

УДК 577.322; 535.373

НАНОЧАСТИЦЫ AG И CDS, СИНТЕЗИРОВАННЫЕ В ПИГМЕНТЕ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ, ФИКОЭРИТРИНЕ: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ**О.Д. Бекасова***Институт биохимии им А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Рак, наряду с сердечно-сосудистыми заболеваниями, является главной причиной смерти во всем мире. Согласно данным Онкологического Общества США, ожидается рост числа скончавшихся от рака с 14 млн/год в 2012 году и 17 млн в 2018 году до 21,7 млн случаев к 2030 году, а к 2040 году до 27,5 млн [1, 2]. Методы используемые для лечения рака (лучевая терапия, химиотерапия, хирургия, фотодинамическая терапия, трансформация стволовых клеток) и их комбинации часто сопровождаются тяжелыми побочными эффектами. В связи с этим развитие новейших нанотехнологий, включая зеленый синтез наночастиц благородных металлов и наночастиц со свойствами полупроводников, а также разработка новых методов лечения рака с одновременной диагностикой и терапией очень востребованы [3]. Наиболее часто для зеленого синтеза используются водные гомогенаты растений, водорослей, грибов или микроорганизмов. К гомогенатам добавляют соли металлов, которые восстанавливаются в процессе биокатализа до металлов и формируют наночастицы. Другие «зеленые» подходы к синтезу наночастиц разработаны с использованием природных биологически активных веществ, таких как белки, ферменты, полисахариды, аминокислоты и витамины, которые могут выступать в качестве восстановителей для ионов металлов и в качестве матрицы, препятствующей разрастанию наночастиц. Зеленый синтез наночастиц является недорогим, экологически безопасным, легко воспроизводимым в производстве методом. Наночастицы, полученные зеленым синтезом, обладают повышенной опухолевой специфичностью, активностью, высокой биосовместимостью и менее токсичны по сравнению с наночастицами, полученными химическим синтезом [4]. Форма, размер, свойства поверхности и стабильность наночастиц влияют на время циркуляции, клеточное поглощение, биораспределение и доставку противораковых препаратов [5]. Важно, что наночастицы, синтезированные зеленым методом, используются как потенциальные фармацевтические агенты для лечения не только рака, но и других заболеваний, таких как малярия, ВИЧ-инфекция, гепатит, диабет [6, 7].

Характеризация R-фикоэритрина. R-фикоэритрин – фотосинтетический пигмент Rhodophyta представляет собой сложный белок с молекулярной массой 290 000, содержит хромофорные группы в виде линейных тетрапирролов. Нативный R-фикоэритрин представляет собой гексамер, который состоит из двух дисковидных тримеров диаметром 10–12 нм и толщиной 3 нм, соединенных по типу сэндвича. В центре гексамеров имеются идентичные туннельные полости диаметром 3–3,5 нм и длиной 6 нм. R-фикоэритрин не токсичен для человека, хорошо растворим в воде, ярко-розового цвета, интенсивно поглощает с максимумами при 498, 540 и 568 нм и интенсивно флуоресцирует (максимум излучения при 578 нм, квантовый выход 0.85, время жизни возбужденного состояния 2.9 нс). В модельных системах R-фикоэритрин способен к обратимым фотохимическим реакциям и фотосенсибилизации окислительно-восстановительных процессов. Характерной особенностью фикобилиновых пигментов, включая R-фикоэритрин, является генерация отрицательного электрохимического потенциала в окислительных и восстановительных условиях. В системах искусственных бислойных мембран они усиливают генерацию фотопотенциала при добавлении на восстановительную сторону мембраны. Эти необычные свойства фикобилиновых пигментов обусловлены их способностью генерировать свободные радикалы и активные формы кислорода (ROS) при освещении. R-фикоэритрин и его субъединицы применяются в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии онкологических и кожных заболеваний [8, 9]. Согласно данным Jin-Ap Не фикобилипротеины в фотодинамической терапии более эффективны по сравнению с широко применяемыми производными гематопорфирина [8]. Кроме этого субъединицы R-фикоэритрина и хромофор-содержащие пептиды показали хороший потенциал для использования в качестве флуоресцентных зондов для обнаружения одиночных молекул и анализа одиночных клеток. Конъюгаты фикобилипротеинов с биологически специфичными молекулами, такими как иммуноглобулины, протеин А, биотин и авидин, обладают флуоресцентными свойствами нативных фикобилипротеинов и используются для разнообразных флуоресцентных анализов клеток и молекул [10]. Фотофизические и фотохимические свойства R-фикоэритрина, а также кольцевая структура с туннельной полостью в центре молекулы обеспечивают привлекательность R-фикоэритрина в качестве белковой матрицы для синтеза наночастиц.

