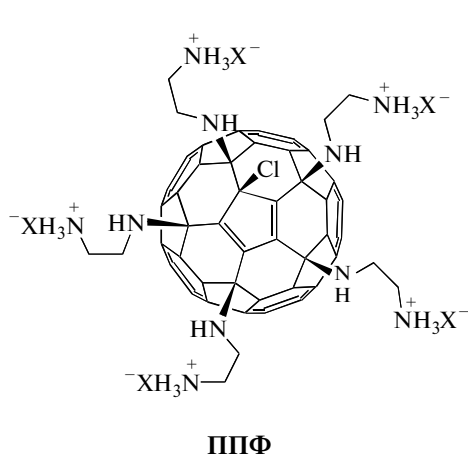
Известно, что фуллерены при возбуждении квантом света практически со 100%-м квантовым выходом переходят в триплетное состояние и далее, в результате его дезактивации, в зависимости от полярности среды эффективно генерируют синглетный кислород  $^1O_2$  либо супероксид-анион-радикалы  $O_2^{\cdot -}$  и другие активные радикалы [1]. Опубликовано значительное количество работ по фотодинамическому действию фуллеренов и их производных, приводящему в результате генерации активных радикалов к повреждению ДНК, белков, мембран, а также к подавлению размножения опухолевых клеток, вирусов и бактерий [2]. Однако эффективность фотодинамического действия фуллеренов и перспектива их применения в медицине существенно ограничиваются слабым поглощением фуллеренов в видимой области спектра, особенно в диапазоне 650–800 нм, наиболее удобном для фотодинамической терапии.

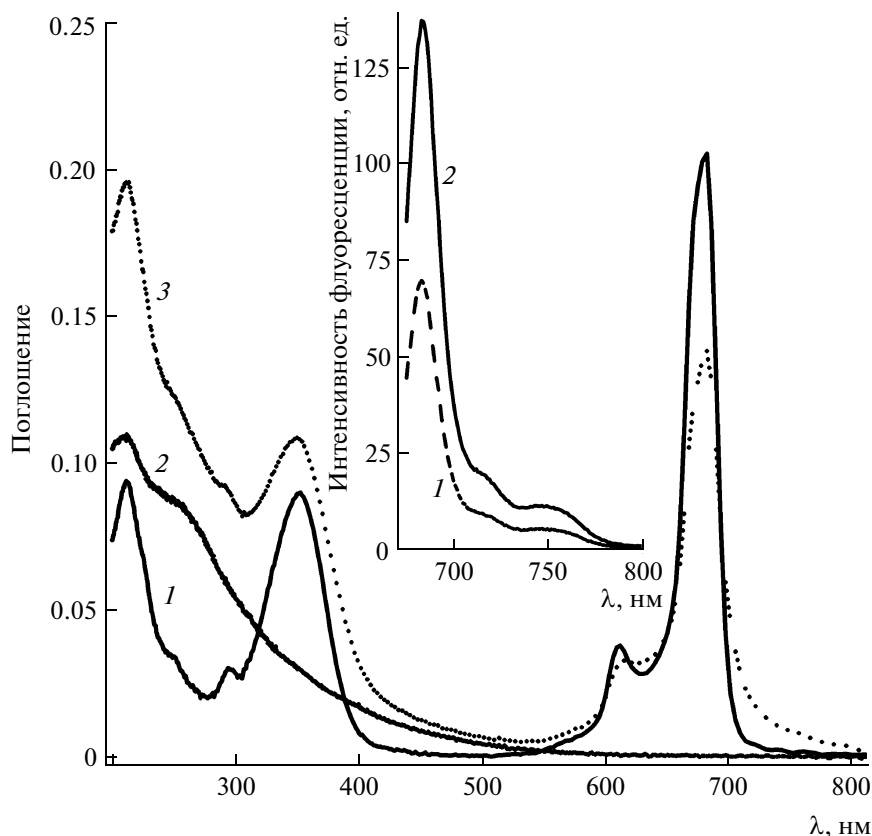
Значительно повысить эффективность фотодинамического действия фуллеренов можно путем создания гибридных наноструктур (ГНС) при образовании комплекса фуллерена с красителем,

эффективно поглощающим в видимой области спектра [3]. При образовании такого комплекса возможны эффективное поглощение кванта света красителем и перенос возбуждения или электрона с красителя на фуллерен. Дальнейший перенос возбуждения или электрона с фуллерена на молекулярный кислород приведет к генерации активных форм кислорода. В результате создание такой ГНС на основе фуллерена и красителя может значительно повысить эффективность фотодинамической терапии.

Отдельными проблемами при создании фотодинамических препаратов медицинского назначения являются их растворимость в воде и способность селективно накапливаться в терапевтических мишенях.

