

## НАНОКОМПЛЕКСЫ ПРОИЗВОДНОГО ТИОФЛАВИНА Т С УЛЬТРАДИСПЕРСНЫМИ АЛМАЗАМИ В КАЧЕСТВЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА

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

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко, ул. Курчатова 7, 220045 Минск, Беларусь, [nikita.belko@gmail.com](mailto:nikita.belko@gmail.com), [samtsov@mail.ru](mailto:samtsov@mail.ru), [gga68@rambler.ru](mailto:gga68@rambler.ru), [an.lugovsky@yandex.ru](mailto:an.lugovsky@yandex.ru), [sergey.adamchik@gmail.com](mailto:sergey.adamchik@gmail.com)

<sup>2)</sup>Научно-методическое учреждение Белорусского государственного университета «Республиканский центр проблем человека», ул. Курчатова 7, 220045 Минск, Беларусь

Синтезировано производное тиофлавина Т, которое имеет протяженную систему сопряженных связей и характеризуется батохромным сдвигом спектров поглощения и флуоресценции. Молекулы данного соединения карбодиимидным методом ковалентно связаны с расположенными на поверхности ультрадисперсных алмазов карбоксильными группами через гексаметилендиаминовый линкер. Одна из аминогрупп линкера амидирована карбоксильной группой молекул красителя, а вторая – карбоксильной группой на поверхности ультрадисперсных алмазов. Спектры оптической плотности, возбуждения и испускания флуоресценции полученных наноконкомплексов, а также время затухания их флуоресценции зарегистрированы в различных средах: этаноле, 10 % водном растворе этанола и воде. Способность наноконкомплексов к диспергированию зависит от выбора растворителя. Форма и положение спектров возбуждения и испускания флуоресценции практически совпадают во всех использованных растворителях. В результате ковалентного связывания производного тиофлавина Т с ультрадисперсными алмазами характерное время затухания флуоресценции красителя увеличивается более чем на порядок. Полученные наноконкомплексы отличаются значительным стоксовым сдвигом (около 60 нм) и относительно большим характерным временем затухания флуоресценции (более 6 нс), что обуславливает интерес к ним в качестве перспективного флуоресцентного зонда.

**Ключевые слова:** тиофлавин Т; ультрадисперсные алмазы; наноконкомплексы; флуоресцентный зонд; спектрально-люминесцентные свойства.

## NANOCOMPLEXES OF A THIOFLAVIN T DERIVATIVE WITH ULTRADISPERSED DIAMONDS AS A FLUORESCENT PROBE

Nikita Belko<sup>1)</sup>, Michael Samtsov<sup>1)</sup>, Grigory Gusakov<sup>1)</sup>, Anatoly Lugovski<sup>1)</sup>, Siarhei Adamchik<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Sevchenko Institute of Applied Physics Problems, Belarussian State University, 7 Kurchatov Str., 220045 Minsk, Belarus, [nikita.belko@gmail.com](mailto:nikita.belko@gmail.com), [samtsov@mail.ru](mailto:samtsov@mail.ru), [gga68@rambler.ru](mailto:gga68@rambler.ru), [an.lugovsky@yandex.ru](mailto:an.lugovsky@yandex.ru),

<sup>2)</sup>Scientific Methodical Establishment of the Belarussian State University “Republican Center for Human Problems”, 7 Kurchatova Str., 220045 Minsk, Belarus, [sergey.adamchik@gmail.com](mailto:sergey.adamchik@gmail.com)

A thioflavin T derivative with a larger conjugated bond system was synthesized and is characterized by bathochromically shifted absorption and fluorescence spectra. The dye molecules were covalently bonded to carboxyl-functionalized ultradispersed diamonds via hexamethylenediamine linker using the carbodiimide method. One of the amino groups of the linker was amidated with the carboxyl group of the dye molecules and the other amino group was amidated with the carboxyl group located on the surface of ultradispersed diamonds. The nanocomplexes obtained were characterized with absorbance as well as fluorescence emission and excitation spectra in different media: ethanol, 10 vol.% aqueous ethanol, and water. The fluorescence lifetime of the nanocomplexes was measured as well. The solvent choice affects the ability of the nanocomplexes to be dispersed. The fluorescence excitation and emission spectra are almost identical in the solvents used. The peak of the fluorescence excitation spectra is located at 519 nm and the peak of the fluorescence emission spectra is located at 598 nm. The fluorescence lifetime is (6.4±0.7) ns in ethanol, (5.1±0.2) ns in 10 vol.% aqueous ethanol, and (6.5±0.5) ns in water. The fluorescence lifetime of the nanocomplexes exceeds that of the free dye by more than an order of magnitude. The large Stokes shift as well as the relatively long fluorescence lifetime makes the nanocomplexes a promising fluorescent probe.

