

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

«До захисту»

Зав. кафедри молекулярної
і медичної біофізики

докт. фіз.-мат. наук, доцент
(науковий ступінь, вчене звання)

_____ В.П. Берест
(підпис)

«___» _____ 2023 р

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

БІОЛОГІЧНО ЗНАЧУЩІ ВЗАЄМОДІЇ БАРВНИКА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО З БІОМОЛЕКУЛАМИ ТА НАНОМАТЕРІАЛАМИ

Науковий керівник

докт. фіз.-мат. наук, п. н. с.
відділу Молекулярної біофізики
Фізико-технічного інституту низьких температур
ім. Б.І. Веркіна НАН України,
професор Харківського національного університету
ім. В.Н. Каразіна МОН України

_____ М.В. Косевич
(науковий ступінь, вчене звання,
посада, місце роботи) (підпис)

Виконав студент групи РБ-61,
спеціальність: 105 Прикладна
фізика та наноматеріали

_____ Ю.О. Харченко
(підпис)

Харків – 2023

РЕФЕРАТ

Харченко Ю.О. Біологічно значущі взаємодії барвника метиленового синього з біомолекулами та наноматеріалами. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2023. 47 с., 15 рис., 0 табл., 0 дод., 45 джерел.

КАТІОННИЙ БАРВНИК МЕТИЛЕНОВИЙ СИНІЙ, МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ, МІЖМОЛЕКУЛЯРНІ ВЗАЄМОДІЇ, РЕДОКС ПРОЦЕСИ, НАНОМАТЕРІАЛИ, ЦИСТЕЇН, ДЕСОРБЦІЙНА МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ

Об'єкт дослідження: молекулярні механізми дії біологічно активних речовин на прикладі метиленового синього.

Предмет дослідження: механізми взаємодії редокс-активного катіонного барвника метиленового синього з біомолекулами та наноматеріалами.

Мета роботи: встановити молекулярні механізми взаємодій барвника метиленового синього з біомолекулами та наноматеріалами за допомогою методу м'якоіонізаційної мас-спектрометрії.

Методи дослідження: мас-спектрометрія з лазерною десорбцією/іонізацією.

Результати дослідження: показано, що різні типи міжмолекулярних взаємодій метиленового синього з різними матеріалами відбиваються у певних характеристиках їх мас-спектрів. Взаємодія метиленового синього з амінокислотою цистеїном полягає у редокс-процесі, в результаті якого цистеїн окислюється з утворенням цистину, а метиленовий синій відновлюється, про що свідчить реєстрація відповідних продуктів у мас-спектрах. Взаємодія метиленового синього з 2D наноматеріалом MoS_2 відбувається шляхом електростатичних взаємодій катіонів барвника з частково негативною поверхнею MoS_2 , що поліпшує вивільнення катіонів під впливом лазерного опромінення. Менш ефективно вивільнення метиленового синього з наноматеріалу оксиду графену свідчить про його більш міцне зв'язування з оксидом графену у порівнянні з MoS_2 . Реакції відновлення при взаємодії метиленового синього з наноматеріалами не спостерігаються.

Отримані результати можуть використовуватися при подальших пошуках фармакологічних застосувань метиленового синього, при розробці сорбентів на основі наноматеріалів для очистки води та для удосконалення мас-спектрометричної методики з лазерною десорбцією/іонізацією.

ABSTRACT

Kharchenko Y.O. Biologically significant interactions of Methylene Blue with biomolecules and nanomaterials. Thesis. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2023. 47 pages, 15 figures, 0 tables, 0 appendices, 45 references.

CATIONIC DYE METHYLENE BLUE, MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION, INTERMOLECULAR INTERACTIONS, REDOX PROCESSES, NANOMATERIALS, CYSTEINE, DESORPTION MASS SPECTROMETRY

Research object: molecular mechanisms of the action of biologically active substances using methylene blue as an example.

Research subject: mechanisms of interaction of the redox-active cationic dye methylene blue with biomolecules and nanomaterials.

Objective of the study: to establish the molecular mechanisms of interactions between methylene blue dye and biomolecules or nanomaterials using soft ionization mass spectrometry.

Research methods: mass spectrometry with laser desorption/ionization.

Research findings: it is demonstrated that various types of intermolecular interactions between methylene blue and different materials are reflected in specific characteristics of their mass spectra. The interaction of methylene blue with the amino acid cysteine involves a redox process, where cysteine oxidizes to form cystine, while methylene blue is reduced, as evidenced by the registration of corresponding products in the mass spectra. The interaction of methylene blue with the 2D nanomaterial MoS₂ occurs through electrostatic interactions between the dye cations and the partially negative surface of MoS₂, facilitating the release of cations under laser irradiation. Less efficient release of methylene blue from graphene oxide nanomaterial indicates its stronger binding with graphene oxide as compared to MoS₂. No reduction reactions are observed during the interaction of methylene blue with the nanomaterials.

The obtained results can be applied in further investigations of pharmacological applications of methylene blue, in the development of sorbents based on nanomaterials for water purification, and in the refinement of mass spectrometric methodology with laser desorption/ionization.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
1. БАРВНИК МЕТИЛЕНОВИЙ СИНІЙ ТА БІОФІЗИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ.....	7
1.1. Біологічно активний барвник метиленовий синій	7
1.2. Редокс-властивості метиленового синього.....	8
1.3. Мас-спектрометрія як метод біофізичних досліджень	10
1.4. Мас-спектрометричні дослідження метиленового синього	13
1.5. Молекулярно динамічне моделювання, вакуумний підхід	22
2. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ	25
2.1. Мас-спектрометрія з лазерною десорбцією/іонізацією	25
2.2. Матеріали	26
3. БІОЛОГІЧНО ЗНАЧУЩІ ВЗАЄМОДІЇ БАРВНИКА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО З БІОМОЛЕКУЛАМИ ТА НАНОМАТЕРІАЛАМИ.....	27
3.1. Аналіз ізотопного розподілу метиленового синього	27
3.2. Спостереження методом ЛДІ редокс-реакцій при взаємодії метиленового синього з амінокислотою цистеїном	28
3.3. Системи з двома катіонними сполуками - метиленовим синім та декаметоксином.....	32
3.4. Нанокompозити метиленового синього з дисульфідом молібдену (MoS ₂).....	34
3.5. Взаємодія метиленового синього з оксидом графену.....	36
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- Метиленовий синій (Methylene Blue) – MB
- Бомбардування швидкими атомами (БША) – з англійської: Fast Atom Bombardment (FAB)
- Лазерна десорбція/іонізація – ЛДІ
- Матрично-активована лазерна десорбція/іонізація (МАЛДІ) – з англійської: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)
- Цистеїн – Cys
- Катіон – Cat⁺

ВСТУП

Актуальною задачею молекулярної біофізики є вивчення молекулярних механізмів дії біологічно активних сполук, зокрема ліків. Однією з таких сполук є катіонний редокс-активний барвник метиленовий синій (methylene blue, MB). Він знаходить багато корисних застосувань і як фармакологічний препарат, і як тестова речовина при дослідженні наноматеріалів. Тому вивчення його взаємодій з біомолекулами та наноматеріалами на молекулярному рівні є практично важливою задачею.

У розділі, присвяченому аналізу літератури, зібрано наявні дані стосовно практичних застосувань MB та результатів його досліджень на молекулярному рівні. Також проаналізовано використання мас-спектрометрії в біофізичних дослідженнях з фокусом на методах бомбардування швидкими атомами (FAB) та матрично-активовану лазерну десорбцію/іонізацію (MALDI) як ключових техніках для аналізу біомолекул, зокрема біополімерів. Обговорено основні переваги та принципи використання зазначених методів, а також їхній вплив на розуміння властивостей біополімерів.

Ретельно розглянуті дослідження та мас-спектри, де застосовувалися зазначені методи, щоб вивчити молекулярні характеристики біомолекул у різних умовах. Зокрема, виявлено, що ці методи можуть бути успішно використані для дослідження структури та взаємодії біомолекул та біологічно активних сполук у різних системах.

На основі проведеного аналізу обрана наступна тема для дипломної роботи: дослідження біологічно значущих взаємодій барвника метиленового синього з біомолекулами та наноматеріалами за допомогою методу м'якоіонізаційної мас-спектрометрії.

1. БАРВНИК МЕТИЛЕНОВИЙ СИНІЙ ТА БІОФІЗИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

1.1. Біологічно активний барвник метиленовий синій

Існує вражаючий діапазон застосування барвника метиленового синього (Methylene Blue - MB) (органічної солі $MB^{+} \bullet Cl^{-}$ або $Cat^{+} \bullet Cl^{-}$). Після багатьох років успішного застосування MB у фармакології та біомедичних дослідженнях [6], у біологічній візуалізації [7], його властивості відновлення/окислення роблять його перспективним матеріалом для нанотехнологічних застосувань як окисно-відновний індикатор і барвник-медіатор у біосенсорах [8], а також фотосенсибілізатор [9] і компонент матеріалів сонячних елементів [10]. Щоб функціонувати в таких наноматеріалах, барвник MB повинен бути іммобілізований у якомусь носії або адсорбуватися на його поверхні.

Мас-спектрометрія може легко ідентифікувати продукти відновлення окислювально-відновних чутливих барвників за зміною маси аналіту. Відновлення різних сполук, включаючи барвники MB [11], зокрема, спостерігалось за умов різних мас-спектрометричних методів: вторинної іонної мас-спектрометрії (SIMS) і бомбардування швидкими атомами (FAB) [12], лазерної десорбції/іонізації (LDI) і LDI з використанням матриці (MALDI) [13] та іонізація електророзпиленням (ESI) [14].

Метиленовий синій (метиленова синь, метиленовий блакитний, *Methylenum coeruleum* (лат.), Methylene Blue, MB (англ.), N,N,N',N'-тетраметилтіоніну хлорид, *dimethylaminophenothiazin-5-ium chloride*) належить до органічних основних тіазинових барвників [15, 16] - похідних фенотіазину [17, 18]. Метиленовий синій був уперше синтезований Генріхом Каро в 1876 році [19,20].

MB являє собою сіль, що складається з органічного катіона, який позначається далі як MB^{+} або Cat^{+} , і аніона Cl^{-} (Рис. 1.1.1).

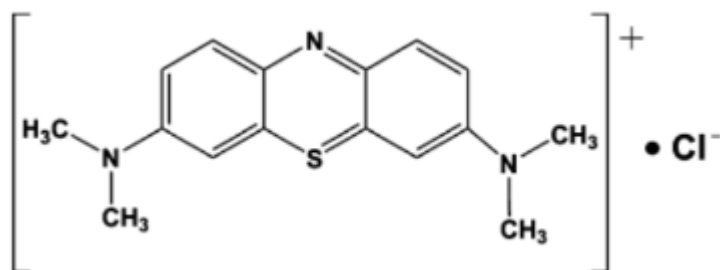


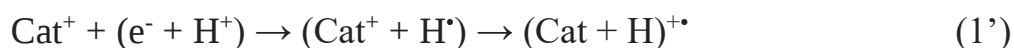
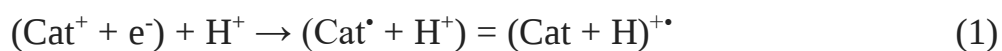
Рисунок 1.1.1. Структурна формула метиленового синього $\text{Cat}^+ \bullet \text{Cl}^-$. Брутто-формула $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$, молекулярна маса $319,85 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$. Значення моноізотопної маси катіона Cat^+ - 284 а. о. м.

1.2. Редокс-властивості метиленового синього

МВ належить до так званих редокс-активних або редокс-чутливих барвників ("редокс" від англійського скорочення "reduction-oxidation" до "redox") [21, 22]. Катіон MB^+ легко відновлюється; нормальний окисно-відновний потенціал E_0 МВ при рН 7 дорівнює $+0,011 \text{ В}$, при рН 0 E_0 становить $+0,53 \text{ В}$ [22, 23]. За даними робіт [24, 25] редокс-потенціал МВ становить $-0,186 \text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода.

