

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТЕРКОМБИНАЦИОННОЙ КОНВЕРСИИ В ТРИПЛЕТНОЕ СОСТОЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА В КОМПЛЕКСАХ С АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2023 г. А.С. Бучельников*, #, П.А. Соколов*, **, Р.Р. Рамазанов*

*Севастопольский государственный университет, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

**Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

#E-mail: tolybas@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Важным фотофизическим процессом, определяющим эффективность фотосенсибилизаторов, является насыщение триплетного состояния посредством интеркомбинационной конверсии при поглощении света. В настоящей работе мы рассмотрели перспективные в качестве фотосенсибилизаторов комплексы фуллерена C_{60} с аминокислотами глицином, лизином, метионином и треонином. Расчеты демонстрируют высокие значения констант скоростей перехода в триплетные состояния и высокую вероятность способности генерировать активные формы кислорода при возбуждении в видимом диапазоне. При этом карбоксильные группы аминокислот, не участвующие в электронном возбуждении, могут быть использованы для конъюгации фотоактивных комплексов со средствами доставки к опухолям, такими как специфичные ДНК-аптамеры.

Ключевые слова: аминокислота, аптамер, конъюгат, синглетный кислород, фотодинамическая терапия, фуллерен.

DOI: 10.31857/S0006302923030022, EDN: PGDRZM

Проведение химиотерапии вызывает тяжелые побочные эффекты для организма человека. Эта проблема обуславливает поиск новых неинвазивных методов [1]. Одним из наиболее эффективных неинвазивных методов лечения различных злокачественных опухолей является фотодинамическая терапия, использующая фотосенсибилизаторы [2]. Такая терапия оказывает наиболее мягкое воздействие на организм, снижая уровень побочных эффектов. Однако, как правило, в рамках нецелевых механизмов доставки фотосенсибилизаторов только небольшое их количество способно пассивно накапливаться в очагах опухолей, а остальная часть распределяется в здоровых тканях, вызывая побочные эффекты [3]. Таким образом, для повышения эффективности фотодинамической терапии в настоящее время исследования направлены на разработку носителей фотосенсибилизаторов на основе специфических рецепторов клеточных белков, способствующих активному захвату и адсорбции фотосенсибилизаторов только в опухолевых участках.

Последние разработки направлены на повышение фотостабильности фотосенсибилизаторов с последующим снижением рабочей концентрации в живой ткани [4]. В качестве решения был предложен фуллерен C_{60} [5], который имеет расширенное π -сопряжение, что позволяет ему поглощать свет в широком диапазоне вплоть до инфракрасной области, а также обладает высоким выходом в долгоживущее триплетное состояние (рис. 1а). Это позволяет ему эффективно генерировать активную форму синглетного кислорода 1O_2 в водной среде при облучении. Долгоживущее триплетное состояние T_1 образуется в результате процесса интеркомбинационной конверсии (ИКК) из возбужденного синглетного состояния S_1 , когда фуллерен в основном состоянии поглощает фотон. После перехода в триплетное состояние фуллерен может передать возбуждение молекуле кислорода, которая находится в триплетном состоянии 3O_2 , после чего образуется синглетная форма кислорода. Молекула 1O_2 обладает высокой химической активностью и спо-

Сокращения: ИКК — интеркомбинационная конверсия, НТФП — нестационарная теория функционала плотности.

