

# Флуоресцентные биомаркеры на основе наноалмазов детонационного синтеза

Н. В. Белько<sup>1</sup>, А. А. Луговский<sup>2</sup>, Г. А. Гусаков<sup>1</sup>, М. П. Самцов<sup>1</sup>, А. П. Луговский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск; e-mail: nikita.belko@gmail.com

<sup>2</sup>Учреждение «Республиканский центр проблем человека» Белорусского государственного университета, Минск

Разработаны методы получения нанокомпозитов модифицированного ультрадисперсного алмаза детонационного синтеза с индотрикарбоцианиновым красителем. Предварительная подготовка поверхности наноалмаза проводилась посредством вакуумного отжига и последующего озонирования в щелочной среде. Синтез комплексов проведен с использованием ковалентного связывания с карбоксильными группами модифицированного наноалмаза. Исследование электронных и колебательных характеристик полученных соединений показало наличие устойчивого связывания красителя с поверхностью наноалмаза.

**Ключевые слова:** ультрадисперсный алмаз, индотрикарбоцианиновые красители, флуоресцентные зонды, биомаркеры.

## Введение

В современной медицине все большее внимание уделяется развитию методов диагностической визуализации патологических очагов и их мониторинга в процессе лечения с высокой чувствительностью и молекулярной специфичностью [1]. В связи с этим разработка новых флуоресцентных зондов для области прозрачности тканей является актуальной задачей. Такие соединения должны быть малотоксичными, обладать высокой степенью селективности накопления в клетках-мишенях, а также характеризоваться высоким коэффициентом поглощения и квантовым выходом флуоресценции. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза (УДА) являются одной из наиболее привлекательных платформ для создания подобных комплексов. Малый размер частиц (порядка 5 нм) и их низкая токсичность делают УДА безопасными при внутривенном введении. Большая активная поверхность частиц УДА и потенциальная возможность управления ее функциональным составом делают этот материал весьма привлекательным для использования в качестве платформы для исследований клеточных процессов в биологии, диагностики и лечения болезней.

Ранее нами был синтезирован ряд индотрикарбоцианиновых красителей с орто-фениленовым мостиком, которые характеризуются поглощением в желто-красной области спектра и люминесценцией в красном и ближнем инфракрасном диапазонах, что соответствуют области прозрачности живых тканей. Кроме того, испытания *in vivo* некоторых из этих красителей показали наличие высокой селективности накопления в опухолевых тканях. Таким образом, индотрикарбоцианиновые красители являются перспективным материалом для разработки систем визуализации биологических процессов.

## 1. Материалы и методы исследований

В настоящей работе исследовался алмаз марки УДА-СП производства ЗАО «Синта» (г. Минск). Данный материал обладает полифункциональной поверхностью, что затрудняет селективное проведение ее модификации. Ранее нами было показано, что вакуумный отжиг при  $T \leq 750$  °С не влияет на структуру алмазных наночастиц, однако при этом происходит практически полное удаление с поверхности УДА кислород- и азотсодержащих функциональных групп. Образцы УДА исследовались

методом колебательной ИК-спектроскопии. Спектры регистрировались на Фурье-спектрометре Vertex 70 (Bruker, Германия).

## 2. Синтез

Модификация УДА проводилась индотрикарбоцианиновым красителем, N-алкилированным триметиленкарбоксылным фрагментом. На первом этапе модификации на поверхность УДА вводилась карбоксылная группа методом озонирования. Эта функциональная группа наиболее удобна для дальнейшего ковалентного связывания. К ней можно осуществить привитие аминов, спиртов, тиосоединений и др. Озонирование УДА после термообработки проводилось в водной среде в присутствии перекиси водорода в щелочной среде в течение различного временного периода: 0.5, 1 и 2 часа. Дальнейшее выделение УДА проводилось центрифугированием и пятикратной промывкой деионизованной водой. В дальнейшем проводилась двухступенчатая модификация карбоксылной группы на поверхности УДА. На первой стадии проводилось получение хлорангидрида в 1,2-дихлорэтано. Далее хлорангидрид УДА после отгонки растворителя при пониженном давлении помещался в предварительно осушенный бензол и вводился в реакцию с гексаметилендиамином с образованием амида. Полученный амид несколько раз промывался ацетоном и затем деионизованной водой для полного удаления непрореагировавшего гексаметилендиамина.

Привитие красителя проводилось по классической схеме получения амидов. Предварительно краситель растворялся в 1,2-дихлорэтано, к нему добавлялся дициклогексилкарбодиимид и N-гидроксисукцинимид, после уже в реакционную смесь вводился амид УДА.