Водний розчин МВ у вихідному (окисленому) стані має синє забарвлення; відновлена, так звана лейкоформа (від давньогрецького λευκός - білий) МВ - безбарвна. Явище зміни кольору водного розчину МВ (як і інших основних барвників) називається метахромазією.

Реакції відновлення Cat^+ при надходженні електрона і протона або атома водню із зовнішнього середовища виглядають наступним чином. На стадії так званого одноелектронного відновлення утворюється проміжний продукт - напіввідновлена форма, яка являє собою катіон-радикал:



Завершення двоелектронного процесу дає нейтральну знебарвлену відновлену форму:



Якщо в системі присутні димери $(2\text{Cat})^{2+}$, то можливий їх перехід у збуджений стан шляхом захоплення електрона



Під час дисоціації такого непарноелектронного димера утворюється напіввідновлений продукт



який далі перетворюється відповідно до реакцій (2').

У роботі [26] описуються перетворення у твердих зразках МВ під дією УФ опромінення. Поглинання кристалічним МВ випромінювання в УФ діапазоні призводить до утворення напіввідновленої та напівокисленої форм МВ унаслідок перенесення електрона між сусідніми катіонами:



Реакції окислення-відновлення МВ є оборотними. Оборотність реакцій наочно демонструється в лабораторному експерименті з "синьою пляшкою" ("blue bottle" experiment) [27, 28]: при додаванні до водного розчину МВ суміші глюкози з гідроксидом натрію розчин швидко знебарвлюється внаслідок відновлення МВ до його лейкоформи. При струшуванні колби розчин насичується киснем, який окислює лейкоформу, і розчин набуває синього забарвлення, яке знову зникає в міру витрачання кисню.

Лейкоформа МВ [29] сама по собі є нестабільною у воді [30] і легко окислюється, проте розробляються методи синтезу її похідних [31, 32].

Процес відновлення MB у різних умовах, а також продукти редокс-реакцій продовжують активно вивчатися [33, 34].

За даними спектроскопії поглинання в УФ і видимій області [33] максимум смуги поглинання $\lambda_{\max}$ для напіввідновленої радикальної форми MB ($\text{Cat}^\bullet$) становить 420 нм; продукт двоелектронного відновлення без протона (Cat^-) визначається за смугою з $\lambda_{\max} = 256$ нм. Для відновленої нейтральної безбарвної лейкоформи ($\text{Cat} + \text{H}^\circ$) ($\text{pH} < 2$) максимумами реєструються на 256 і 314 нм [35]; для протонованої лейкоформи ($2 < \text{pH} < 7$) $\lambda_{\max} = 232$ нм [36].

Окисно-відновні властивості MB визначають низку його корисних практичних застосувань.

1.3. Мас-спектрометрія як метод біофізичних досліджень

Мас-спектрометрія визначається як потужний метод для аналізу структури та властивостей біомолекул, що відкриває нові перспективи у біофізичних дослідженнях. Цей метод використовується для вивчення мас та зарядів іонів, які утворюються під час іонізації біомолекул.

Мас-спектрометрія це метод «зважування» атомів і молекул; метод точного вимірювання мас атомів і молекул, який базується на розділенні іонізованих частинок із різним відношенням маси m до заряду z в магнітному та електричному полях. Результат: мас-спектр.

Переваги використання мас-спектрометрії:

- Висока чутливість: Мас-спектрометрія забезпечує високу чутливість визначення маси молекул, навіть в малих концентраціях, що робить її ідеальним для аналізу слабких сигналів.

- Великий діапазон застосувань: Метод може бути використаний для дослідження різноманітних біомолекул, включаючи білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди тощо.
- Точність та роздільна здатність: Мас-спектрометрія дозволяє отримувати точні та високороздільні дані про масу іонів, що важливо для розуміння структури молекул.

Загалом, мас-спектрометрія є необхідним інструментом у біофізичних дослідженнях, допомагаючи розкрити та розуміти властивості біомолекул на молекулярному рівні.

Сер Джозеф Джон Томсон — англійський фізик, лауреат Нобелівської премії (1906) за заслуги в області теоретичних й експериментальних досліджень провідності електрики в газах, серед яких найважливіша — відкриття електрона, ізотопів і винаходу мас-спектрометра. У 1911 році він розробив так званий метод парабол для вимірювання відношення заряду частинки до її маси, який зіграв велику роль в дослідженні ізотопів. В розробках мас-спектрометрії біополімерів важливу роль відіграв також саме цей вчений, як винахідник мас-спектрометра, та інші науковці, які сприяли значному прориву в цій області. Саме завдяки їхнім дослідженням вдається проводити аналіз та ідентифікацію біополімерів, що є критичним для багатьох наукових дисциплін, зокрема біохімії та медичних досліджень. У визнання їхнього внеску в розвиток мас-спектрометрії, деякі науковці були удостоєні Нобелівської премії, що підкреслює важливість їхніх відкриттів для сучасної науки.

У даній роботі будуть описані два методи:

- Бомбардування швидкими атомами (БША) – з англійської: Fast Atom Bombardment (FAB)
- Матрично-активована лазерна десорбція/іонізація (МАЛДІ) – з англійської: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Бомбардування швидкими атомами (FAB) — це техніка іонізації, яка використовується в мас-спектрометрії, коли промінь високоенергетичних атомів потрапляє на поверхню для створення іонів [1][2][3]. Він був розроблений Майклом Барбером в Манчестерському університеті в 1980 році. У FAB матеріал, що підлягає аналізу, змішується з нелетким хімічним захисним середовищем, яке називається матрицею, і піддається бомбардуванню у вакуумі високоенергетичним (від 4000 до 10 000 електрон-вольт) пучком атомів. Атоми зазвичай походять з інертного газу, такого як аргон або ксенон. Загальні матриці включають гліцерин, тіогліцерин, 3-нітробензиловий спирт (3-NBA), 18-краун-6 ефір, 2-нітрофенілоктиловий ефір, сульфолан, діетаноламін і триетаноламін. FAB є технікою відносно низької фрагментації (м'якої) іонізації, яка створює переважно цілі протоновані молекули, позначені як $[M + H]^+$, і депротоновані молекули, такі як $[M - H]^-$. У рідкісних випадках катіони-радикали також можна спостерігати в FAB-спектрі.

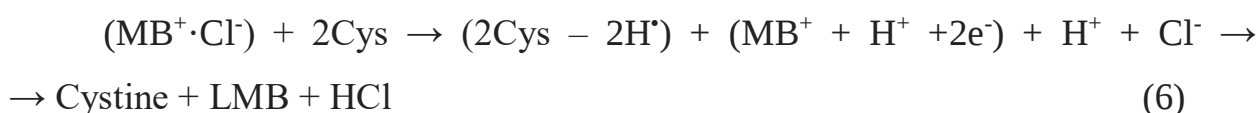
Матрична лазерна десорбція/іонізація (MALDI) — це метод іонізації, який використовує матрицю, що поглинає лазерну енергію, для створення іонів із великих молекул із мінімальною фрагментацією [4]. Він застосовується для аналізу біомолекул (біополімерів, таких як ДНК, білки, пептиди та вуглеводи) і різноманітних органічних молекул (таких як полімери, дендримери та інші макромолекули), які, як правило, є крихкими та фрагментуються під час іонізації звичайними методами іонізації.

Методологія MALDI складається з трьох етапів. Спочатку зразок змішується з відповідним матеріалом матриці та наноситься на металеву пластину. Потім, імпульсний лазер опромінює зразок, запускаючи абляцію та десорбцію зразка і матеріалу матриці. Нарешті, молекули аналіту іонізуються шляхом протонування або депротоонування в гарячому шлейфі абляційних газів, а потім їх можна прискорити в будь-якому мас-спектрометрі, який використовується для їх аналізу [5].

1.4. Мас-спектрометричні дослідження метиленового синього

Одним з актуальних напрямів досліджень, пов'язаних із розробкою засобів боротьби з нейродегенеративними захворюваннями, є пошук речовин-інгібіторів агрегації певних білків, яка порушує функціонування нервових клітин. Саме цю проблему і висвітлено у роботі [37]. У роботі досліджено молекулярні механізми дії фармакологічного препарату, метиленового синього, як потенційного засобу запобігання хвороби Альцгеймера. Дослідження проведено на модельній системі *in vitro*, фокусуючись на редокс-взаємодіях метиленового синього з амінокислотою цистеїном, що входить до складу активної ділянки Тау-білків. Використовуючи метод вторинно-емісійної мас-спектрометрії, був ідентифікований єдиний продукт прямого окислення цистеїну метиленовим синім, а саме цистин. Цей продукт утворюється через формування дисульфідного містка між двома молекулами цистеїну.

Окислювально-відновлювальна реакція цистеїну з органічною сіллю метиленового синього ($MB^+ \cdot Cl^-$) як окислювачем, що призводить до з'єднання двох молекул цистеїну (Cys) в цистин за участю утворення дисульфідного містка, а також лейкоформи LMB, має наступний вигляд:



Про перебіг такої реакції в системі (цистеїн – метиленовий синій) свідчить втрата кольору водного розчину внаслідок переходу метиленового синього в безкольорову лейкоформу. Концентраційні та часові параметри взаємодії показують, що зменшення інтенсивності забарвлення системи відбувається більш активно зі збільшенням концентрації цистеїну і прогресує з часом. Візуальні зміни, що спостерігалися, були кількісно виміряні за допомогою методу спектроскопії поглинання у видимому та УФ діапазонах (Рис. 1.4.1).

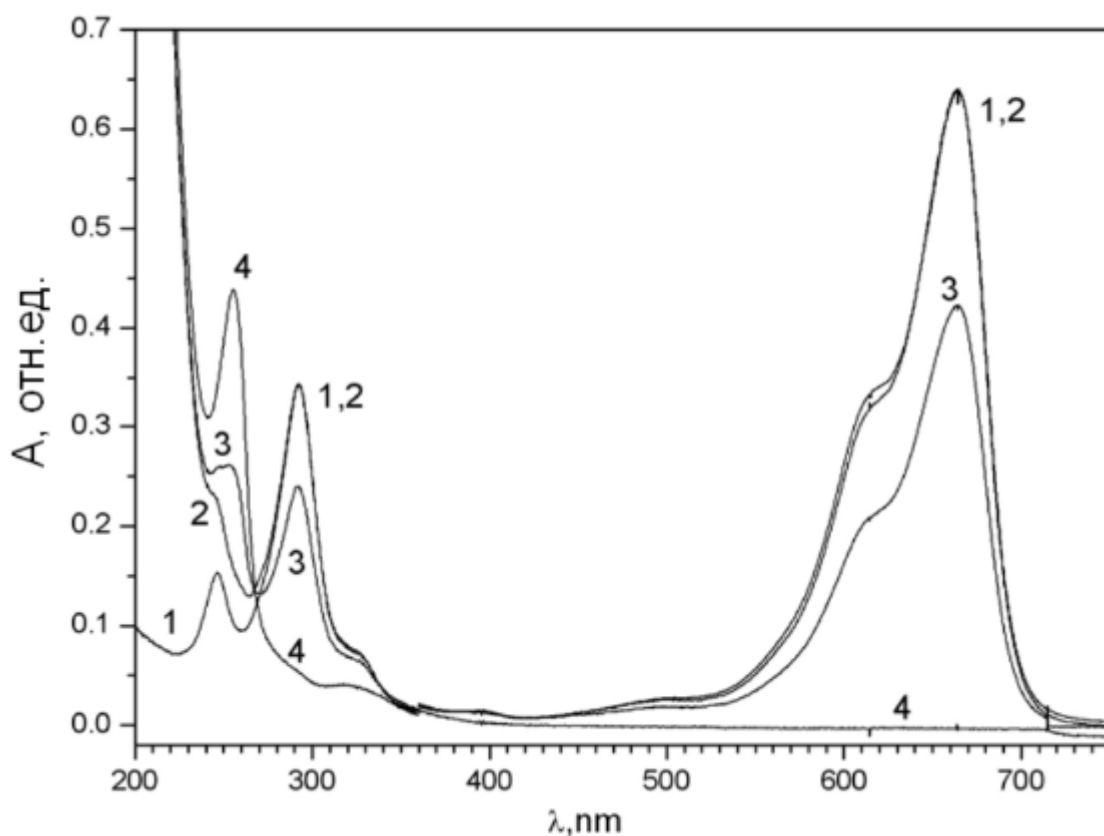


Рисунок 1.4.1. Зміни спектрів поглинання залежно від часу взаємодії у суміші (метиленовий синій - цистеїн). Лінія 1 - спектр водного розчину контрольного зразка метиленового синього, $C_{\text{МВ}}=1,1 \cdot 10^{-4}$ М. Лінії 2-4 - спектри того ж розчину після додавання до нього $9 \cdot 10^{-3}$ М цистеїну, зареєстровані через 10 хв (2), через 4 години (3) та через 20 годин (4). Характеристичні значення максимумів смуг поглинання для чистого метиленового синього – $\lambda = 663$ нм, 614 нм, 292 нм; для лейкоформи метиленового синього – $\lambda = 256$ нм. Положення ізобестичної точки – $267,5 \pm 1$ нм.