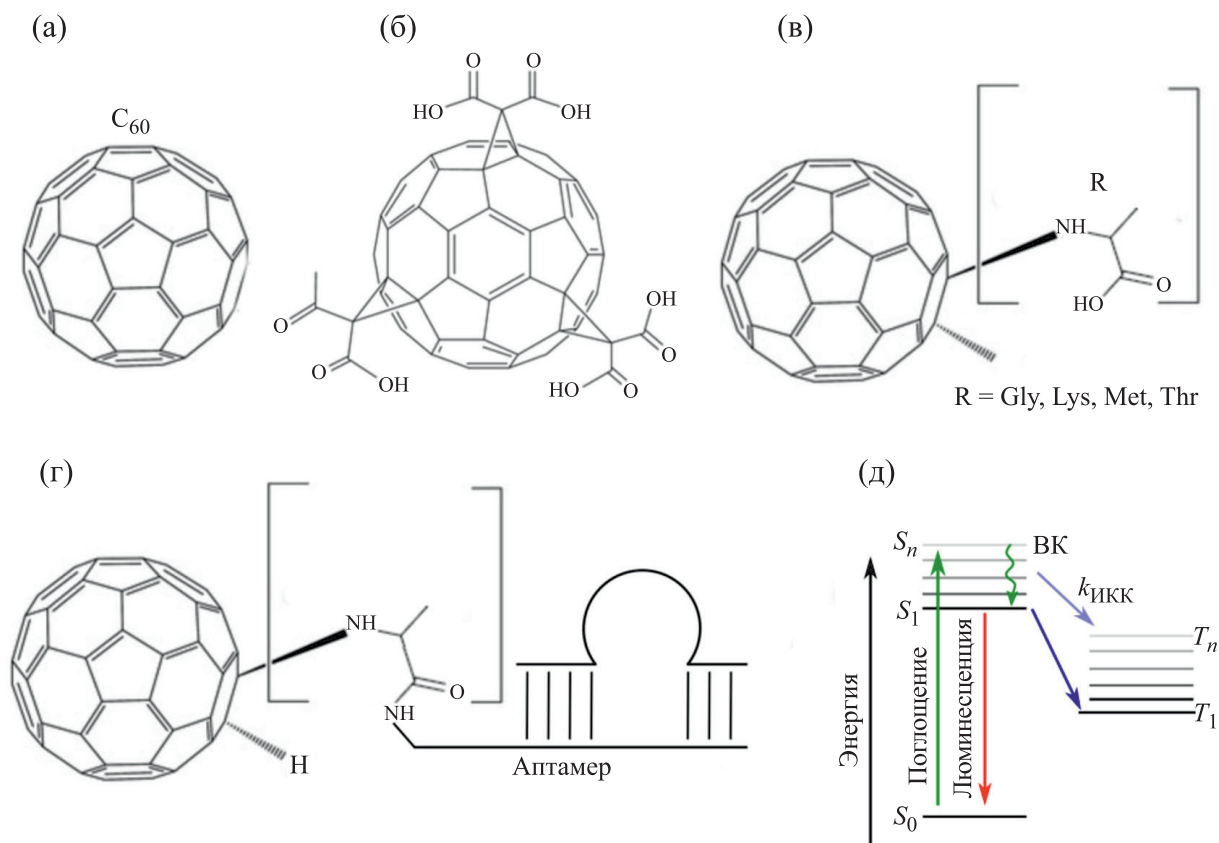


Рис. 1. Структуры: (а) — фуллерена C₆₀; (б) — комплекса фуллерена C₆₀ с трималеновой кислотой; (в) — рассматриваемых в данной работе комплексов фуллеренов C₆₀ с различными аминокислотными заместителями: R = Gly, Lys, Met, Thr; (г) — схема конъюгации аптамера ДНК с модифицированным фуллереном; (д) — диаграмма Яблонского с указанием процесса интеркомбинационной конверсии (ИКК) из состояния S₁ в T₁.

собна окислять липиды, белки и нуклеиновые кислоты, вызывая гибель клеток [6].

Поскольку сам фуллерен плохо растворим в воде, используют его водорастворимые производные [7]. Для его функционализации применяют различные заряженные группы — гидроксилы, кислоты или аммониевые группы [8]. Модификация фуллерена позволяет не только влиять на его фотофизические характеристики, но и открывает возможность создания конъюгата с транспортным носителем, который специфичен к белкам клеточной поверхности. Предполагается, что такой носитель не должен влиять на эффективность генерации активного кислорода фуллерена, но при этом должен доставлять фотосенсибилизаторы непосредственно к поверхности злокачественных клеток. ДНК-аптамеры могут быть использованы в качестве носителей фуллерена [9], которые проявляют специфичность к клеточной поверхности и могут улучшать адсорбцию фотосенсибилизаторов. Было показано, что конъюгация фуллерена, модифицированного трималеновой кислотой (рис. 1б), с аптамером ДНК-носи-

теля адресной доставки к клеткам рака легкого A549, которые стабильно экспрессируют эпидермальный фактор роста, позволяет фотосенсибилизаторам эффективно накапливаться в клеточных лизосомах [10]. Такое расположение конъюгата «фуллерен—аптамер» способствует продукции внутриклеточных активных форм кислорода при световом облучении, что позволяет эффективно уничтожать раковые клетки. В этом смысле возник интерес к рассмотрению биосовместимых водорастворимых органических соединений, таких как аминокислоты, в качестве присоединенных функциональных групп, которые могут действовать как линкер между аптамером и фуллереном C₆₀. Такие конъюгаты могут быть получены с помощью простых и дешевых методов органической химии, обеспечивающих доступное разнообразие благодаря достаточному количеству природных аминокислот [8].