В настоящей работе проведено исследование спектрально-люминесцентных свойств и фотохимической активности ГНС на основе комплекса водорастворимого поликатионного производного фуллерена  $C_{60}$  (ППФ) с фталоцианиновым красителем Фотосенс, широко используемым в клинической практике в качестве фотодинамического агента.





**Рис. 1.** Спектры поглощения.

1 – Фотосенс в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М, 2 – ППФ в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М, 3 – Фотосенс в присутствии ППФ в эквимольной концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М. На вставке даны спектры флуоресценции Фотосенса.

1 – в отсутствие тушителя, 2 – в присутствии ППФ в эквимольной концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М.  $\lambda_{\text{возб}} = 683$  нм.

Водорастворимое производное фуллерена ППФ было получено путем присоединения к сфероиду фуллерена пяти аддендов – остатков этилендиамина, содержащих солибилизирующие аминные группы [5]. Такие производные фуллеренов обладают высокой растворимостью в воде, превышающей 100 мг/мл. Структура ППФ была доказана методами ИК-спектроскопии, ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , а также спрей-масс-спектрометрии.

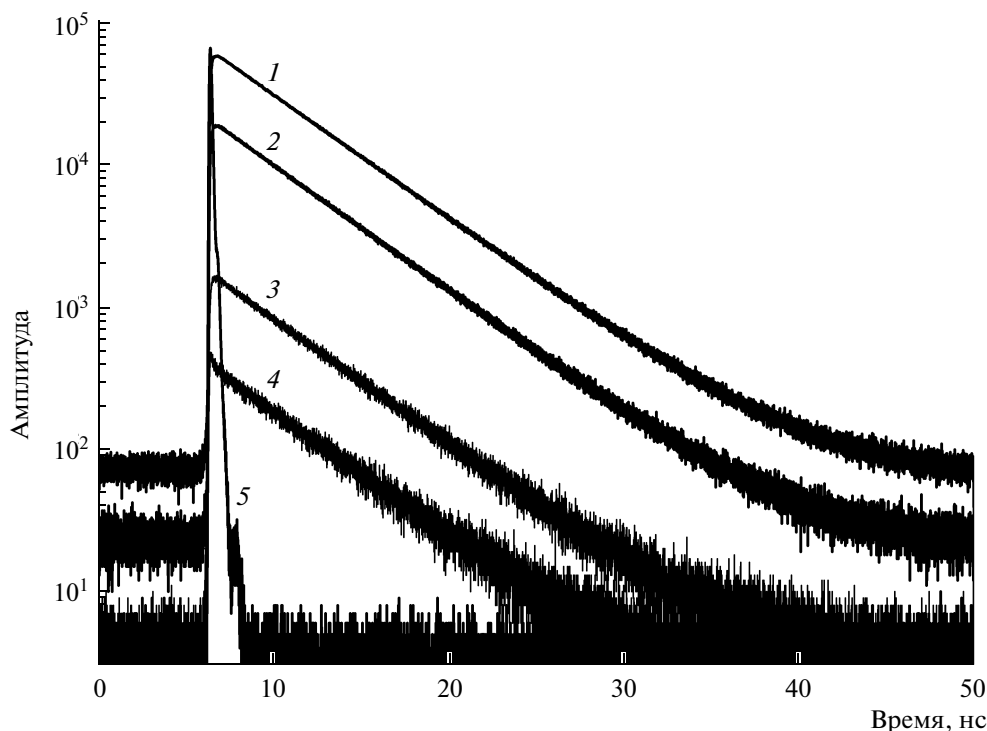
Спектр поглощения ППФ и спектр поглощения Фотосенса в эквимольной концентрации ( $2 \cdot 10^{-6}$  М) приведены на рис. 1. В максимуме поглощения Фотосенса на длине волны 683 нм краситель обладает поглощением, превышающим поглощение ППФ в 420 раз.

При добавлении в раствор Фотосенса ППФ в малых концентрациях ( $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М) наблюдается изменение спектра поглощения Фотосенса (рис. 1), тушение стационарной флуоресценции Фотосенса (рис. 1) и падение интенсивности кинетических кривых затухания флуоресценции (более чем в 100 раз) без изменения ее времени за-

тухания (рис. 2). Эти эффекты можно объяснить образованием статических комплексов соединения ППФ с Фотосенсом.

Учитывая спектральные и донорно-акцепторные свойства фуллеренов, можно предположить два механизма тушения флуоресценции Фотосенса в составе комплекса с ППФ: за счет индуктивно-резонансного диполь-дипольного переноса энергии и по механизму переноса электрона.