Існує ймовірність, що така модифікація цистеїну, що входить до складу Тау-білків, може впливати на їхню структуру і запобігати подальшій агрегації. Крім того, не було виявлено кисеньвмісних продуктів окислення цистеїну. Експеримент також демонструє, що під час реакції відновлення

метиленового синього відбувається перехід у лейко-форму, яка розглядається як потенційний агент у терапії нейродегенеративних захворювань.

Ідентифікацію продуктів взаємодії у системі (цистеїн – метиленовий синій) проводили за допомогою ББА мас-спектрометрії. У ББА мас-спектрі (Рис. 1.4.2) присутній пік, відповідний вихідному компоненту системи – цистеїну – в протонованій формі CysH^+ , m/z 122, і сигнали гліцеринової матриці.

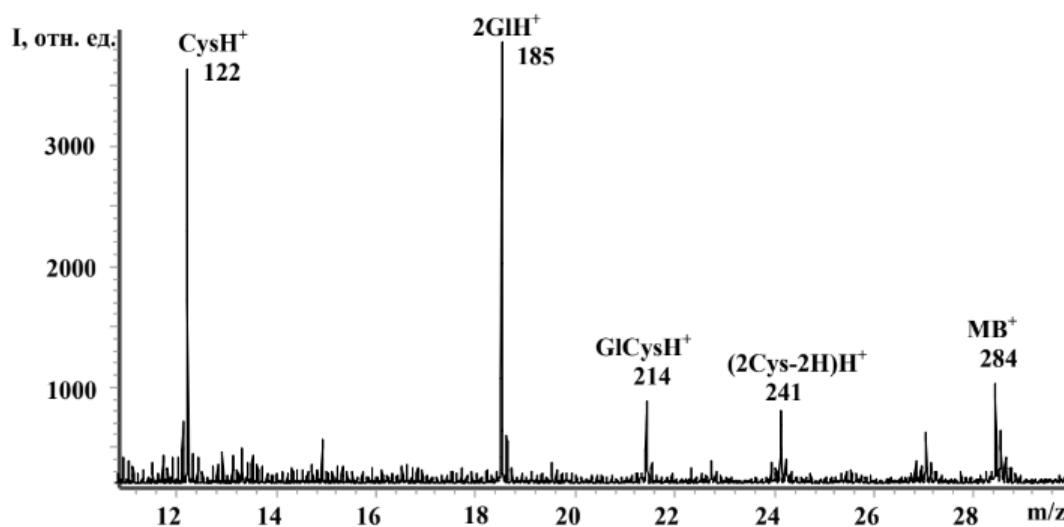


Рисунок 1.4.2. ББА мас-спектр системи (цистеїн – метиленовий синій). Зразок – безбарвні кристали, осілі з водного розчину суміші $3,2 \cdot 10^{-2}$ М метиленового синього та $4,4 \cdot 10^{-1}$ М цистеїну, витриманого 10 годин, розчинені в гліцериновій (Gl) матриці.

Співвідношення абсолютних інтенсивностей піків в області цистину та метиленового синього на Рис. 4.2 вказує на відповідність кількостей окисленого цистеїну та відновленого метиленового синього відповідно до реакції (1). Масспектри, одержані для систем з іншими співвідношеннями компонентів, вказують на те що проходження реакції вимагає надлишку цистеїну; при зниженні відносної концентрації цистеїну інтенсивність піку, що відповідає цистину, знижується. Для різних співвідношень концентрацій

як відразу після знебарвлення, так і для знебарвлених розчинів, що простояли кілька діб, не реєструється з часом будь-яких змін у мас-спектрі. Завдання даної роботи полягало у встановленні продуктів редокс-реакцій цистеїну та метиленового синього; пошук шляхів підвищення ефективності взаємодії та встановлення впливу фізіологічних умов потребує подальших досліджень.

Отриманий результат щодо утворення дисульфідних містків можна використовувати для пояснення встановленої ефективності препаратів на основі метиленового синього на ранніх стадіях розвитку хвороби Альцгеймера [39, 40].

Масс-спектрометричне та спектрофотометричне дослідження системи (амінокислота цистеїн - метиленовий синій) дозволило встановити можливий молекулярний механізм взаємодії редокс-активного агента, метиленового синього, з тау-білками, розглянутими як молекулярна мішень для терапії нейродегенеративних захворювань.

1. Підтверджено, що окислювальний вплив редокс-активного барвника метиленового синього на амінокислоту цистеїн полягає в утворенні дисульфідного мостика між двома молекулами цистеїну, що сприяє їх з'єднанню в цистин.
2. Окислені мономери цистеїну, які можуть утворюватися з приєднанням кисню (про що йшлося в літературних джерелах), не були виявлені.
3. Утворення дисульфідних мостиків на мономерному рівні може сприяти запобіганню агрегації тау-білків на біополімерному рівні.
4. Під час редокс-реакції метиленовий синій переходить у лейкоформу, яка також позиціонується в літературі перспективним лікарським засобом.

Отримані результати, які дозволили підтвердити факт протікання редокс-реакції між цистеїном та метиленовим синім, а також ідентифікувати

продукт їх взаємодії, є практично важливими для подальшого напрямленого пошуку лікарських засобів для лікування або призупинення розвитку нейродегенеративних захворювань.

У роботі [41] досліджується можливість контролю швидкості відновлення редокс-активних барвників, вбудованих у наноструктури, що є актуальним для нанотехнологій та біомедицини. Запропоновано новий мас-спектрометричний підхід для вивчення модуляції відновлення катіонного барвника метиленового синього (MB) в залежності від його агрегації при включенні його до негативно заряджених наночастинок. Цей підхід ґрунтується на виявленні різниці в редокс-активності мономерів і димерів катіона MB (Cat^+). Дослідження включає в себе використання трьох аніонних наноструктур та трьох методів мас-спектрометрії. Запропонований метод може бути використаний для мас-спектрометричного зображення фарбованих біологічних матеріалів, надаючи інформацію про локалізацію та стан агрегації метиленового синього.

З метою виявлення впливу адсорбції катіонів MB на аніонних шарах на окисно-відновну активність MB, було досліджено три системи за допомогою трьох мас-спектрометричних методів.

(1) Моношар, утворений на поверхні розчину гліцерину аніонної поверхнево-активної речовини SDS з включенням MB, досліджували бомбардуванням частинками в умовах FAB.

(2) На висушені оболонки мильних бульбашок, видутих із розчину SDS та MB у воді, впливали УФ-лазерним імпульсним опроміненням в умовах LDI.

(3) MB, адсорбований на поверхні пористого кремнію, модифікованого іонообмінними групами $-\text{SO}_3\text{H}$, досліджено методом UV LDI (називається методом DIOS).

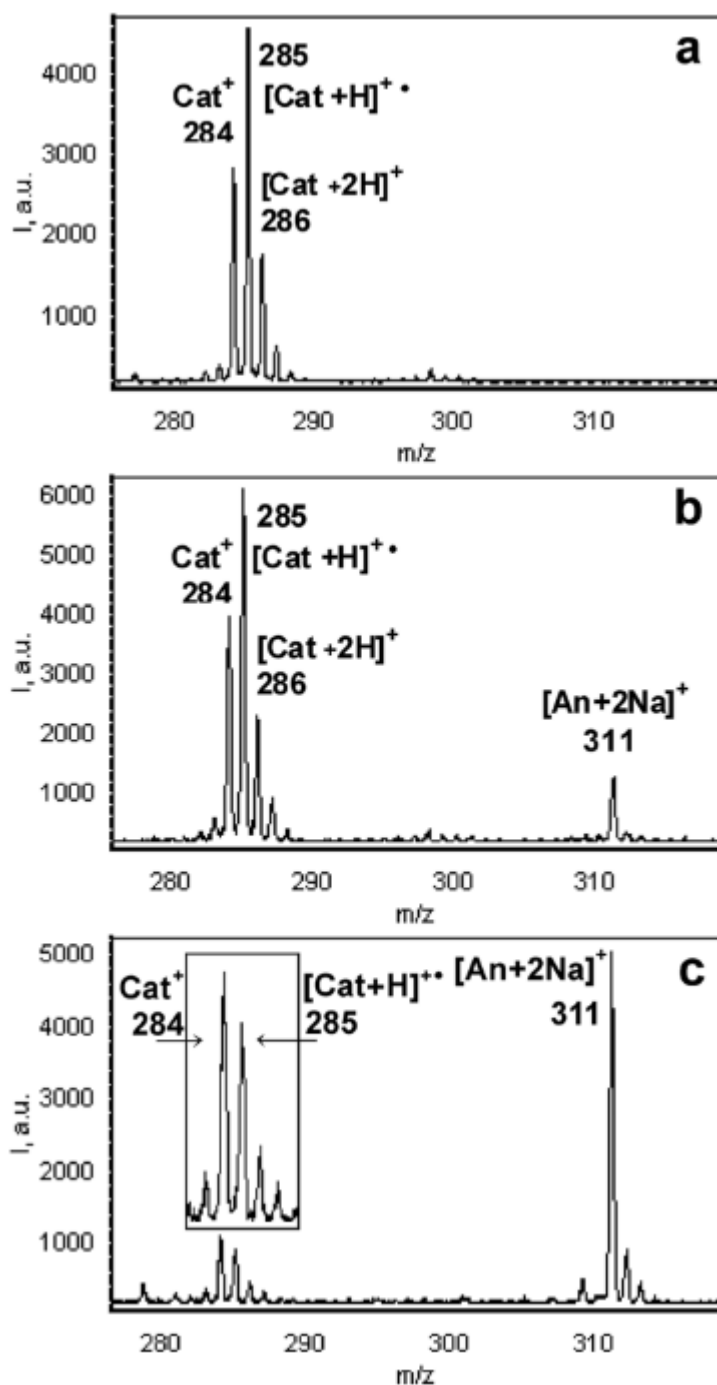


Рисунок 1.4.3. Мас-спектри FAB поверхневого шару системи (SDS + MB) в гліцириновій матриці: (a) чистий MB (10^{-2} M) без SDS; (b) суміш 10^{-1} M SDS і 10^{-2} M MB; (c) суміш 10^{-1} M SDS і 10^{-4} M MB.