В данной работе мы провели теоретическую оценку эффективности выхода в триплетное состояние за счет интеркомбинационной конверсии и возможности использования производных

фуллеренов в комплексе с различными аминокислотами, протоколы синтеза которых хорошо отработаны в литературе (рис. 1в). В качестве объектов были рассмотрены конъюгаты фуллера с полярными незаряженными (метионином [11] и треонином [12]), неполярными (глицином [13]) и полярными заряженными положительно (лизин) аминокислотами в сравнении с хорошо изученным нефункционализированным C_{60} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Когда фуллерен поглощает фотон, он переходит из основного состояния S_0 в возбужденное состояние S_n в зависимости от энергии фотона, затем может безызлучательно релаксировать путем внутренней конверсии в состояние S_1 , а затем либо по правилу Каша высветить фотон люминесценции, либо через интеркомбинационную конверсию перейти в триплетное состояние T_1 (рис. 1д). Прежде всего, мы получили информацию о равновесной геометрии комплексов в основном состоянии S_0 и рассчитали энергии Франка–Кондона синглетных и триплетных возбужденных состояний. Геометрические параметры основного состояния S_0 всех молекул были оптимизированы на уровне теории функционала плотности [14] с использованием гибридного функционала B3LYP [15] и базисного набора 6-31G(d,p) [16], реализованных в пакете Gaussian 09 [17]. Такой уровень теории в достаточной степени удовлетворяет качественной оценке электронных свойств фуллеренов [18]. Расчеты энергий возбуждения первых десяти синглетных (S_n) и триплетных (T_n) электронных состояний проводились с использованием нестационарной теории функционала плотности (НТФП) с функционалом B3LYP для всех молекул. Поскольку ИКК вызвано спин-орбитальным взаимодействием, необходимо рассчитать матричные элементы спин-орбитального взаимодействия. Для расчета константы скорости интеркомбинационной конверсии ($k_{ИКК}$) использовался одноэлектронный оператор спин-орбитального взаимодействия гамильтониана Паули–Брейта. Энергии возбуждения, рассчитанные на уровне НТФП, использовались в качестве значений нулевого порядка. Спин-орбитальное взаимодействие является оператором возмущения процесса ИКК и зависит только от пространственных и спиновых координат электронов [19]. Элементы матрицы спин-орбитального взаимодействия $\langle S_n | H_{CO} | T_n \rangle$ между синглетными и триплетными состояниями были рассчитаны на уровне НТФП/B3LYP с использованием программы MOLSOC [20] для всех структур. При расчете элементов матрицы учитывались десять низших синглет-синглетных и син-

глет-триплетных электронных переходов. В целом значения $k_{ИКК}$ между состояниями S_n и T_n были рассчитаны с использованием метода, описанного ранее [21]. Согласно этому методу, если предположить в качестве обобщающего усреднения, что в процессе ИКК главная определяющая колебательная мода имеет частоту 1400 см^{-1} , то можно использовать следующую формулу:

$$k_{ИКК} = 1.6 \cdot 10^9 \langle \phi(T_n) | H_{CO} | \phi(S_n) \rangle^2 F_{0m},$$

где $\langle \phi(T_n) | H_{CO} | \phi(S_n) \rangle$ – матрица спин-орбитального взаимодействия; $F_{0m} = y^m \exp(-y)/m!$, где фактор Хуанга–Рисса y имеет значение 0.3; при этом $m \approx E(T_n) - E(S_n)$, где $E(T_n)$ и $E(S_n)$ – энергии триплетных и синглетных состояний в см^{-1} .

Натуральные переходные орбитали для перехода $S_0 \rightarrow S_1$ процессов изображены с величиной изоповерхности 0.03 условных единиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно модельным представлениям константа скорости интеркомбинационной конверсии, обуславливающая эффективность насыщения триплетного состояния T_1 , при условии, что эта скорость больше или сопоставима с константами излучательных процессов, определяется величиной спин-орбитального взаимодействия и величиной разницы в энергии между S_1 - и T_1 -состояниями. Из литературы известно, что фуллерены обладают слабой люминесценцией, поэтому даже при относительно небольших величинах $k_{ИКК}$ процесс безызлучательного перехода в триплетное состояние может конкурировать с излучательным. Расчеты констант проводили с учетом синглетных возбужденных состояний, энергия которых не превосходит 0.1 эВ энергии S_1 состояния, поскольку заселенность более высокоэнергетических состояний при комнатной температуре пренебрежимо мала.