В связи с этим мы использовали R-фикоэритрин для синтеза НЧ Ag^0 и НЧ CdS [11, 12], потому что именно биогенные НЧ серебра и сульфида кадмия широко используются в биомедицинских исследованиях, а также для диагностики и терапии онкологических заболеваний, проявляют значительную антимикробную активность [3–5, 7, 13, 14].

Фоточувствительные биоконъюгаты R-фикоэритрина (РЕ) с наночастицами Ag^0 (Ag^0xPE) и наночастицами CdS (CdSxPE) получены зеленым синтезом наночастиц в туннельной полости R-фикоэритрина и охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии, конфокальной флуоресцентной микроскопии, капиллярного электрофореза, динамического рассеяния света, аналитического центрифугирования и спектроскопии. С применением диэлектрического спектрометра установлено, что электропроводность сухих тонких пленок Ag^0xPE в 500 раз выше по сравнению с электропроводностью R-фикоэритрина на постоянном токе и в 200 раз больше в переменном поле [15]. Электропроводность и диэлектрическая проницаемость биоконъюгата Ag^0xPE одного порядка с таковыми проводящих полимерных композитов с Ag^0 НЧ, используемых при конструировании многофункциональных пленок и создании интеллектуальных материалов.

Наночастицы CdS в R-фикоэритрине фотохимически активны. При освещении CdSxPE в виде пленки на платиновом электроде, наблюдается фотовольтаический эффект такой же величины, как у НЧ CdS размером 6–9 нм на поверхности одномерных углеродных нанотрубок [16].

Обнаружено взаимное влияние R-фикоэритрина и наночастиц: НЧ Ag^0 и НЧ CdS повышают термостабильность R-фикоэритрина, а R-фикоэритрин усиливает интенсивность флуоресценции и проводимость наночастиц. Информация о влиянии наночастиц на устойчивость белков к воздействию высоких температур представляет особый интерес, поскольку агрегация белков – это серьезная проблема для биофармацевтических производств. Важно свести к минимуму количество агрегатов в конечных продуктах, чтобы обеспечить безопасность и эффективность лекарственных препаратов. Агрегация белков сопутствует также многим заболеваниям. Все это побуждает изучать механизм денатурации белков с последующей агрегацией и искать способы их стабилизации. Агрегацию R-фикоэритрина мы изучали в режиме нагревания с постоянной скоростью $1^\circ \text{C}/\text{мин}$ и регистрацией размеров образующихся агрегатов методом динамического светорассеяния. Согласно расчетам размеров гидродинамических радиусов (R_h), размеры R-фикоэритрина были стабильны при нагревании до 50°C . Ускоренный рост R_h при нагревании от 50 до 100°C с одновременным увеличением интенсивности светорассеяния указывал на агрегацию R-фикоэритрина. Прямая зависимость между увеличением R_h и ростом интенсивности динамического светорассеяния R-фикоэритрином свидетельствует об увеличении размеров агрегатов. Иная картина наблюдалась при нагревании конъюгата R-фикоэритрина с НЧ Ag^0 : рост R_h наблюдался при температуре выше 90°C . Повышение устойчивости R-фикоэритрина к термоагрегации в присутствии НЧ серебра подтверждено методом кругового дихроизма. При этом показано, что в процессе охлаждения Ag^0xPE до 20°C вторичная структура R-фикоэритрина частично восстанавливается. НЧ Ag^0 повышают термостабильность R-фикоэритрина, его устойчивость к тепловой денатурации и агрегации, но только после того, как наночастицы созреют (т. е. через два месяца после их синтеза). Это связано с изменением поверхности НЧ Ag^0 , о чем свидетельствуют их оптические свойства. Так интенсивность поглощения перераспределяется по длинам волн в видимой части спектра, цвет НЧ желтый превращается в вишневый, флуоресценция тушится и появляется гигантское светорассеяние [17]. Механизм подавления тепловой агрегации R-фикоэритрина наночастицами серебра заключается: а) в химической сшивке белковой молекулы изнутри ковалентными связями типа металл-лиганд, возникающими в процессе синтеза наночастицы в полости R-фикоэритрина, и б) химической сшивке белковой молекулы снаружи новыми солевыми, водородными связями, образующимися на поверхности молекул R-фикоэритрина в результате ионизации поверхности наночастицы при нагревании. Дополнительные связи, образующиеся на поверхности молекул R-фикоэритрина, препятствуют его диссоциации на мономеры.