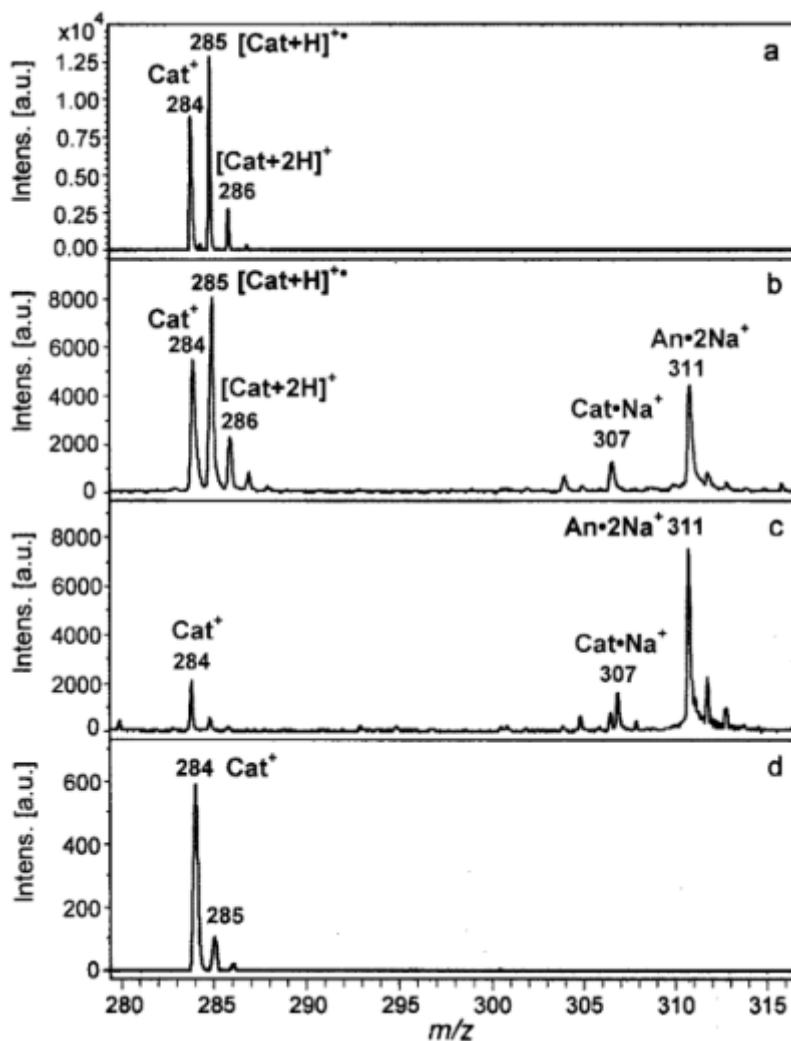


Рисунок 1.4.4. LDI мас-спектри MB та (SDS + MB) систем: (a) чистий кристалічний MB; (b) суміш 10^{-2} М MB і 10^{-1} М SDS; (c) суміш 10^{-4} М MB і 10^{-1} М SDS; (d) LDI (DIOS) MB, адсорбованого на іонообмінній поверхні PS-SO_3^- .

Дана робота підтверджує значущість мас-спектрометричного підходу до моніторингу модуляції відновлення катіонного барвника MB в негативно заряджених наноструктурах. Запропонований метод виявився досить простим: спостереження за розподілом піку, характерного для незмінного катіону MB в десорбційних мас-спектрах будь-якої системи з MB, свідчить про мономерний розподіл MB^+ в навколишньому середовищі, тоді як спостереження за продуктами відновлення MB^+ ($[\text{Cat} + \text{H}]^{+\bullet}$ і $[\text{Cat} + 2\text{H}]^+$) свідчить про його димеризацію (агрегацію). Цей ефект може бути виявлений

різними техніками мас-спектрометрії, такими як FAB, LSIMS, LDI, DIOS. Отримані спостереження корелюють із наявними спектроскопічними даними для схожих систем з різним відношенням мономерів/димерів МВ. Різниця у мас-спектральних зразках мономерів та димерів МВ, адсорбованих на негативно зарядженій поверхні, пояснюється у статті. Виявлена можливість контролю редокс-активності МВ за умови формування його мономерної чи димерної форми в аніонних моношарах може бути використана при створенні наноматеріалів і нанопристроїв. Залежність мас-спектрального зразка МВ від відношення мономер/димер може бути використана при інтерпретації даних, отриманих мас-спектрометричним зображенням МВ-фарбованих біологічних матеріалів.

Мета роботи [42] полягає у вирішенні проблеми міжмолекулярних взаємодій біологічно активних молекул з наноматеріалами за допомогою сучасних методів нанобіофізики. Це дослідження має як базове, так і прикладне значення. Робота зосереджена на функціональних властивостях нанокомпозитів редокс-активних органічних барвників з вуглецевими наночастинками та нанотекстурованими поверхнями неорганічних матеріалів, які забезпечуються особливими міжмолекулярними взаємодіями. У роботі оглядається та обговорюється новий мас-спектрометричний підхід для вивчення цих взаємодій на рівні наночастинок. Новизна методу полягає в можливості оцінювання елементарних кроків передачі електронів та протонів у нанокомпозитах редокс-чутливих барвників, що є важливим для їх функціонування. Робота наводить актуальні досягнення використання мас-спектрометричного підходу у моніторингу реакцій зниження похідних імідазофеназіну та катіонного барвника метиленового синього, що осаджені на вуглецевих наночастинках, плівках мезопористого діоксиду, наноструктурованій поверхні графіту та органічних моношарах.

Матеріали викладені у статті свідчать про успішність запропонованого мас-спектрометричного підходу для оцінки функціональної окисдовідновної

активності біологічно значущих барвників при їх включенні в різні нанокompозити та наносистеми. Показано, що елементарні етапи зниження барвників, включаючи передачу протонів і електронів, можна вивчати на рівні окремих молекул та нанокластерів. Новий експериментальний підхід, протестований на похідних імідазофеназіну та метиленовому синьому, може бути в подальшому використаний для інших систем барвник–наноматеріал. Викликом для подальшого розвитку методів мас-спектрометрії є застосування методу спостереження окисдовідновної поведінки барвників до мас-спектрометричного зображення фарбованих біологічних об'єктів.

У роботі [43] було вивчено нековалентну взаємодію катіонів барвника метилового синього (MB^+) з одношаровими вуглецевими нанотрубками (CNT) за допомогою молекулярно-динамічного (MD) моделювання, квантово-хімічних розрахунків та лазерної десорбції/іонізації мас-спектрометрії. MD-моделювання комплексів $(MB^+)_n$ -CNT у воді показало, що катіони MB^+ адсорбуються на поверхні нанотрубок у мономерній формі, виявлено як паралельне, так і перпендикулярне розташування площини MB^+ відносно осі CNT. Квантово-хімічні розрахунки пояснили, чому гнучкість катіона MB^+ при атомі сірки сприяє перпендикулярному розташуванню. Адсорбований MB^+ індукує позитивний електростатичний потенціал навколо нанотрубки. Мономерна адсорбція MB^+ на поверхні CNT призвела до відсутності в мас-спектрах $(MB^+)_n$ -CNT ознак відновних продуктів MB^+ , які зазвичай спостерігаються для кристалічних барвників.

Досліджено молекулярні механізми формування наногібриду MB^+ -CNT та його структурні, енергетичні та електронні властивості. Моделювання взаємодії CNT з різними кількостями MB^+ катіонів показало, що вони адсорбуються на поверхні CNT, утворюючи стійкі нековалентні комплекси. Також виявлено, що тонкий шар водорозчинних MB^+ катіонів на гідрофобній поверхні нанотрубки стабілізує багатозарядні наногібриди в водяному середовищі.

Досліджено електронні властивості MB^+ катіону, які свідчать про збільшену електронну густину в атомах азоту і дефіцит електронів на атомах сірки і водню. Рівномірний розподіл позитивного електростатичного потенціалу навколо MB^+ катіону дозволяє йому взаємодіяти з CNT без вираженої виборчості щодо атомів. Позитивний потенціал розповсюджується на бічні домени нанотрубки, підсилюючи зарядовий обмін.

Результати роботи внесли вклад у розуміння механізмів нековалентної взаємодії MB^+ з CNT. Вони розкрили гідрофобний характер адсорбції MB^+ на гідрофобній поверхні CNT, що стабілізується π - π та катіон- π взаємодією, а також зарядовим обміном. Позитивний електростатичний потенціал від MB^+ сприяє відштовхуванню багатозарядних асоціатів, запобігаючи їхньому швидкому злипанню і підтримуючи їх у водяному середовищі.

1.5. Молекулярно динамічне моделювання, вакуумний підхід

На першому етапі моделювання виконано МД-моделювання комплексів MB^+ з зигзагоподібного та крісельного типу вуглецевих нанотрубок (ВНТ) у вакуумі. Щоб описати відносну орієнтацію MB^+ і ВНТ в комплексі, використовуються осі ВНТ і MB^+ , проведені вздовж найдовшого розміру нанотрубки та вздовж площини катіонного гетероциклу. Конфігурація з паралельним вирівнюванням осей катіона MB^+ і ВНТ обрано як вихідну структуру комплексу в моделюванні. Аналіз структурних знімків, отриманих під час 10 нс моделювання при 300 К, показує, що комплекс MB^+ -ВНТ є стабільним; тобто не розкладається на окремі компоненти. У структурах зберігається безпосередній контакт центрального тіазинієвого кільця фенотіазинієвого трициклу катіона MB^+ з поверхнею нанотрубки, при цьому спостерігається деяке випадкове ковзання площини катіону MB^+ по поверхні нанотрубки. У цьому ковзанні площина гетероциклу MB^+ і вигнута поверхня нанотрубки прагнуть зберегти максимальне перекриття. Під час моделювання також спостерігається деякий термічний обертальний рух двох диметиламіногруп ($-N(CH_3)_2$).

У процесі ковзання MB^+ по поверхні нанотрубки кут між осями MB^+ та ВНТ змінюється і в середньому становить близько 45° для комплексів як з зигзагоподібними, так і з ВНТ крісельного типу.

Для визначення найменш енергетичної структури комплексу MB^+ -ВНТ застосовано процедуру віртуального відпалу, яка складалася зі 100 циклів нагріву та подальшого охолодження системи. Структури комплексів MB^+ як з крісельноподібним ВНТ, так і з зигзагоподібним ВНТ (рис. 1.5.1), знайдені таким чином, демонструють майже паралельне вирівнювання осей двох компонентів. Їх енергія взаємодії між катіоном MB^+ і нанотрубною (з різною хіральністю) у цих комплексах досить близька: $-34,7$ ккал/моль для крісельноподібних ВНТ і $-34,6$ ккал/моль для зигзагоподібних ВНТ. Цікаво, що нагрівання системи до 800 К під час відпалу у вакуумі не викликає розпаду комплексу, хоча рухливість MB^+ на поверхні ВНТ значно зростає з температурою.

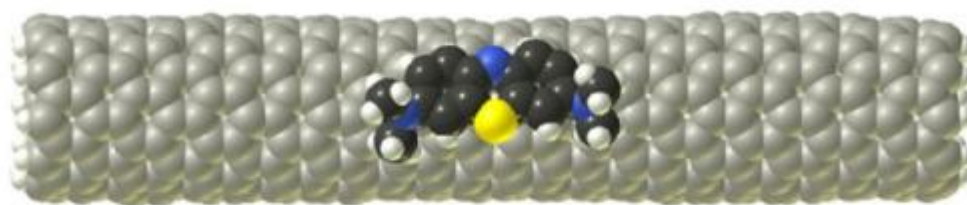


Рисунок 1.5.1 Найнижча енергетична структура комплексу катіону MB^+ із зигзагоподібною (10,0) ВНТ у вакуумі, отримана в результаті процедури відпалу в рамках МД моделювання. Осі катіона MB^+ і ВНТ практично паралельні. Енергія взаємодії $-34,6$ ккал/моль. На малюнку для атомів використані сфери з радіусами Ван-дер-Ваальса. Атоми забарвлені наступним чином: вуглець нанотрубок світло-сірий; вуглець катіону MB^+ темно-сірий; водень - білий; азот - синій; сірка – жовтий.

Проведений аналіз літературних даних дозволяє дійти наступних висновків. Виявлено розмаїття застосувань редокс-активного органічного барвника MB, коло яких продовжується розширюватися. Біологічна дія MB як лікарського засобу здебільшого базується на окислювально-відновлювальних (редокс) процесах. Механізм дії MB залежить від ступеня агрегації (зокрема димеризації) його органічного катіону. Взаємодія MB з наноматеріалами зумовлена його адсорбційними властивостями.