В предыдущем исследовании было показано, что в спектре чистого фуллера наблюдаются квазивыврожденные синглетные и триплетные возбужденные состояния [21]. При этом все десять синглетных и триплетных возбужденных состояний находились в диапазоне 1.5 ... 2.1 эВ: три триплета с энергией 1.59 эВ, три триплета с энергией 1.92 эВ, четыре триплета с энергией 1.95 эВ и четыре синглета с энергией 2.09 эВ. Для правильной оценки константы интеркомбинационной конверсии необходимо было провести усреднение с учетом больцмановской заселенности по всем синглетным переходам и суммирование по всем триплетным переходам по формулам:

Таблица 1. НТФП энергии возбужденных состояний исследуемых комплексов

Конъюгат	T_1 , эВ	T_2 , эВ	T_3 , эВ	T_4 , эВ	T_5 , эВ	S_1 , эВ	S_2 , эВ
C ₆₀ -Gly	1.5219	1.6407	1.6620	1.8752	1.8807	1.9071	2.0095
C ₆₀ -Lys	1.5288	1.6444	1.6671	1.8784	1.8849	1.9087	2.0125
C ₆₀ -Met	1.5288	1.6437	1.6681	1.8778	1.8856	1.9095	2.0132
C ₆₀ -Thr	1.5285	1.6442	1.6657	1.8766	1.8846	1.9069	2.0118

$$k_{\text{ИКК}} = \sum_i a_i k_i^{\text{ИКК}}, k_i^{\text{ИКК}} = \sum_j k_{ij}^{\text{ИКК}},$$

где i — начальное S -состояние, a_i представляет больцмановскую заселенность i -го состояния, j определяет триплетное T -состояние.

В результате оценки была получена константа $k_{\text{ИКК}}$ ($S_1 \rightarrow T_n$) = $1.34 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$. В табл. 1 представлены первые семь возбужденных состояний в исследуемых комплексах. Энергии триплетов и синглетов смещаются в красную область относительно спектра нефункционализированного фуллерена. Необходимо отметить главные закономерности, которые учитывались при расчете констант ИКК. Во-первых, отличие между S_2 и S_1 составляет порядка 0.1 эВ, поэтому мы рассмотрели процесс ИКК только из S_1 -состояния. Во-вторых, ниже S_1 -состояния находятся пять триплетов, которые могут участвовать в ИКК. Заметим, что добавление различных заместителей аминокислот практически не влияет на энергии возбужденных состояний. Внимательное рассмотрение натуральных переходных орбиталей,

соответствующих переходу $S_0 \rightarrow S_1$ или $S_1 \rightarrow T_1$, показывает, что основные орбитали, участвующие в возбуждении, локализованы на π -сопряжении фуллерена (рис. 2). Большое количество квазивырожденных орбиталей фуллерена заполняют все верхние молекулярные орбитали комплекса.

Необходимо отметить, что орбитали, участвующие в переходе $S_0 \rightarrow S_1$, не затрагивают карбоксильные группы аминокислот, которые должны быть использованы для конъюгации с аптамерами. Карбоксильные группы оптически активны в области 5 эВ, поэтому молекулярные орбитали карбоксилатов лежат гораздо ниже высшей занятой молекулярной орбитали полиароматической поверхности фуллерена. Это позволяет сделать вывод, что пришивка аптамера к фуллерену посредством аминокислот не должна оказывать влияния на фотосистему, а соответственно на процесс перехода в триплетное состояние и последующую генерацию активного кислорода.

Рассмотрим результаты расчета констант ИКК. В табл. 2 представлены матричные элементы спин-орбитального взаимодействия и константы ИКК. Полученные значения констант