Известно, что первый механизм – индуктивно-резонансный диполь-дипольный перенос энергии возбуждения – осуществляется при наличии перекрытия спектров люминесценции донора (Фотосенса) и акцептора (ППФ) [6]. Как видно из рис. 1, такое перекрытие наблюдается, хотя ППФ в диапазоне 550–800 нм имеет весьма малое поглощение. Используя формализм теории Фёрстера [6], можно оценить, что для осуществления тушения флуоресценции Фотосенса в 100 раз расстояние между ним и ядром фуллерена должно быть менее 8 Å, что соответствует предполагаемой структуре комплекса.



**Рис. 2.** Кинетика затухания флуоресценции Фотосенса (водный раствор, концентрация  $2.1 \cdot 10^{-6}$  М). 1 — в отсутствие ППФ; 2–4 — в присутствии ППФ в концентрации  $2.4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6.9 \cdot 10^{-6}$  и  $1.1 \cdot 10^{-5}$  М соответственно; 5 — аппаратная функция.

Вторым механизмом дезактивации синглетного состояния Фотосенса может быть тушение по механизму переноса электрона. Согласно теории внешнесферного переноса электрона, эффективность его переноса между донором и акцептором экспоненциально зависит от расстояния переноса [7, 8].

При оптимальных условиях реакции для оценки скорости реакции переноса электрона ( $et$ ) может быть применена формула

$$k_{et} = k_0 \exp(-\alpha R), \quad (1)$$

которая была получена в результате обобщения данных по переносу электрона в различных молекулярных структурах, в том числе с участием фотовозбужденных молекул [9, 10]. Здесь  $k_0 = 10^{16} \text{ с}^{-1}$ ;  $R$  — расстояние между центрами переноса;  $\alpha$  — параметр, характеризующий влияние среды на перекрывание волновых функций донора и акцептора за счет суперобменных взаимодействий. В зависимости от типа матрицы, разделяющей донор и акцептор, значение  $\alpha$  может составлять  $0.9 \text{ \AA}^{-1}$  для насыщенных углеводородных цепей,  $1.4 \text{ \AA}^{-1}$  для белковых глобул,  $1.8\text{--}2.4 \text{ \AA}^{-1}$  для молекул воды [11].

Как было измерено, время жизни возбужденного синглетного состояния свободного Фотосенса в

условиях эксперимента равно  $4.99 \pm 0.01$  нс (кинетическая зависимость  $I$  на рис. 2). Принимая, что в результате образования комплекса осуществляется тушение флуоресценции в 100 раз. Тогда из формулы (1) можно оценить, что перенос электрона с возбужденного Фотосенса на фуллерен за время  $\sim 0.05$  нс вдоль насыщенной углеводородной цепи ( $\alpha = 0.9 \text{ \AA}^{-1}$ ) может произойти на расстояние до  $25 \text{ \AA}$ , что также не противоречит структуре предполагаемого комплекса.

Таким образом, эффект изменения спектров поглощения и тушения флуоресценции Фотосенса при введении в раствор ППФ означает образование комплекса ППФ–Фотосенс. В составе этого комплекса осуществляется перенос возбуждения или электрона на фуллереновое ядро, что должно способствовать генерации  $\text{O}_2^{\cdot -}$ .

Фотодинамическую активность ППФ, Фотосенса и комплекса ППФ–Фотосенс оценивали по генерации  $\text{O}_2^{\cdot -}$  при облучении светом с  $\lambda > 650$  нм 10-миллиметровой кюветы с реакционной смесью, содержащей водный раствор ППФ или/и Фотосенса в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М, а также NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, “Sigma”), NBT (nitro blue tetrazolium chloride, “MP Biomedical”) и EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, “Sigma”),

как описано в [3]. Количество получающегося  $O_2^-$  определяли по образованию формазана, регистрируя оптическую плотность на длине волны 560 нм [1].

Исследование фотодинамической активности ППФ и Фотосенса как индивидуальных соединений показало, что при возбуждении светом с  $\lambda > 650$  нм как Фотосенс, так и ППФ обладают заметной фотодинамической активностью, при этом активность Фотосенса всего в 5.4 раза выше активности ППФ (рис. 3). С учетом разницы в коэффициентах экстинкции ( $\epsilon_{683} = 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для Фотосенса и  $0.23 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для ППФ) фотодинамическая активность ППФ в расчете на один поглощенный квант превышает аналогичную активность коммерческого препарата Фотосенса примерно в 77 раз.

Добавление ППФ к раствору Фотосенса в эквимольной концентрации приводило к значительному увеличению скорости фотохимической реакции по сравнению с фотодинамической активностью индивидуальных соединений. В этом случае скорость реакции более чем в 10 раз превышает сумму индивидуальных вкладов соединений в общую скорость реакции (рис. 3). Очевидно, что это обусловлено взаимодействием соединений в растворе.