**Keywords:** thioflavin T; ultradispersed diamonds; nanocomplexes; fluorescent probe; spectral luminescent properties.

## Введение

Флуоресцентные методы широко используются в биомедицине для идентификации различных веществ, визуализации процессов в клетках *in vitro*, а также в живых организмах [1]. Такие методы подразумевают использование флуоресцентных меток и зондов. Одним из широко применяемых зондов является тиофлавин Т, позволяющий детектировать амилоидные фибриллы, образование которых сопровождается развитием некоторых нейродегенеративных заболеваний [2]. Перспективной представляется модификация структуры молекул тиофлавина Т, направленная на смещение его спектров поглощения и флуоресценции в длинноволновую область.

Ультрадисперсные алмазы (УДА) могут использоваться в качестве наноплатформы для доставки лекарственных препаратов и диагностических молекул [3]. Ковалентное связывание органических молекул с подходящими функциональными группами на поверхности УДА может способствовать повышению фотостабильности молекул, обеспечивает биосовместимость и химическую инертность, а также позволяет управлять фармакокинетикой [4].

В данной работе исследуются спектрально-люминесцентные свойства наноконплексов производного тиофлавина Т с УДА и перспективы применения данных комплексов в качестве флуоресцентного зонда.

## Материалы и методы исследования

Для образования наноконплексов с УДА в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ синтезирован катионный мероцианиновый краситель 1, который является производным тиофлавина Т. Краситель 1 отличается от тиофлавина Т наличием виниловой группы между бензотиазоловым и диметиланилиновым остатками, в результате чего спектры поглощения и флуоресценции красителя 1 смещены батохромно. Также

в структуру молекул красителя введена карбоксильная группа для обеспечения возможности ковалентного связывания с гексаметилендиаминовым линкером через амидную связь. Структурная формула исследованного соединения представлена на рис. 1.

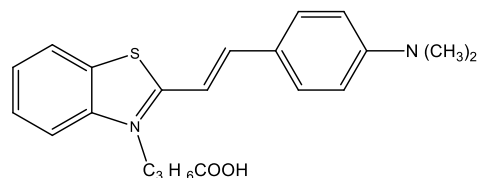


Рис. 1. Структурная формула красителя 1  
Fig. 1. Structural formula of the dye 1

УДА детонационного синтеза были предварительно подвергнуты вакуумному отжигу при температуре 750 °С, в результате чего была устранена значительная часть функциональных групп на поверхности наночастиц алмаза. После отжига поверхность частиц УДА была функционализована карбоксильными группами при помощи озонирования.

Ковалентное связывание красителя 1 с УДА производилось через гексаметилендиаминовый линкер посредством амидных связей с карбоксильными группами в молекулах красителя и на поверхности частиц УДА. Синтез наноконплексов производился в хлористом метиле в присутствии циклогексилкарбодиимида и триэтиламина. Функционализированные УДА были высушены и переведены в указанный растворитель. В полученную суспензию УДА был добавлен монотрифторметилированный гексаметилендиамин, который образовал амидные связи с карбоксильными группами на поверхности УДА. После гидролиза  $CF_3$ -группы монотрифторметилированного гексаметилендиамина в суспензию был добавлен краситель 1 и в аналогичных условиях карбодиимидным методом свободная аминогруппа линкера была амидирована карбоксильной группой, присутствующей в структуре молекул красителя 1. Несвязанный с УДА краситель отделяли промывкой органическим растворителем. Полу-

ченные наноконплексы далее обозначаются как 1-УДА.

Суспензии наноконплексов в различных растворителях получали путем диспергирования в ультразвуковой ванне с частотой ультразвука 35 кГц и мощностью 60 Вт.

### Результаты и их обсуждение

Проведено сопоставление спектрально-люминесцентных свойств наноконплексов 1-УДА в различных растворителях – чистом этаноле, 10 % водном растворе этанола и воде. Спектры оптической плотности суспензий наноконплексов определяются преимущественно светорассеянием на частицах УДА и представляют собой монотонно убывающие кривые в шкале длин волн (рис. 2).

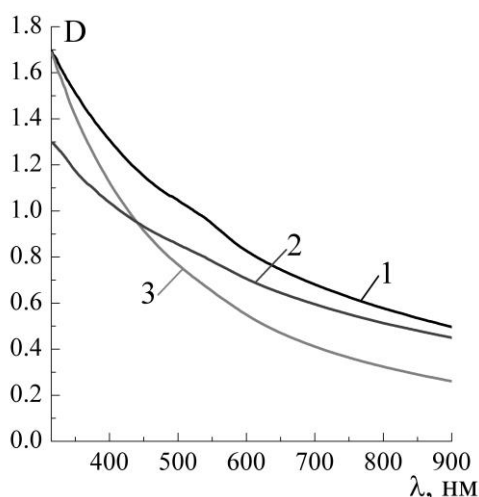


Рис. 2. Спектры оптической плотности наноконплексов 1-УДА в этаноле (1), 10 % водном растворе этанола (2), воде (3); концентрация наноконплексов 0.15 г/л

Fig. 2. Absorbance spectra of the dye 1 – ultradispersed diamond nanocomplexes in ethanol (1), 10 vol.% aqueous ethanol (2), and water (3); the nanocomplexes concentration is 0.15 g/l

В области 500-600 нм проявляется слабая полоса поглощения молекул красителя. Характер убывания оптической плотности при увеличении длины волны зависит от растворителя, что объясняется разной эффективностью диспергирования наноконплексов в разных средах. Более быстрое убывание спектра оптической плотности водной суспензии нанокон-

плексов в зависимости от длины волны свидетельствует о том, что в данном растворителе происходит диспергирование УДА на более мелкие частицы.