## 3. Обсуждение результатов

По результатам анализа спектров ИК-поглощения полученных образцов УДА необходимо отметить следующие факты. На рис. 1 приведены колебательные спектры исходного термообработанного УДА (1) и после озонирования (2–4) в диапазоне 1000–2000  $\text{см}^{-1}$ . В области 1050–1300  $\text{см}^{-1}$  не происходит каких-либо значительных изменений. Эта область характеризуется наличием валентных C–O колебаний вторичных или третичных спиртовых групп, а также валентных C–C колебаний. Это согласуется с известными фактами об инертности к реакции озонирования спиртов и предельных углеводов. В то же время в спектре поглощения значительно усиливается узкая интенсивная полоса 1384  $\text{см}^{-1}$ , которая связана с нитрат-ионом ( $\text{NO}_3$ ). Таким образом, можно отметить наличие процесса окисления поверхностных амино-, азо- или аналогичных групп озонем с образованием нитро-группы. Образование карбоксылных групп на поверхности УДА связывается в первую очередь с появлением полосы в области 1570  $\text{см}^{-1}$ , характерной для асимметрических колебаний ионизованной карбоксылной группы ( $-\text{COO}^-$ ). Появление ее характерно для УДА, выделяемого из щелочной среды. Следует отметить, что при подкислении УДА соляной кислотой до pH 3 поглощение в области 1570  $\text{см}^{-1}$  уже отсутствует. В то же время в колебательном спектре появляется поглощение, характерное для карбоксылной группы ( $-\text{COOH}$ ). Полоса около 1625  $\text{см}^{-1}$  связана с колебаниями OH-группы воды.

Получение амида на поверхности УДА подтверждается появлением характеристических полос 1660  $\text{см}^{-1}$  (амид I) и 1573  $\text{см}^{-1}$  (амид II), а также характерной для гексаметилендиамина группы полос в области 1400–1500  $\text{см}^{-1}$  (рис. 2).

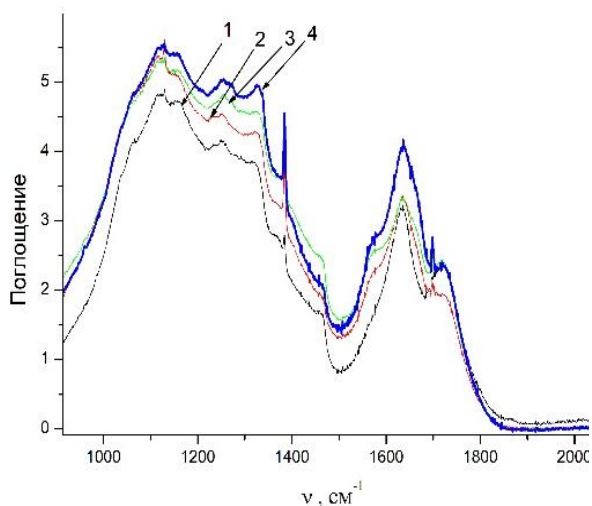


Рис.1 – Колебательный спектр образцов УДА после термической обработки (1) и после озонирования в течении 0,5 ч (2), 1 ч (3) и 2 ч (4).

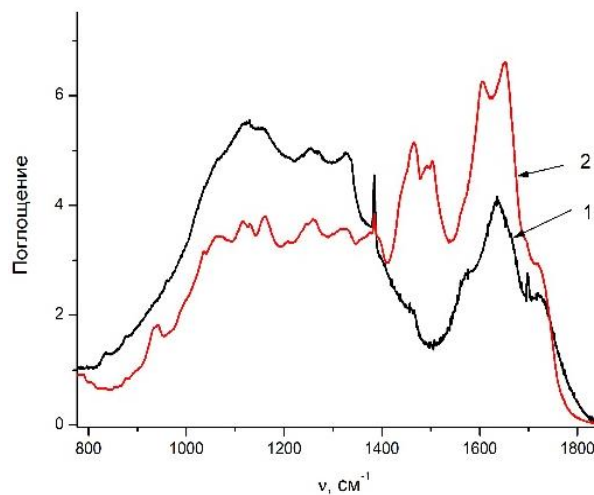


Рис. 2 – Колебательный спектр образцов УДА после озонирования (1) и после привития гексаметилендиамина (2).

Полученные электронные спектры (рис. 3) подтверждают ковалентное привитие молекулы индотрикарбоцианинового красителя к поверхности УДА.