Постановка задачі дослідження: в рамках актуальної проблеми молекулярної біофізики – вивчення міжмолекулярних взаємодій біомолекул та встановлення механізмів дії біологічно активних речовин, зокрема ліків, представляє інтерес вивчення взаємодії MB з біомолекулами та наноматеріалами (як платформами для доставки ліків). Ефективним методом дослідження біомолекул та їх міжмолекулярних взаємодій є м'якоіонізаційна мас-спектрометрія. На основі вищесказаного можна сформулювати наступну тему для дипломної роботи: **дослідження біологічно значущих взаємодій барвника метиленового синього з біомолекулами та наноматеріалами за допомогою методу м'якоіонізаційної мас-спектрометрії.**

2. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

2.1. Мас-спектрометрія з лазерною десорбцією/іонізацією

Мас-спектрометричні дослідження проводили з використанням методу лазерної десорбції/іонізації (ЛДІ), реалізованому на часопролітному мас-спектрометрі Autoflex II LRF20 (Bruker Daltoniks GmbH, Бремен, Німеччина), який знаходиться у Центрі колективного користування науковими приладами «Мас-спектрометрія і рідинна хроматографія» НАН України (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України, Київ). У приладі використовується азотний лазер ($\lambda = 337$ нм), потужність якого підбирали для кожного зразка для забезпечення оптимального співвідношення сигнал-шум при добрій роздільній здатності. ЛДІ проводили лазерними імпульсами протяжністю 3 нс з частотою 20 Гц. Прискорююча напруга була 20 кеВ. Для запису спектру підсумовували результати 100 пострілів лазера, спрямованих на різні ділянки зразка. Мас-спектри знімали у режимах позитивних та негативних іонів.

Отримані мас-спектри обробляли та аналізували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення FlexAnalysis software (Bruker Daltonics, Німеччина). Ізотопні розподіли розраховували за допомогою програми IsoPro3.

Краплі рідких зразків наносили на стандартну металеву підкладинку – тримач зразків – і сушили до твердого стану при кімнатних умовах.

Ультразвукову обробку (подрібнення) наноматеріалів проводили за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН (Україна).

2.2. Матеріали

В роботі використовували препарати метиленового синього виробництва ВАТ «Вітаміни» (Умань, Україна), амінокислоту цистеїн «Реахім» (Україна), оксид графену виробництва фірми GRAPHENEА (Сан Себастьян, Іспанія), MoS₂ (CAS 1317-33-5, постачальник – фірма «BIPC», Україна).

Для приготування розчинів використовували дистильовану воду.

3. БІОЛОГІЧНО ЗНАЧУЩІ ВЗАЄМОДІЇ БАРВНИКА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО З БІОМОЛЕКУЛАМИ ТА НАНОМАТЕРІАЛАМИ

Наявні літературні дані стосовно різноманітних застосувань барвника метиленового синього свідчать про те, що основні механізми його біологічної дії пов'язані з редокс-процесами та залежать від ступеня агрегації (димеризації). Ці процеси супроводжуються зміною маси компонентів взаємодій, тому одним з ефективних методів їх дослідження є мас-спектрометрія. У цій частині роботи за допомогою мас-спектрометрії досліджено процеси на молекулярному рівні у низці модельних систем, які склалися з МБ та біомолекул або наноматеріалів.

3.1. Аналіз ізотопного розподілу метиленового синього

Для мас-спектрометричного спостереження перетворень МБ спочатку треба встановити мас-спектрометричні характеристики вихідної сполуки, зокрема ізотопний розподіл у групі піків молекулярного іону. Оскільки МБ є органічною сіллю, його узагальнену формулу можна позначити як $\text{Cat}^+\cdot\text{Cl}^-$, де Cat^+ - органічний катіон (див Рис. 1.1.1). На Рис. 3.1.1 представлені ізотопні розподіли для $\text{Cat}^+\cdot\text{Cl}^-$ та Cat^+ , розраховані за допомогою програми IzoPro3.

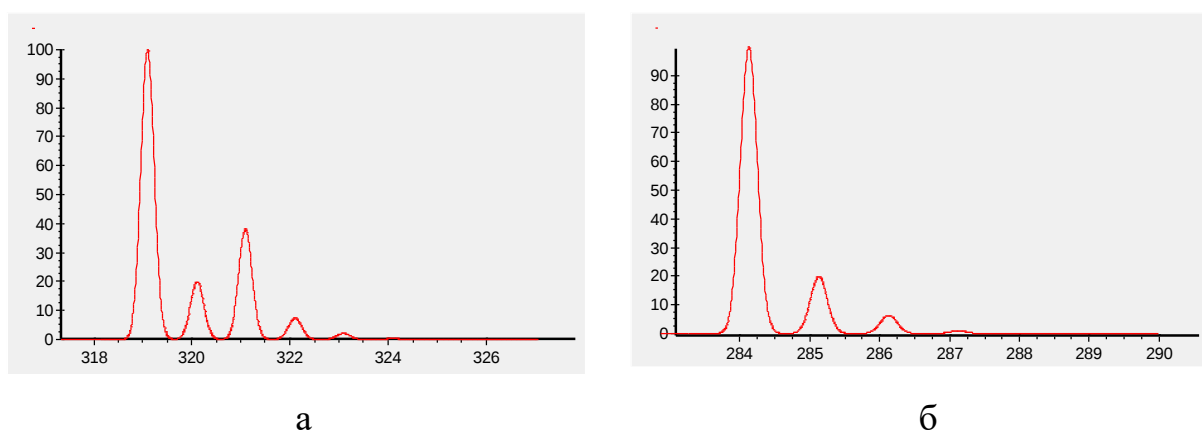


Рисунок 3.1.1. Ізотопний розподіл для молекули органічної солі МБ $\text{Cat}^+\cdot\text{Cl}^-$ (а) та її катіону Cat^+ (б).

m/z	Abundance	m/z	Abundance
319.85574	0.999709	284.40327	0.999720
319.09043	0.5949631	284.12158	0.7852225
320.09332	0.1186933	285.12447	0.1566495
321.08701	0.2278828	286.12034	0.0496547
322.08959	0.0436751	287.12154	0.0075477
323.08560	0.0124923	288.12356	0.0006132
324.08666	0.0018505	289.12634	0.0000325
325.08844	0.0001458		
326.09243	0.0000065		
а		б	

Рисунок 3.1.2. Середня маса (simulation average mass) та інтенсивність (simulation Abundance) для молекули органічної солі MB Cat⁺•Cl⁻ (а) та її катіону Cat⁺ (б).

При застосуванні м'якоіонізаційних десорбційних методів відбувається дисоціація солей і в режимі позитивних іонів реєструється група піків катіону Cat⁺ з першим моноізотопним піком з m/z 284.

3.2. Спостереження методом ЛДІ редокс-реакцій при взаємодії метиленового синього з амінокислотою цистеїном

Одним з фармакологічних застосувань MB є напрямок лікування нейродегенеративних захворювань, зокрема хвороби Альцгеймера (див. відомості в аналізі літератури, пункт 1.4). Стосовно молекулярних механізмів дії MB існує гіпотеза, що MB впливає на певні залишки амінокислоти цистеїну (Cys) у Тау-білках, сприяє утворенню дисульфідних містків шляхом редокс-реакцій з формуванням цистину, і таким чином порушує деякі нейродегенеративні процеси. У роботі [37] було проведено моделювання реакції між MB та цистеїном та виконано дослідження продуктів взаємодії

методом вторинно-емісійної мас-спектрометрії. При дослідженні методом БША використовували рідку гліцеринову матрицю, яка може вчиняти певний вплив на систему. Цікаво було б дослідити систему тільки з двох компонентів – MB та цистеїну, у зв'язку з чим в даній роботі була поставлена задача дослідити редокс-процеси у системі (MB + Cys) методом мас-спектрометрії з ЛДІ. Взаємодію органічних компонентів проводили у водному розчині, далі краплю розчину наносили на металевий тримач проб і висушували за кімнатних умов.

На Рис. 3.2.1 представлено загальний ЛДІ мас-спектр позитивних іонів системи (MB + Cys), який містить групи піків, які за масою відповідають вихідним компонентам MB та Cys, та малоінтенсивні групи піків відомих продуктів фрагментації MB.

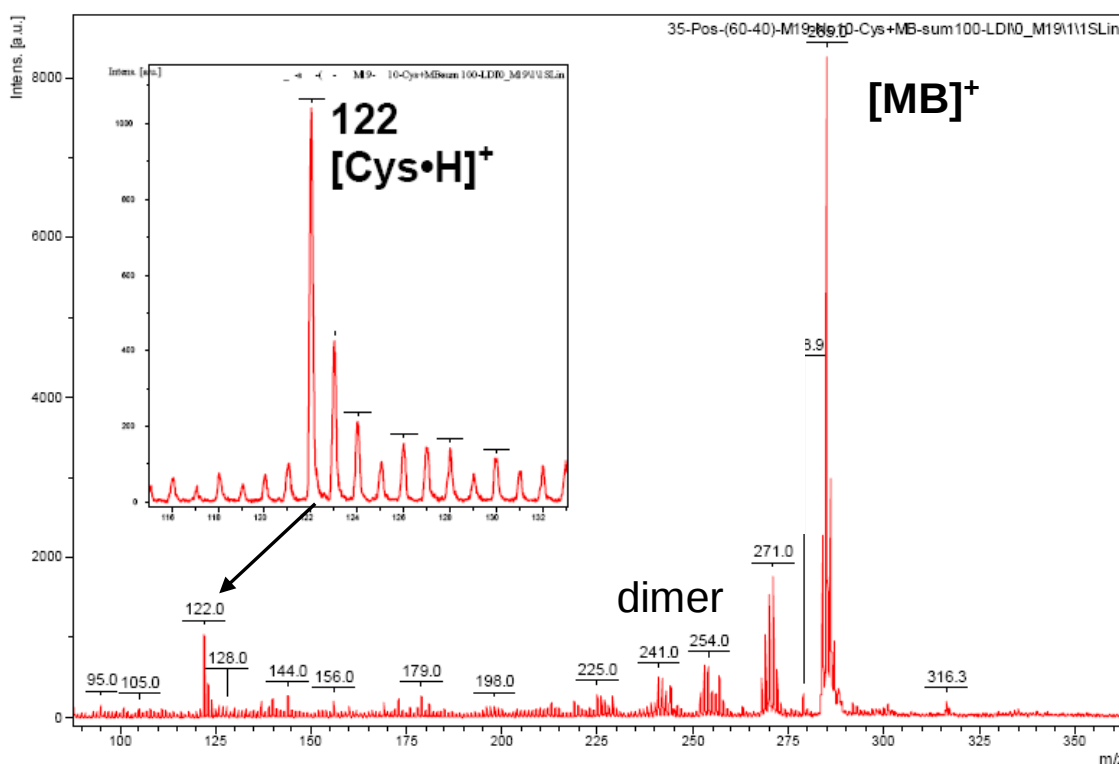


Рисунок 3.2.1. Оглядовий ЛДІ мас-спектр позитивних іонів системи (MB + Cys). На вставці показана збільшена за масштабом ділянка спектру, яка містить протоновану молекулу цистеїну [Cys•H]⁺, m/z 122. MB відповідає група піків, проаналізована на наступному рисунку 3.2.3.

Маса очікуваного продукту реакції – цистину – потрапляє до групи піків одного з фрагментів на відтинку 240-245 а.о.м., що потребує подальшого аналізу. На Рис. 3.2.2 показані збільшені ділянки спектрів в діапазоні мас очікуваного продукту реакції, отримані в режимах позитивних та негативних іонів.

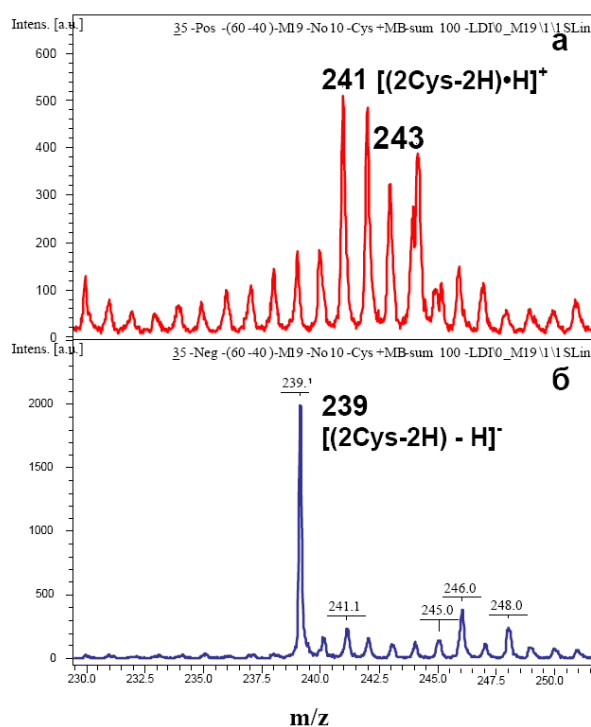


Рисунок 3.2.2. Збільшені ділянки мас-спектрів ЛДІ в діапазоні мас очікуваного продукту взаємодії у системі (MB + Cys), отримані в режимах позитивних (а) та негативних (б) іонів.