Спектры флуоресценции 1-УДА практически совпадают по форме и положению максимума во всех использованных растворителях (рис. 3).

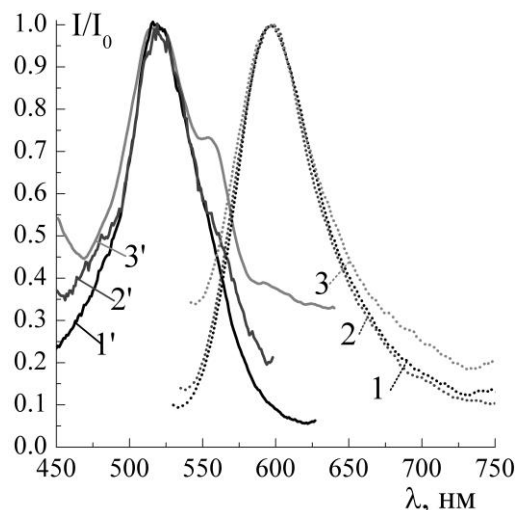


Рис. 3. Нормированные спектры флуоресценции при возбуждении на 500 нм (1-3) и нормированные спектры флуоресценции при регистрации на 680 нм (1'-3') наноконплексов 1-УДА в этаноле (1, 1'), 10 % водном растворе этанола (2, 2'), воде (3, 3'); концентрация наноконплексов 0.15 г/л

Fig. 3. Normalized fluorescence emission spectra upon excitation at 500 nm (1-3) and normalized fluorescence excitation spectra upon registration at 680 nm (1'-3') of the dye 1 – ultradispersed diamond nanocomplexes in ethanol (1, 1'), 10 vol.% aqueous ethanol (2, 2'), and water (3, 3'); the nanocomplexes concentration is 0.15 g/l

Максимум спектров расположен при 598 нм. Соответствующие спектры возбуждения флуоресценции также слабо различаются, их максимум расположен при 519 нм (рис. 3). Вследствие значительного светорассеяния в суспензии наноконплексов спектры возбуждения характеризуются относительно высоким уровнем шума, что способствует деформации спектров и затрудняет их сопоставление. Кривые затухания флуоресценции наноконплексов 1-УДА удовлетворительно аппроксимируются моноэкспоненциальными кинетиками с характерным временем затухания ( $6.4 \pm 0.7$ ) нс в этаноле,

( $5.1 \pm 0.2$ ) нс в 10 % водном растворе этанола и ( $6.5 \pm 0.5$ ) нс в воде. Время затухания флуоресценции красителя 1 в отсутствие УДА является настолько малым, что не может быть зафиксировано с помощью использованного флуорометра. Можно утверждать, что время затухания не превышает 0.3 нс.

Таким образом, в результате образования наноконплексов 1-УДА время жизни флуоресценции увеличивается более чем на порядок.

### Заклучение

Карбодииимидным методом получены наноконплексы производного тиофлавина Т с ультрадисперсными алмазами, ковалентно связанные через гексаметилендиаминовый линкер. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции наноконплексов в этаноле, 10 % водном растворе этанола и воде имеют близкие значения. В результате ковалентного связывания производного тиофлавина Т с ультрадисперсными алмазами характерное

время затухания флуоресценции красителя увеличивается более чем на порядок.

Значительный стоксов сдвиг (около 60 нм) и относительно большое характерное время затухания флуоресценции (около 6 нс) позволяют использовать полученные наноконплексы в качестве флуоресцентного зонда.

### Библиографические ссылки/ References

1. Haque A., Faizi M.S., Rather J.A., Khan M.S. Next generation NIR fluorophores for tumor imaging and fluorescence-guided surgery: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2017; 25(7): 2017-2034.
2. Maskevich A.A., Lavysh A.V., Kuznetsova I.M., Sulatskaya A.I., Turoverov K.K. Spectral manifestations of thioflavin T aggregation. *Journal of Applied Spectroscopy* 2015; 82(1): 33-39.
3. Lai L., Barnard A.S. Functionalized nanodiamonds for biological and medical applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2015; 15(2): 989-999.
4. Say J.M., van Vreden C., Reilly D.J., Brown L.J., Rabeau J.R., King N.J. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications. *Biophysical Reviews* 2011; 3(4): 171-184.