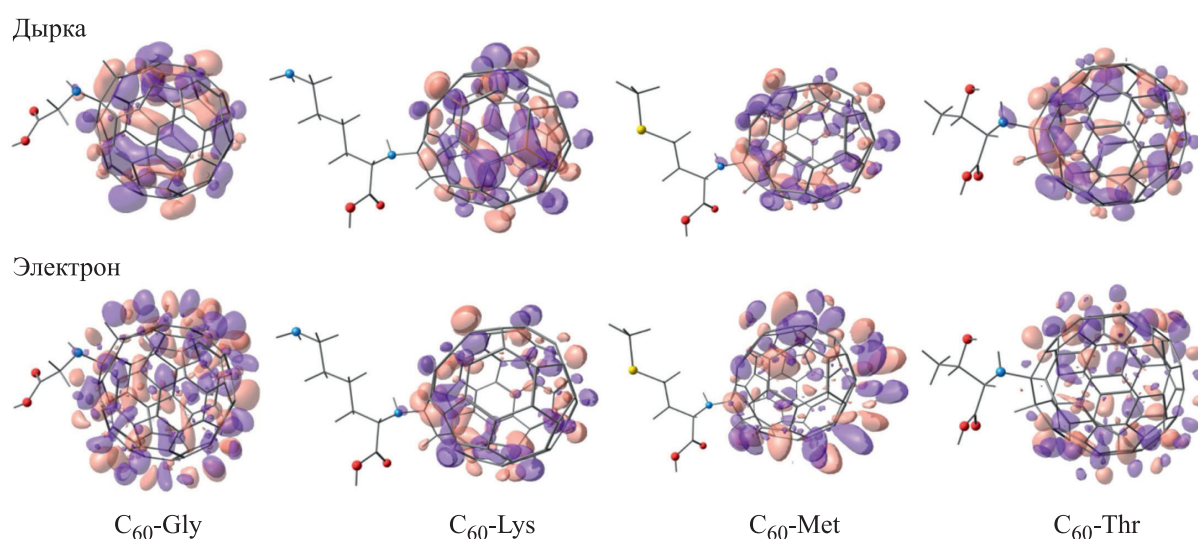
**Рис. 2.** Натуральные переходные орбитали, соответствующие переходу $S_0 \rightarrow S_1$ в исследуемых комплексах.

Таблица 2. Матричные элементы спин-орбитального взаимодействия и константы интеркомбинационной конверсии для исследуемых комплексов

Конъюгат	C ₆₀ -Gly	C ₆₀ -Lys	C ₆₀ -Met	C ₆₀ -Thr
$\langle S_I H_{CO} T_1 \rangle$, см ⁻¹	0.56	0.58	0.57	0.56
$\langle S_I H_{CO} T_2 \rangle$, см ⁻¹	0.30	0.31	0.30	0.31
$\langle S_I H_{CO} T_3 \rangle$, см ⁻¹	0.07	0.07	0.07	0.07
$\langle S_I H_{CO} T_4 \rangle$, см ⁻¹	0.78	0.77	0.79	0.78
$\langle S_I H_{CO} T_5 \rangle$, см ⁻¹	0.48	0.49	0.49	0.48
$k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_1)$, с ⁻¹	$1.0 \cdot 10^7$	$1.2 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^7$
$k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_2)$, с ⁻¹	$4.4 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$	$1.3 \cdot 10^7$	$1.4 \cdot 10^7$
$k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_3)$, с ⁻¹	$5.8 \cdot 10^6$	$0.9 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$
$k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_4)$, с ⁻¹	$6.0 \cdot 10^7$	$6.2 \cdot 10^7$	$6.4 \cdot 10^7$	$6.4 \cdot 10^7$
$k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_5)$, с ⁻¹	$2.9 \cdot 10^8$	$2.6 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^8$
$k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_n)$, с ⁻¹	$3.6 \cdot 10^8$	$3.5 \cdot 10^8$	$3.4 \cdot 10^8$	$3.4 \cdot 10^8$

слабо отличаются друг от друга, поскольку влияние привитых аминокислот на фотосистему фуллерена незначительно. Как было показано ранее [21], нефункционализированный фуллерен и фуллерен, модифицированный трималоновой кислотой, имеют константы $k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_n) = 1.34 \cdot 10^8$ с⁻¹ и $k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_n) = 9.16 \cdot 10^7$ с⁻¹ соответственно. Для комплексов фуллерена с аминокислотами константы лежат в пределах $(3.4 \dots 3.6) \cdot 10^8$ с⁻¹ и немного превосходят константу для нефункционализированного C₆₀. Эти константы хорошо соответствуют экспериментальной оценке $k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_n) = 7.1 \cdot 10^8$ с⁻¹ для подобного модифицированного фуллерена PC₆₀BM (метилловый эфир [6,6]-фенил-C₆₁-масляной кислоты). Поскольку экспериментально показано, что эффективность выхода в триплетное состояние с последующей генерацией активного кислорода у нефункционализированного фуллерена и модифицированного трималоновой кислотой велики, можно ожидать, что исследуемые модифицированные комплексы с аминокислотами также будут активны.