Нагадаємо, що нековалентний димер амінокислоти цистеїну реєструється у протонованій формі $[2\text{Cys}\cdot\text{H}]^+$, m/z 243 ($121+121+1=243$). При утворенні ковалентного димеру – цистину – формування дисульфідного зв'язку супроводжується елімінуванням двох атомів водню $(2\text{Cys}-2\text{H})$ =цистин; протонування результуючого продукту дасть іон: $[(2\text{Cys}-2\text{H})\cdot\text{H}]^+$, m/z 241 ($242-2+1=241$). Такий пік у мас-спектрі позитивних іонів наявний (Рис. 3.2.2а), але він потрапляє до групи піків одного з фрагментів MB. У той же час у режимі негативних іонів молекулярний іон в

умовах ЛДІ формується шляхом депротонування: $[(2\text{Cys}-2\text{H}) - \text{H}]^-$, m/z 239 ($242-2-1=239$). І такий пік з m/z 239 у мас-спектрі негативних іонів (Рис. 3.2.26) присутній. Більш того, якщо нековалентний димер $[2\text{Cys}\cdot\text{H}]^+$ стабілізований електростатичним зв'язком з протоном, то відрив протону від димеру 2Cys дестабілізує структуру, і такий негативний іон не повинен реєструватися, що ми й бачимо у спектрі Рис. 3.2.26. Наведений аналіз мас-спектрів доводить формування цистину ($2\text{Cys}-2\text{H}$) як продукту редокс-реакції цистеїну з метиленовим синім.

Що стосується другого компоненту реакції, МВ, то він також підлягає редокс-перетворенням шляхом відновлення. На Рис. 3.2.3 показано збільшену ділянку мас-спектру позитивних іонів з Рис. 3.2.1, яка містить групу піків катіону МВ.

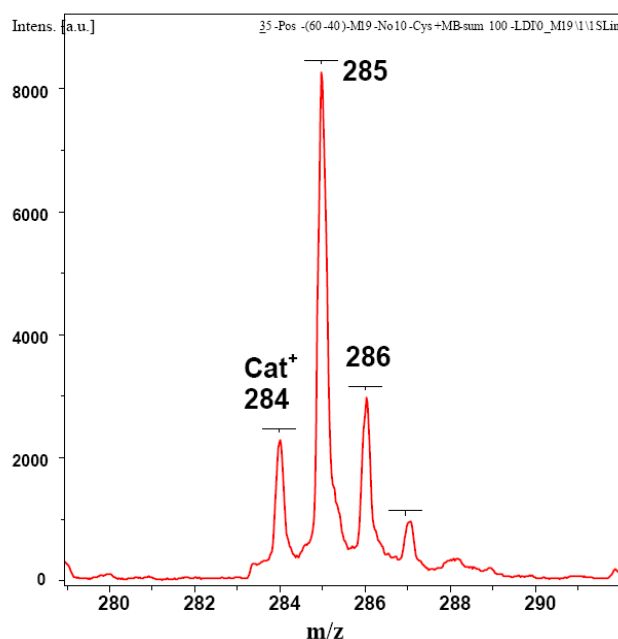


Рисунок 3.2.3. Збільшена ділянка оглядового мас-спектру ЛДІ позитивних іонів, яка містить групу піків катіону МВ. Розподіл піків відхиляється від розрахованого ізотопного розподілу катіону Cat^+ внаслідок його суперпозиції з розподілом для продукту відновлення $[\text{Cat} + \text{H}]^{+\bullet}$ (де перший моноізотопний пік з m/z 285).

Аналіз цього спектру показує, що ізотопний розподіл у цій групі піків відрізняється від розрахованого для Cat^+ (див. Рис. 3.1.16). Значно підвищується інтенсивність піку з m/z 285, який відповідає продукту відновлення катіону $[\text{Cat} + \text{H}]^{+\bullet}$ (див. аналіз літератури пункт 1.2, реакції (1)-(2)). Тобто при взаємодії з цистеїном МВ окислює пару амінокислот, а сам при цьому відновлюється. В зразку присутні і залишки МВ, який не провзаємодівав, і реєструється як інтактний катіон Cat^+ , m/z 284.

Таким чином у редокс-парі МВ та цистеїн, цистеїн підлягає окисненню, а МВ – відновленню, і результати цих процесів реєструються у мас-спектрі ЛДІ. Вірогідно, що такі процеси можуть реалізовуватися і у біологічних системах і відповідати за терапевтичну дію МВ, описану в літературі.

3.3. Системи з двома катіонними сполуками - метиленовим синім та декаметоксином

В рамках певних задач становить інтерес дослідити системи, в яких присутні дві органічні катіонні сполуки [44], у зв'язку з чим було виконано мас-спектрометричний аналіз бінарної системи, яка містила МВ та бісчетвертинну амонієву сполуку декаметоксин.

На Рис. 3.3.1 представлено оглядові мас-спектри та їх збільшені ділянки в діапазоні мас, який містить групу піків катіону МВ. За обраних умов, зокрема при потужності лазера 25% (Рис. 3.3.1а) сигнали, які б відповідали декаметоксину, не було зареєстровано. Ймовірно, його розпилення потребує більшої енергії, однак підвищення потужності лазера до 30% (Рис. 3.3.1б) призводило до значного погіршення роздільної здатності для сигналів МВ, тому одночасне отримання спектрів цих двох катіонних сполук становить певну проблему. Однак, що стосується МВ, підвищення інтенсивності піка з m/z 285 вище рівня, розрахованого для інтактного катіону, свідчить про часткове відновлення МВ у цій системі. Для наочного порівняння на Рис. 3.3.1в приведено ЛДІ мас-спектр МВ на графеновому

носії; для такої системи реєструється спектр катіону МВ з «правильним» (розрахунковим) ізотопним розподілом.

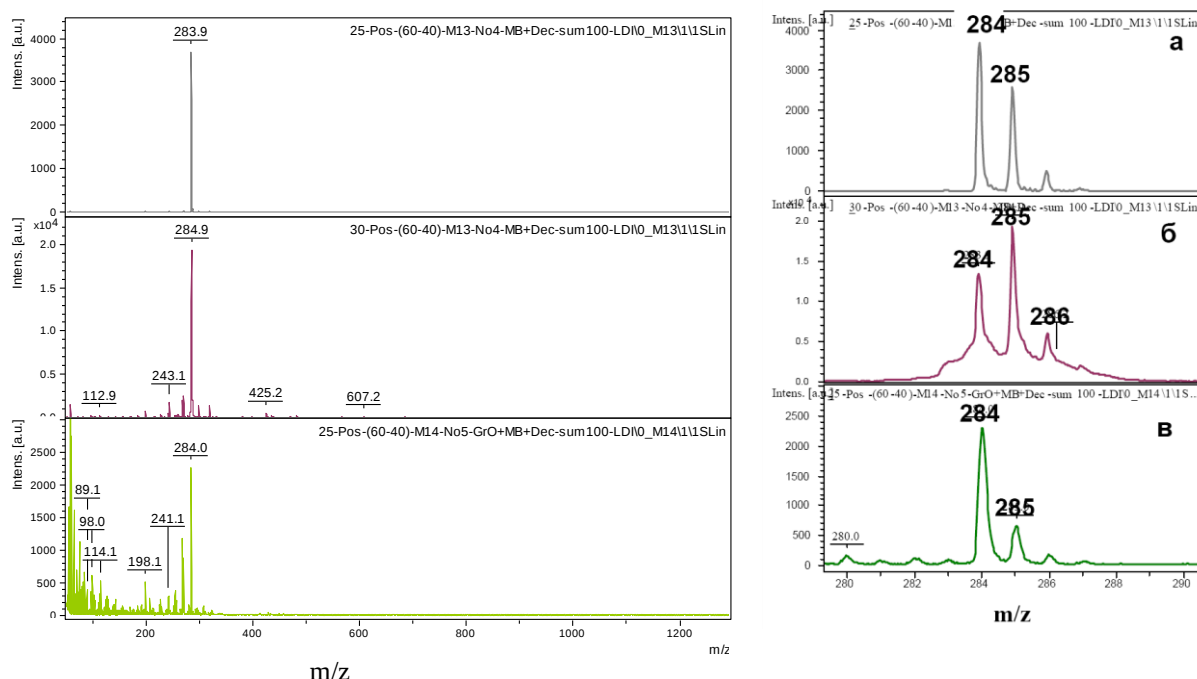


Рисунок 3.3.1. Оглядові ЛДІ мас-спектри позитивних іонів та їх збільшені ділянки, які містять групу піків катіону МВ: а – система (МВ + декаметоксин), потужність розпилюючого лазера 25%; б – той же зразок при потужності лазера 30%; в – для порівняння спектр катіону чистого МВ з відповідним ізотопним розподілом, отриманий з графенового носія.

У відповідності зі спостереженими раніше закономірностями (див. аналіз літератури, розділ 1.4) для протікання реакції відновлення МВ у системі повинен бути в агрегованій формі, принаймні у формі димерів. Тому на основі спостереження певної кількості відновленого МВ у ЛДІ мас-спектрах системи (МВ + декаметоксин) можна зробити попередній висновок, що у присутності іншої катіонної речовини МВ має схильність до агрегації. Це припущення потребує подальшої перевірки іншими методами.

Завдяки високій чутливості методу ЛДІ до катіонної сполуки МВ її аналіз методом ЛДІ не потребує застосування додаткових матриць.

3.4. Нанокompозити метиленового синього з дисульфідом молібдену (MoS_2)

У біофізичному відділі ФТІНТ НАН України проводяться роботи по створенню і дослідженню нанокompозитів біомолекул і біологічно активних речовин з наноматеріалами. Одним з представників таких перспективних двовимірних (2D) наноматеріалів є дихалькогенід перехідного металу молібдену – дисульфід молібдену MoS_2 . У комплексах з лікарськими речовинами MoS_2 розглядається у літературі як матеріал для цілеспрямованої доставки ліків (drug delivery) [45].

Нанокompозити отримують ультразвуковою обробкою водних сумішей кристалічного MoS_2 з біомолекулами, в результаті чого утворюються суспензії різної стійкості.

У рамках даної роботи стояла задача інтерпретації й аналізу ЛДІ мас-спектрів отриманого методом ультразвукової обробки нанокompозиту ($\text{MB} + \text{MoS}_2$). На Рис. 3.4.1 приведені оглядові мас-спектри ЛДІ, отримані у режимах позитивних (а) та негативних (б) іонів, а також збільшена ділянка спектру (с), яка містить групу піків катіону MB.

Мас-спектр ЛДІ негативних іонів (Рис. 3.4.1б) містить набір кластерів, які розпиляються лазером з нано-пластинок MoS_2 і складаються з атомів Mo, S, O у різних комбінаціях. Такі «відбитки пальців» MoS_2 цілком узгоджуються з даними роботи [45].

Мас-спектр позитивних іонів (Рис. 3.4.1а) дуже чистий, тобто не містить інших сигналів окрім катіону MB. Група піків катіону Cat^+ (Рис. 3.4.1с) реєструється з дуже доброю роздільною здатністю. Ізотопний розподіл у цій групі відповідає розрахованому для інтактного катіону. Вельми цікавим експериментальним фактом була реєстрація високого іонного струму, тобто значної – у порівнянні з багатьма іншими неіонними сполуками – інтенсивності піків Cat^+ . Цей факт можна пояснити високою

чутливістю десорбційних методів до «готових» катіонів, які утворюються при дисоціації солей.