Используя данные по тушению стационарной флуоресценции, можно определить, что в условиях эксперимента в растворе лишь 50% молекул ППФ и Фотосенса находятся в составе комплекса. С учетом этого можно оценить, что скорость фотохимической реакции, осуществляемой комплексом ППФ–Фотосенс, возрастает в 20 раз по сравнению с фотодинамической активностью Фотосенса и в 108 раз по сравнению с фотодинамической активностью ППФ.

Таким образом, экспериментально показано, что в водном растворе при возбуждении в области длин волн более 650 нм ППФ обладают значительной фотодинамической активностью, сопоставимой с активностью коммерческого препарата Фотосенса при равных концентрациях, и превосходят его по величине квантового выхода реакции в 77 раз.

При взаимодействии ППФ и Фотосенса в растворе образуется комплекс, для которого при возбуждении в полосе поглощения Фотосенса наблюдается фотодинамическая активность, превышающая фотодинамическую активность индивидуальных молекул Фотосенса в 20 раз и ППФ в 108 раз.

Обычно считается, что способность Фотосенса и других красителей генерировать активные формы кислорода обусловлена переносом возбуждения или электрона на молекулы кислорода с триплетных уровней этих красителей. В настоя-

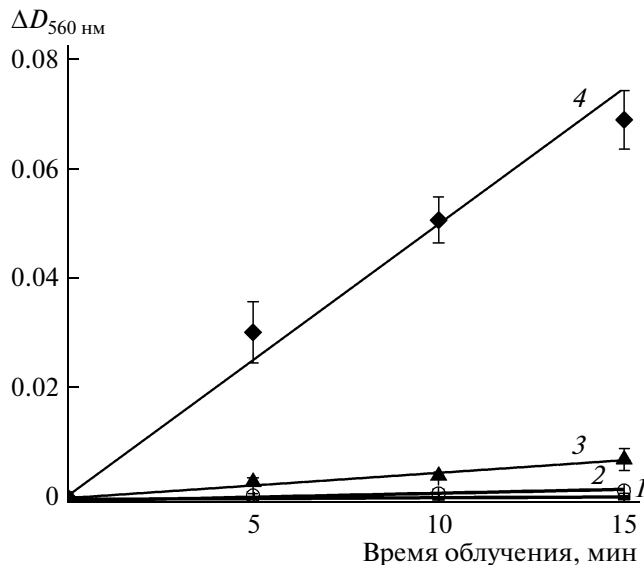


Рис. 3. Кинетика образования  $O_2^-$  в результате фотохимической реакции при освещении светом с  $\lambda > 650$  нм.

1 – контроль, 2 – ППФ, 3 – Фотосенс, 4 – комплекс ППФ–Фотосенс.

щей работе впервые показано, что высокая фотодинамическая активность комплекса ППФ–Фотосенс определяется эффективным переносом энергии или электрона в составе гибридной наноструктуры на фуллереновое ядро с синглетного уровня красителя. Это открывает перспективы для создания на основе фуллеренов эффективных фотодинамических препаратов нового поколения с использованием красителей, возбуждаемых только в синглетное состояние, что значительно расширяет возможности выбора красителей.

Авторы выражают благодарность профессору Р.И. Якубовской (Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена) за предоставление препарата Фотосенс.

Исследования поддержаны Президиумом РАН (программа № 24 “Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов”) и РФФИ (грант 10–03–00687).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., Arakane K., Miyata N., Goda Y., Masumizu T., Nagano T. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 12803–12809.
2. Mroz P., Pawlak A., Satti M., Lee H., Wharton T., Gali H., Sarna T., Hamblin M.R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. № 5. P. 711–719.

3. *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. № 7/8. С. 86–90.
4. *Aborgast J.W., Darmanyan A.P., Foote C.S., Diederich F.N., Rubin Y., Diederich F., Alvarez M.M., Anz S.J., Whetten R.L.* // J. Phys. Chem. 1991. V. 95. P. 11–12.
5. *Troshin P.A., Troshina O.A., Peregudova S.M., Yudanov A.I., Buyanovskaya A.G., Konarev D.V., Peregudov A.S., Lapshina A.N., Lyubovskaya R.N.* // Mendeleev Commun. 2006. V. 16. № 4. P. 206–208.
6. *Förster Th.* // Ann. Phys. 1948. V. 2. № 1/2. P. 55–75.
7. *Левич В.Г., Догондзе Р.Р.* // ДАН. 1959. Т. 124. № 1. С. 123–126.
8. *Marcus R.A., Sutin N.* // Biochem. et biophys. acta. 1985. V. 811. P. 265–322.
9. *Котельников А.И.* // Биофизика. 1993. Т. 38. № 2. С. 228–232.
10. *Moser C.C., Keske J.M., Warncke K., Farid R.S., Dutton P.L.* // Nature. 1992. V. 355. P. 796–802.