НЧ CdS также как НЧ Ag^0 стабилизируют структуру R-фикоэритрина. Методом фликкер-шумовой спектроскопии показано, что НЧ CdS «выравнивают» поверхность белковой макромолекулы, снижая количество различного рода нерегулярностей и придавая R-фикоэритрину дополнительную механическую прочность, НЧ CdS препятствуют диссоциации и агрегации R-фикоэритрина, увеличивают термостабильность и фотохимическую активность, могут усиливать интенсивность флуоресценции R-фикоэритрина.

Исследование влияния трегалозы, известного стабилизатора белков, на стабильность и свойства фотобиоконъюгатов $\text{Ag}^0 \times \text{PE}$ и $\text{CdS} \times \text{PE}$ показало, что флуоресценция обоих конъюгатов, возбуждаемая видимым светом ($\lambda_{\text{ex}} \geq 400 \text{ nm}$), усиливается приблизительно на 30 %. Усиление флуоресценции $\text{Ag}^0 \times \text{PE}$ и $\text{CdS} \times \text{PE}$ обусловлено тем, что трегалоза, связывая воду, уменьшает расстояния между хромофорными группами R-фикоэритрина и наночастицами и таким образом способствует их взаимодействию. Поэтому трегалозу можно рекомендовать как инструмент улучшения флуоресцентных свойств биоконъюгатов, например, при создании оптических биосенсоров, в том числе для диагностики рака. Раковые клетки после обработки биогенными НЧ Ag испускают ярко-красную флуоресценцию, тогда как необработанные клетки, используемые в качестве контроля, и обработанные химически синтезированными НЧ Ag, не флуоресцируют [18]. В связи с востребованностью медицинских наносенсорных систем, $\text{Ag}^0\text{-PE}$ и CdS-PE , как проводящие наноконъюгаты с интенсивной флуоресценцией могут быть использованы в качестве молекулярных детекторов для создания наносенсоров.

Результаты исследования размеров, структуры, оптических свойств наночастиц Ag и CdS различными методами позволяют рассматривать R-фикоэритрин как универсальную матрицу для синтеза одномерных наночастиц. Простота получения наночастиц в R-фикоэритрине и их свойства, такие как генерация ROS, интенсивная флуоресценция, комбинационное рассеяние, термостабильность и высокая проводимость, позволяют считать биоконъюгаты $\text{Ag}^0 \times \text{PE}$ и $\text{CdS} \times \text{PE}$ перспективной платформой для использования в онкологической тераностике и для создания оптических и электрических биосенсорных систем. Наш вывод подтверждает публикация Choi с сотр. [19]. Они использовали R-фикоэритрин в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента для синтеза наноконъюгатов оксид графена-серебро с цитотоксическим потенциалом в клетках рака яичников и стволовых клетках рака яичников. Композит «R-фикоэритрин-восстановленный GO-НЧ Ag» эффективно вызывает гибель раковых клеток и более цитотоксичен при низких концентрациях по сравнению с другими тестированными наноматериалами.