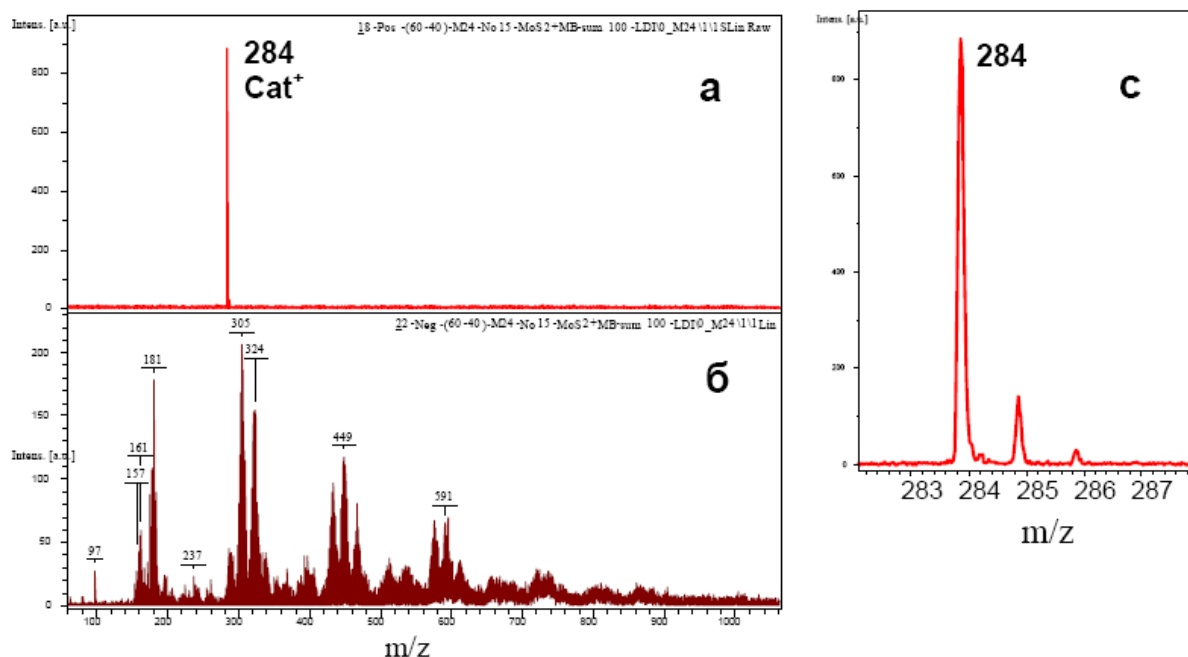


Рисунок 3.4.1. Мас-спектри ЛДІ нанокompозиту (MB + MoS₂): а – режим позитивних іонів; б – режим негативних іонів; с – збільшена ділянка, яка містить групу піків органічного катіону MB.

По відношенню до системи (MB + MoS₂) можна також висловити наступне припущення. Оскільки електронегативні атоми сірки на поверхні MoS₂ несуть частковий негативний заряд, катіон MB під час адсорбції на поверхні втрачає свій аніон Cl⁻, замішуючи його атомами сірки у складі дисульфиду. Розрив таких слабких зв'язків катіону з поверхнею полегшує його десорбцію під впливом лазерного імпульсу. Завдяки цьому MoS₂ можна розглядати як неорганічну матрицю для МАЛДІ.

З точки зору проблеми “drug delivery” відносно легке вивільнення інтактного катіону MB⁺ з поверхні MoS₂ як носія є позитивною характеристикою нанокompозиту і MoS₂ як платформи для спрямованої доставки ліків.

3.5. Взаємодія метиленового синього з оксидом графену

Після активного використання МВ так чи інакше потрапляє до побутових і промислових відходів або до стічних вод. Тому актуальним залишається пошук ефективних методів очистки води від МВ (як і від інших видів катіонних барвників). Завдяки розвитку нанотехнологій у якості сорбентів проходять випробування вуглецеві наноматеріали, зокрема оксид графену (ГО), (graphene oxide, GO). В роботі [45] спектральним методом досліджувалась залежність характеристик адсорбції катіонів МВ на поверхні пластинок ГО від співвідношення МВ до ГО.

Було встановлено, що у високих концентраціях МВ формує з ГО темні пластинки, які випадають з водної колоїдної дисперсії ГО в осад внаслідок нейтралізації частково негативно зарядженого ГО катіонами МВ (нейтральні комплекси втрачають розчинність у воді). При низьких концентраціях МВ, його кількості недостатньо для повної нейтралізації ГО, завдяки чому розчин залишається у формі суспензії і не розшаровується.

Становить інтерес спробувати знайти відмінності у взаємодіях МВ з ГО для цих двох крайніх випадків за допомогою ЛДІ мас-спектрометрії. На Рис. 3.5.1 показані ЛДІ мас-спектри позитивних та негативних іонів висушених зразків з осадом (Рис. 3.5.1 а,б) та з суспензією (Рис. 3.5.1 в,г). В режимі позитивних іонів для обох зразків реєструється група піків в районі m/z 284, тобто катіона МВ та менш інтенсивні піки, які можуть відповідати продуктам фрагментації. В режимі негативних іонів в діапазоні менших мас реєструється серія піків з різницею в 12 а.о.м., m/z 60, 72, 84, 96, 108, 120, які відповідають оксиду графена. Також наявні малоінтенсивні піки з m/z 283.

Для перевірки можливості протікання редокс-процесів було проаналізовано збільшену ділянку масового діапазону, в який потрапляє катіон (Рис. 3.5.2).

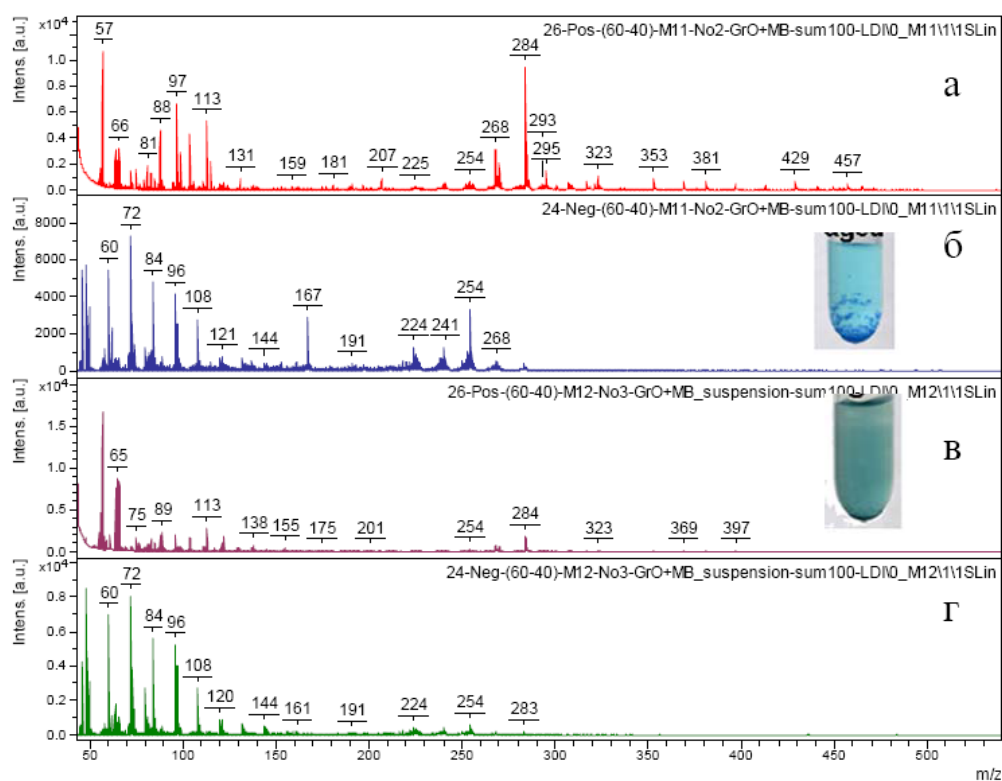


Рисунок 3.5.1. ЛДІ мас-спектри системи (МВ + ГО), отримані з висушених водних колоїдних розчинів з осадом (а, б) та з суспензією (в, г) в режимах позитивних (а, в) та негативних (б, г) іонів.

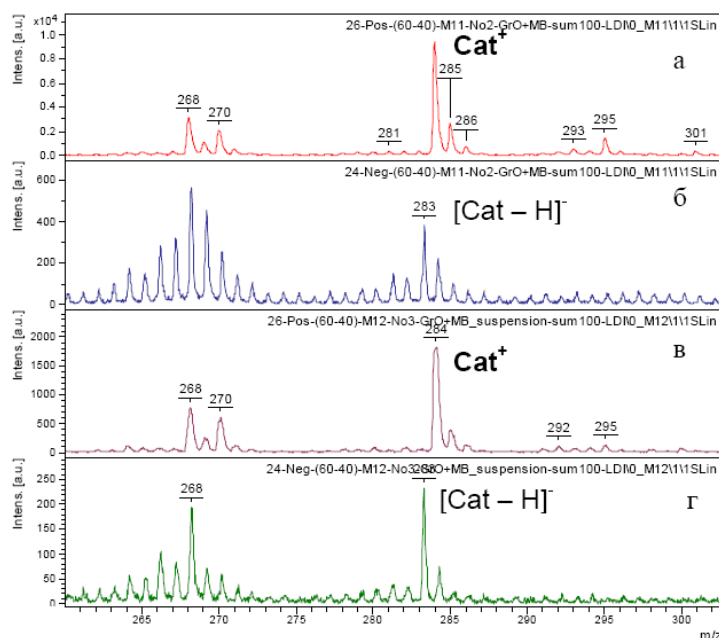


Рисунок 3.5.2. Збільшені ділянки ЛДІ мас-спектрів (з Рис. 3.5.1) системи (МВ + ГО); висушені зразки з осадом (а, б) та з суспензією (в, г) в режимах позитивних (а, в) та негативних (б, г) іонів.

Аналіз спектрів показує практичну відсутність відмінностей у вигляді групи піків катіону MB для обох систем. Ізотопний розподіл відповідає інтактному катіону MB, редокс-перетворення відсутні. Можна припустити, що в обох випадках адсорбція катіонів MB на частково негативно зарядженій поверхні ГО перешкоджає реалізації редокс-реакцій між катіонами MB. Відсутність суттєвої різниці у спектрах двох зразків також наводить на думку, що при висушуванні колоїдних розчинів з різною концентрацією компонентів суха тверда фаза, що утворюється, в обох випадках має близьку структуру, а різниця, характерна для розчинів, втрачається.

Таким чином, при адсорбції катіонів MB на поверхні наноматеріалів, які мають частковий негативний заряд, реакції відновлення MB не відбуваються.

Менш ефективне вивільнення MB з наноматеріалу оксиду графену при ЛДІ свідчить про його більш міцне зв'язування з ОГ у порівнянні з MoS₂. розпилення MB з якого потребувало меншої потужності лазера. Така характеристика позитивна в плані використання оксиду графену як сорбенту для очистки води.

Цікаво, що в режимі негативних іонів реєструються малоінтенсивні піки з m/z 283, яким формально відповідає формула $[Cat - H]^{\bullet-}$. Механізм його утворення потребує подальших досліджень.

Набори кластерів, які характеризують оксид графену, також як і MoS₂, спостерігаються при ЛДІ у режимі негативних іонів завдяки наявності у структурі цих речовин електронегативних атомів та кисню та сірки, відповідно.

Інформація стосовно мас-спектрів систем, які містять MB і ГО може становити інтерес для подальшої розробки наноматеріалів для очистки стічних вод від барвників.