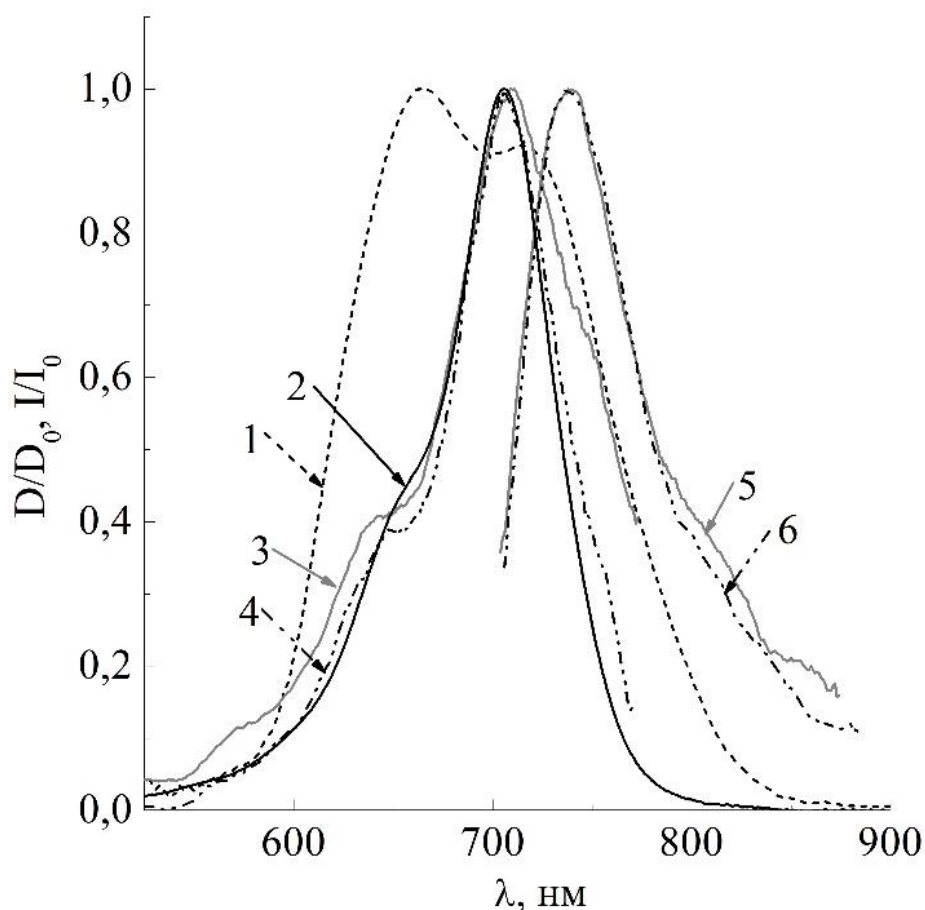


Рис. 3. – Нормированные спектры поглощения (1, 2); возбуждения флуоресценции, регистрация при 800 нм (3, 4); испускания флуоресценции, возбуждение при 690 нм (5, 6) наноструктуры УДА-краситель (1, 3, 5), мономеров красителя в водном растворе (2, 4, 6).

Не наблюдается каких-либо значительных изменений в спектрах поглощения и флуоресценции наноструктуры УДА-краситель по сравнению с исходным индотрикарбоницианиновым красителем. Краситель в водном растворе, а также наноструктуры УДА-краситель обладают близкими по форме спектрами возбуждения и испускания флуоресценции. Максимум спектров флуоресценции в обоих случаях расположен при 738 нм. Максимум спектра возбуждения флуоресценции красителя в присутствии УДА смещен от 706 до 710 нм и спектр имеет большую полуширину ( $1824 \text{ см}^{-1}$  для наноструктур УДА-краситель против  $1431 \text{ см}^{-1}$  для раствора красителя), что объясняется светорассеянием на частицах наноалмаза. Степень поляризации флуоресценции свободных мономеров красителя в водном растворе составляет  $(31 \pm 2) \%$ , а ее время жизни –  $(0,5 \pm 0,1) \text{ нс}$ . Для наноструктур УДА-краситель данные параметры имеют такие же значения в пределах ошибки измерений. Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие гексаметиленового линкера слабо влияет на уровни энергии хромофора и его подвижность.

### **Заключение**

В результате исследования установлено, что разработанная методика озонирования предварительно отожденного в вакууме УДА позволяет создать на его поверхности монофункциональный слой карбоксильных групп с небольшой примесью нитро-групп. Последующее двухступенчатое привитие гексаметилендиамина к карбоксильной группе позволяет получить свободную аминогруппу, удаленную от поверхности УДА на 6 метиленовых звеньев, а данный объект далее модифицируется полиметиновым красителем. Полученное соединение обладает спектральными характеристиками, аналогичными свободной молекуле красителя, и может использоваться в качестве флуоресцентной метки для области прозрачности биологических тканей

### **Благодарности**

Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Республики Беларусь.

### **Литература**

1. Detonation Nanodiamonds: Science and Applications. Eds.: A. Vul', O. Shenderova. Boca Raton: Pan Stanford Publishing, 2013.

## **Fluorescent biomarkers based on detonation nanodiamonds**

N.V. Belko<sup>1</sup>, A.A. Lugovski<sup>2</sup>, G.A. Gusakov<sup>1</sup>, M.P. Samtsov<sup>1</sup>, A.P. Lugovski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*A.N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of the Belarusian State University, Minsk; e-mail: nikita.belko@gmail.com*

<sup>2</sup>*Republican Scientific Center for Human Issues of the Belarusian State University, Minsk*

Methods to prepare nanocomposites of modified detonation nanodiamonds with an indotricarbocyanine dye were developed. The preliminary treatment of the nanodiamond surface was carried out by means of vacuum annealing and subsequent ozonation in an alkaline medium. The complexes with the indotricarbocyanine dye were synthesized using covalent bonding with the carboxyl groups of the modified nanodiamonds. The study of the electronic and vibrational characteristics of the obtained complexes showed the presence of stable binding of the dye to the nanodiamond surface.

**Keywords:** nanodiamond, indotricarbocyanine dyes, fluorescent probes, biomarkers.