Литература

1. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures, 3rd ed., American Cancer Society, Inc. No. 861815, Atlanta, Georgia, 2015. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf>. [PubMed]
2. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures, 4th ed., Atlanta: American Cancer Society; 2018. [PubMed]
3. Ovais, M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine (Lond.)* 2016, 11, 3157–3177. Doi: 10.2217/nnm-2016-0279
4. Khandel, P. et al. Biogenesis of metal nanoparticles and their pharmacological applications: present status and application prospects. *J. Nanostruct. Chem.* 2018, 8, 217–254. Doi.org/10.1007/s40097-018-0267-4
5. Rasmussen, J.W., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D.G.: Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010, 7, 1063–1077.
6. Medici, S. et al. Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 5923–5943.
7. Swarnalatha, L., Christina, R., Shruti, R., Payas, B.: Evaluation of in vitro antidiabetic activity of *Sphaeranthus amaranthoides* silver nanoparticles. *Int. J. Nanomater. Biostruct.* 2012, 2, 25–29.
8. He, J.A., Hu, Y.Z., Jiang L.J.: Photodynamic action of phycobiliproteins: in situ generation of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1320, 165–174.
9. Huang, B., Wang, G., Zeng, C., Li, Z.: The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2002, 17, 35–42.
10. Oi, V.T.; Glazer, A.N.; Stryerthe, L.: Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J. Cell Biol.* 1982, 93, 981–986.
11. Bekasova, O.D., Brekhovskikh, A.A., Revina, A.A., Dubinchuk, V.T.: Preparation and optical properties of silver nanoparticles in R-phycoerythrin, a protein matrix. *Inorg. Mater.* 2008, 44, 835–841.
12. Bekasova, O.D. et al.: R-phycoerythrin: a natural ligand for detoxifying cadmium ions and tunnel matrix for synthesis of cadmium sulfide nanoparticles. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005, 41, 308–314.
13. Prasad, K.S., Amin, T., Katuva, S., Kumari, M., Selvaraj, K.: Synthesis of water soluble CdS nanoparticles and study of their DNA damage activity. *Arab. J. Chem.* 2017, 10, 3929–3935.
14. Sekar, P.V., Parvathi, V.D.: Green nanotechnology in cadmium sulphide nanoparticles and understanding its toxicity and antimicrobial properties. *Biomed. Res.* 2019, 30, 805–809.
15. Bekasova, O.D., Ryvkina, N.G., Chmutin, I.A., Shtein-Margolina, V.A., Kurganov, B.I.: Electrical properties of R-phycoerythrin containing Ag^0 nanoparticles in its channels. *Inorg. Mater.* 2017, 53, 1249–1253.
16. Bekasova, O.D. et al. The photovoltaic effect of CdS quantum dots synthesized in inverse micelles and R-phycoerythrin tunnel cavities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015, 176, 1141–1150. DOI: 10.1007/s12010-015-1635-x
17. Bekasova, O.D. et al. Ag^0 nanoparticles synthesized in R-phycoerythrin: change in bioconjugate properties upon ripening of nanoparticles. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2018, 19, 422–427. DOI: 10.2174/1389201019666180604103203
18. Mukherjee S., Chowdhury D., Kotcherlakota R. et al.: Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). *Theranostics* 2014, 4, 316–335.
19. Choi, Y-J., Gurunathan, S., Kim, J-H.: Graphene oxide-silver nanocomposite enhances cytotoxic and apoptotic potential of salinomycin in human ovarian cancer stem cells (OvCSCs): a novel approach for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 710–733.