ВИСНОВКИ

В результаті виконаних досліджень вирішено молекулярно-біофізичну задачу встановлення молекулярних механізмів взаємодії біологічно активного катіонного барвника метиленового синього з низкою біомолекул та наноматеріалів з використанням потенціалу методу мас-спектрометрії з ЛДІ. Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити наступні висновки:

1. Різні типи міжмолекулярних взаємодій метиленового синього з різними матеріалами відбиваються у певних характеристиках їх ЛДІ мас-спектрів: при реалізації редокс-процесів реєструються продукти окиснення-відновлення з масами, які відрізняються від мас вихідних компонентів, а при електростатичній адсорбції на наноматеріалах реєструються катіони у незмінному вигляді.

2. Взаємодія метиленового синього з амінокислотою цистеїном в модельній системі полягає у редокс-процесі, в результаті якого цистеїн окислюється з утворенням димеру, зв'язаного дисульфідним містком – цистину, а метиленовий синій відновлюється, про що свідчить реєстрація відповідних продуктів у мас-спектрах.

3. В бінарній системі метиленовий синій-декаметоксин також відбувається часткове відновлення метиленового синього.

4. Взаємодія метиленового синього з 2D наноматеріалом дисульфідом молібдену MoS_2 відбувається шляхом електростатичних взаємодій катіонів барвника з частково негативно зарядженою поверхнею MoS_2 , що полегшує вивільнення катіонів під впливом лазерного опромінення при ЛДІ. Процес відновлення метиленового синього не спостерігається. Виявлений ефект вказує на можливість використання MoS_2 як носія для доставки ліків, подібних до метиленового синього.

5. Взаємодія катіонів метиленового синього з наноматеріалом оксидом графену також відбувається шляхом електростатичних взаємодій з частково негативною поверхнею наноматеріалу, однак менш ефективно вивільнення метиленового синього з наноматеріалу оксиду графену при ЛДІ свідчить про більш міцне зв'язування у порівнянні з MoS_2 . Така характеристика позитивна в плані використання оксиду графену як сорбенту для очистки води.

6. Набори кластерів, які характеризують обидва наноматеріали – MoS_2 та оксид графену – спостерігаються при ЛДІ у режимі негативних іонів завдяки наявності у структурі цих речовин електронегативних атомів сірки та кисню, відповідно.

7. Отримані результати можуть використовуватися при подальших пошуках фармакологічних застосувань метиленового синього, при розробці сорбентів на основі наноматеріалів для очистки води та для удосконалення мас-спектрометричної методики з лазерною десорбцією/іонізацією.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Morris HR, Panico M, Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler A (1981). "Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (2): 623–31. doi:10.1016/0006-291X(81)91304-8. PMID 7306100.

2. Barber, Michael; Bordoli, Robert S.; Elliott, Gerard J.; Sedgwick, R. Donald; Tyler, Andrew N. (1982). "Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*. 54 (4): 645A–657A. doi:10.1021/ac00241a817. ISSN 0003-2700.

3. Barber M, Bordoli RS, Sedgewick RD, Tyler AN (1981). "Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (7): 325–327. doi:10.1039/C39810000325.

4. Hillenkamp, Franz; Karas, Michael; Beavis, Ronald C.; Chait, Brian T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers // *Analytical Chemistry*. 63 (24):1991. 1193A-1203A. doi:10.1021/ac00024a002. ISSN 0003-2700. PMID 1789447.

5. Karas, Michael; Krüger, Ralf (2003). "Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism". *Chemical Reviews*. 103 (2): 427–440. doi:10.1021/cr010376a. ISSN 0009-2665. PMID 12580637.

6. R. H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt and E. Mandelkow, *Neurobiol. Aging*, 2011, 32, 2325.

7. J. M'orian, J. Gravier, F. Navarro and I. Texier, *Molecules*, 2012, 17, 5564–5591.

8. X. Wu, T. Ying and K. Sun, *J. Shanghai Univ.*, 1998, 2, 156–163.

9. D. Gabrielli, E. Belisle, D. Severino, A. J. Kowaltowski and M. S. Baptista, *Photochem. Photobiol.*, 2004, 79, 227–232.
10. K. M. Gangotri and C. Lal, *Energy Sources*, 2001, 23, 267–273.
11. D. J. Burinsky, R. L. Dilliplane, G. C. DiDonato and K. L. Busch, *Org. Mass Spectrom.*, 1988, 23, 231–235.
12. G. Pelzer, E. De Pauw, V. D. Dao and J. Marient, *J. Phys. Chem.*, 1984, 88, 5065–5068.
13. S. Okuno, M. Nakano, G. E. Matsubayashi, R. Arakawa and Y. Wada, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 2811–2817.
14. D. Asakawa and K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom.*, 2009, 44, 461–465.
15. *New Guide to Medicine and Drugs: The Complete Home Reference to Over 3,000 Medicines* (11th edition). Dorling Kindersley, 2021. – 520 p.
16. Brown T. E., LeMay H., Bursten B., Murphy C., Woodward P., et al. *Laboratory Experiments for Chemistry: The Central Science S.* (14th Edition). Pearson Education Limited, 2017. – 752 p.
17. Ohlow M.J. Foundation review: Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure / M.J. Ohlow, B. Moosmann // *Drug Discovery Today*. – 2011. – V. 16, № 3–4. – P. 119-131.
18. Wainwright M. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs / M. Wainwright, L. Amaral // *Trop. Med. Int. Health*. – 2005. – V. 10, № 6. – P. 501–511.
19. Bistas E., Sanghavi D.K. Methylene Blue. StatPearlsPublishing [Internet] - Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557593/>

Methylene Blue. Last access: 2023. – Title from the screen.

20. Methylene blue. From Wikipedia, the free encyclopedia [Electronic resource] - Mode of access: http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue. Last access: 2023. – Title from the screen.

21. Harmann C. Electrochemistry / C. Harmann, A. Hamnett, W. Vielstich. – Weinheim : Wiley, 2007. – 550 p.

22. Hulanicki A. Redox indicators. Characteristics and applications / A. Hulanicki, S. Glab // Pure Appl. Chem. – 1978. – V. 50, № 5. – P. 463–498.

23. Krushna Kumar Jilariya, Yogesh Sanghani. Handbook of chemistry lab reagent: Reagent preparation & safety precaution guide. Scholars' Press, 2017. - 100 p.

24. The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode / H.X. Ju, J. Zhou, C.X. Cai H.Y. Chen // Electroanalysis. - 1995. –V. 7, No 2. – P. 1165–1170.

25. Ferapontova E.E. Electrochemical indicators for DNA electroanalysis // Curr. Analyt. Chem. – 2011. – V. 7, № 1. – P. 51–62.

26. M. Okuda, T. Kowata, Y. Usui, M. Koizumi. Studies on the radical species in solid methylene blue as revealed from the ESR spectra // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1968. – V. 41, № 10. – P. 2274–2280.

27. Engerer S.C. The Blue Bottle Reaction as a general chemistry experiment on reaction mechanisms / S.C. Engerer, A.G. Cook // J. Chem. Educ. – 1999. – V. 76, No 11. – P. 1519.

28. What is happening when the blue bottle bleaches: an investigation of the methylene blue-catalyzed air oxidation of glucose / L. Anderson, S. Wittkopp, C. Painter [et al.] // J. Chem. Educ. – 2012. – V. 89, No 11. – P. 1425–1431.

29. PubChem. Open Chemistry Database. Leucomethylene blue. [Electronic resource] // U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information's web site - Mode of access:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/164695#section=Top>. Last access: 2015. – Title from the screen.

30. Determination of methylene blue residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J. Xu, L. Dai, B. Wu [et al.] // J. Sep. Sci. – 2009. – V. 32, No 23-24. – P. 4193–4199.

31. Пат. 2013/0315992 A1 CIIA, MKI C07D 279/20. Phenothiazine diaminium salts and their use: Пат. 2013/0315992 A1 CIIA, MKI C07D 279/20 / S.Clunas (GB) et al.; Wista Laboratories Ltd. – No 13/984841; заяв. 15.08.2011; опубл. 28.11.2013; HKI 424/464. – 67 с. / Pat. 2013/0315992 A1 SShA, MKI C07D 279/20. Phenothiazine diaminium salts and their use: Pat. 2013/0315992 A1 SShA, MKI C07D 279/20 / S.Clunas (GB) et al.; Wista Laboratories Ltd. – No 13/984841; zayav. 15.08.2011; opubl. 28.11.2013; NKI 424/464. – 67 s.

32. The PubChem Compound Database. [Electronic resource] // U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information's web site - Mode of access:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?cmd=Link&LinkName=pccompound_pccompound_mixture&from_uid=164695 Last access: 2015. – Title from the screen.

33. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(II)–halide species in acidic aqueous media / O. Impert, A. Katafias, P. Kita, [et al.] // Dalton Trans. – 2003, – № 3. – P. 348-353.

34. de Tacconi N.R. Reversibility of photoelectrochromism at the TiO₂/Methylene Blue interface / N.R. de Tacconi, J. Carmona, K. Rajeshwar // J. Electrochem. Soc. – 1994. – V. 144, № 7. – P. 2486–2490.

35. Obata H. Photoreduction of methylene blue by visible light in the aqueous solution containing certain kinds of inorganic salts. II. Photobleached product / H. Obata // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1961. – V. 34. – P. 1057–1063.

36. Mills A. Photobleaching of methylene blue sensitised by TiO₂: an ambiguous system / A. Mills, J. Wang // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. – 1999. – V. 127, № 1-3. – P. 123–134.

37. Burinsky D.J., Dilliplane R.L., DiDonato G.C., Busch K.L. Reduction of methylene blue during the ionization process / D.J. Burinsky, R.L. Dilliplane, G.C. DiDonato, K.L. Busch // Org. Mass Spectrom. – 1988. – V. 23, N 4. – P. 231–235.

39. Tau agregation inhibitor therapy: An exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease / C.M. Wischik, R.T. Staff, D.J. Wischik [et al.] // J. Alzheimer's Dis. – 2015. – V. 44, N 2. – P. 705–720.

40. Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau / K. Hochgräfe, A. Sydow, D. Matenia [et al.] // Acta Neuropathol. Commun. – 2015. – V. 3. – Article ID 25, 22 p.

41. Shelkovsky V.S., Kosevich M.V., Boryak O.A., Chagovets V.V., Shmigol I.V., Pokrovskiy V.A. Monomer/dimer dependent modulation of reduction of the cationic dye methylene blue in negatively charged nanolayers as revealed by mass spectrometry // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4, N 104. – P. 60260-60269. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4ra09592h>

42. Kosevich M.V., Boryak O.A., Chagovets V.V., Shelkovsky V.S., Pokrovskiy V.A. Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: Mass spectrometric diagnostics // *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications* / Ed. by V.A. Karachevtsev. – Singapore: Pan Stanford, 2016. – P. 193–234.

<https://www.taylorfrancis.com/books/9789814613972/chapters/10.1201/b20480-9>
DOI: 10.1201/b20480-8

43. Chagovets V.V., Kosevich M.V., Stepanian S.G., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Leontiev V.S., Pokrovskiy V.A., Adamowicz L., Karachevtsev V.A. Noncovalent interaction of methylene blue with carbon nanotubes: theoretical and mass spectrometry characterization // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2012. – Vol. 116, N 38. – P. 20579–20590.

DOI: <https://doi.org/10.1021/jp306333c>

44. Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Kosevich M.V., Plokhotnichenko A.M., Orlov V.V., Karachevtsev V.A. Binding of two cationic compounds with graphene oxide: comparative analysis and observation of synergetic effect // *Functional Materials*, 2021, V. 28, N3, P. 450-462 <https://doi.org/10.15407/fm28.03.450>

45. Xue J, Liu H, Chen S, Xiong C, Zhan L, Sun J, Nie Z. Mass spectrometry imaging of the in situ drug release from nanocarriers. *Sci Adv*. 2018 Oct 31;4(10):eaat9039. doi: 10.1126/sciadv.aat9039

ПОДЯКИ:

Автор висловлює подяку Центру колективного користування науковими приладами «Мас-спектрометрія і рідинна хроматографія» НАН України (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України, Київ) за можливість отримання мас-спектрів в режимі лазерної десорбції/іонізації; Харківському національному університету імені В. Н. Каразіна та педагогічному колективу Факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем за високий професіоналізм, підтримку та ентузіазм під час всього періоду навчання.