ВЫВОДЫ

Процессы интеркомбинационной конверсии модифицированного аминокислотами (Gly, Met, Thr, Lys) фуллерена C₆₀ исследованы путем рас-

чета матричных элементов спин-орбитального взаимодействия и соответствующих констант ИКК. Сравнительные результаты показывают, что модификация фуллерена аминокислотами, так же, как и трималоновой кислотой, существенно не меняет диапазон энергий возбуждения фуллерена. Это означает, что такие модификации можно использовать в аналогичных протоколах фотодинамической терапии.

Рассчитанные значения $k_{ИКК} (S_1 \rightarrow T_n)$ свидетельствуют о достаточно эффективном процессе насыщения триплетного состояния через ИКК, что не противоречит экспериментам для подобных систем. Комплексы фуллерена с аминокислотами являются хорошими кандидатами на фотоактивные системы. При возбуждении комплексов с аминокислотами в возбуждении не участвуют карбоксильные группы, которые могут быть необходимы для образования линкера с ДНК-аптамером. Это означает, что образование таких надмолекулярных структур может не затрагивать электронную структуру фотоактивной части конъюгата, что также существенно расширяет возможности использования аминокислот в области создания фотосенсибилизаторов нового поколения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-01066).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. G. Mokwena, C. A. Kruger, M. T. Ivan, et al., *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **22**, 147 (2018).
2. Y. N. Konan, R. Gurny, and E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B*, **66** (2), 89 (2002).
3. N. Hodgkinson, C. A. Kruger, and H. Abrahamse, *Tumor Biol.*, **39** (10), 1 (2017).
4. L. Benov, *Med. Princ. Pract.*, **24** (Suppl. 1), 14 (2015).
5. H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, et al., *Nature*, **318** (6042), 162 (1985).
6. Y. Zhang, B. Wang, R. Zhao, et al., *Mater. Sci. Eng. C*, **115**, 111099 (2020).
7. M. R. Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **17** (11), 1515 (2018).
8. V. V. Sharoyko, S. V. Ageev, N. E. Podolsky, et al., *J. Mol. Liq.*, **323**, 114990 (2021).
9. R. Yazdian-Robati, P. Bayat, F. Oroojalian, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **155**, 1420 (2020).
10. Q. Liu, L. Xu, X. Zhang, et al., *Chem. Asian J.*, **8** (10), 2370 (2013).
11. V. V. Sharoyko, O. S. Shemchuk, A. A. Meshcheriakov, et al., *Nanomedicine NBM*, **40**, 102500 (2022).
12. G. G. Panova, E. B. Serebryakov, K. N. Semenov, et al., *J. Nanomater.*, **2019**, 2306518 (2019).
13. G. Jiang, F. Yin, J. Duan, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **26** (1), 24 (2015).
14. M. E. Casida, in *Recent Advances in Density Functional Methods. Part I*, Ed. by D. P. Chong (World Scientific, Singapore, 1995), Chap. 5, pp. 155–192.
15. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **98** (7), 5648 (1993).
16. G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, et al., *J. Chem. Phys.*, **89** (4), 2193 (1988).
17. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, et al., *Gaussian 09 Revision A.01* (Gaussian, Inc., Wallingford CT (USA), 2016).
18. R. H. Xie, G. W. Bryant, L. Jensen, et al., *J. Chem. Phys.*, **118** (19), 8621 (2003).
19. C. M. Marian, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, **2** (2), 187 (2012).
20. S. G. Chiodo and M. Leopoldini, *Comput. Phys. Commun.*, **185** (2), 676 (2014).
21. R. R. Ramasanoff and P. A. Sokolov, *Chem. Phys. Lett.*, **807**, 140076 (2022).

Evaluation of the Efficiency of Intersystem Crossing to a Triplet State of Fullerene in Complexes with Amino Acids

A.S. Buchelnikov*, P.A. Sokolov*, **, and R.R. Ramasanoff*

*Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

**Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, Saint Petersburg, 199034 Russia

The important photophysical process that determines the efficiency of photosensitizers is saturation of a triplet state by intersystem crossing during light absorption. In the present work, C₆₀ fullerene complexes with amino acids glycine, lysine, methionine and threonine were studied as promising photosensitizers. All these complexes, for which the calculations were done, demonstrate high values of rate constants of transition to triplet states and a high probability of the ability to generate reactive oxygen species through excitation in the visible spectrum. The carboxyl groups of amino acids that are not involved in electronic excitation can be used as the component of specific DNA aptamers for conjugation to photoactive complexes for a tumor-targeting drug delivery system.

Keywords: amino acid, aptamer, conjugate, singlet oxygen, photodynamic therapy, fullerene