

## Аминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub> ведут себя как липофильные ионы, проникающие через биологические мембраны

© И.М. Андреев, В.С. Романова\*, А.О. Петрухина\*, С.М. Андреев\*\*

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,  
Москва, Россия

\* Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук,  
117813 Москва, Россия

\*\* Государственный научный центр "Институт иммунологии",  
Москва, Россия

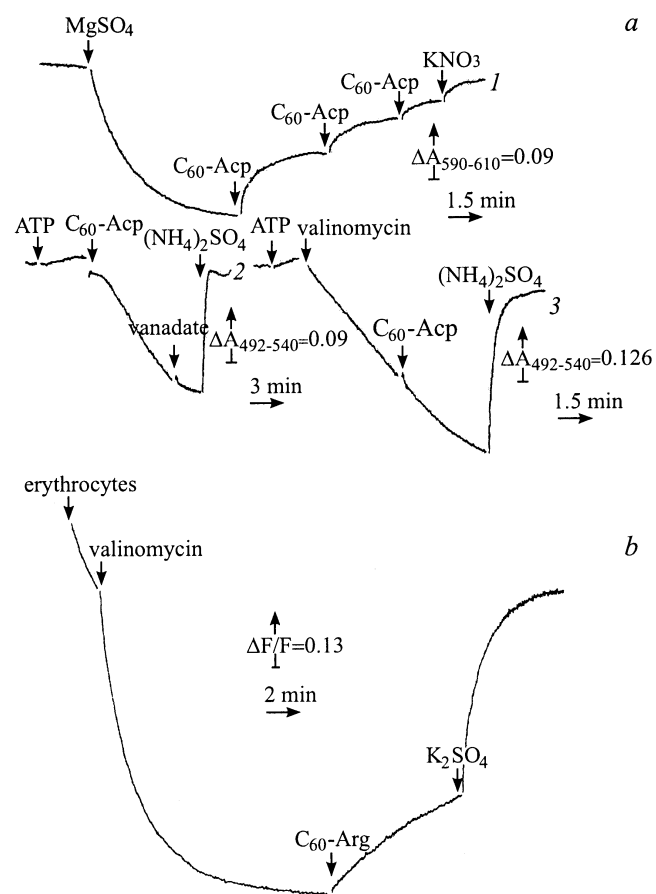
С помощью потенциалчувствительных зондов установлено, что водорастворимые аминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub> — C<sub>60</sub>-Pго, C<sub>60</sub>-ε-аминокапроновая кислота и C<sub>60</sub>-Arg обладают выраженной мембранотропной активностью. Первые два производных вызывали концентрационно-зависимую диссипацию мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) симбиосом клубеньков люпина желтого, генерированного в присутствии АТФ и ионов Mg<sup>2+</sup>. В отличие от первых двух производных C<sub>60</sub>-Arg, несущий сильный позитивный заряд при физиологическом рН, не оказывал влияние на диссипацию  $\Delta\psi$  в указанной модели. И напротив, данное производное вызывало заметную диссипацию K<sup>+</sup>-диффузионного потенциала ("минус" внутри), генерированного на мембране эритроцитов человека с помощью K<sup>+</sup>-ионофора валиномицина. Полученные закономерности свидетельствуют, что C<sub>60</sub>-соединения транспортируются через биологические мембраны как липофильные ионы, вызывая тем самым их деполяризацию.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 00-04-48317а).

В настоящее время бурно развивается химия и физика углеродных кластеров (фуллерены и углеродные нанотрубы), что обусловлено перспективами их применения в нанотехнологии и микроэлектронике. Исследования биологии фуллеренов пока только начинаются, и здесь еще не найдены области эффективного приложения, но поисковые исследования активно ведутся во многих странах. К настоящему времени обнаружен ряд биологических эффектов у водорастворимых производных C<sub>60</sub>. Изучение фармакокинетики показало, что они обладают очень низкой токсичностью и способны выводиться из организма с приемлемой скоростью. Как оказалось, некоторые из них обладают хемотактическими, антиоксидантными свойствами, проявляют антивирусную активность, в частности, ингибируют протеазу ВИЧ, встраиваясь в активный центр фермента. При облучении в присутствии кислорода соединения фуллерена способны разрывать цепь ДНК, оказывая цитотоксический эффект на опухолевые клетки. Очень перспективными, особенно в радиомедицине, считаются производные металлофуллеренов, содержащие атом металла внутри молекулы; при этом они более стабильны, чем используемые хелатные комплексы. В настоящее время установлено, что сам фуллерен не обладает ни цито-, ни генотоксичностью.

Возможное использование производных фуллерена в биологии и медицине потребует доставки их к тем или иным клеточным мишеням. В этой связи важную роль играют мембранотропные свойства таких соединений, а именно их способность проникать через биологические мембраны. В литературе имеются некоторые сообщения на эту тему [1,2], однако по существу указанные свойства фуллеренов остаются мало исследованными.

В настоящей работе, проведенной на препаратах азотфиксирующих единиц, изолированных из корневых клубеньков люпина желтого [3], и на эритроцитах человека, мы исследовали мембранотропные свойства трех аминокислотных производных фуллерена, C<sub>60</sub>-Асп, C<sub>60</sub>-Pго и C<sub>60</sub>-Arg. Указанные производные были синтезированы методом, опубликованным ранее [4], они обладали достаточно высокой растворимостью в водных растворах и биологической активностью [5,6]. Принимая во внимание величину  $pK_a$  протон-акцепторных групп аминокислотных остатков в этих конъюгатах, представляется весьма вероятным, что первые два соединения в диапазоне физиологических рН представляют собой анионы, тогда как C<sub>60</sub>-Arg несет, напротив, положительный заряд. Упомянутые выше изолированные азотфиксирующие единицы, известные как симбиосомы, были использованы в настоящей работе для изучения мембранотропных свойств выбранных соединений, поскольку они способны легко генерировать на их наружной, так называемой перибактероидной мембране (ПБМ), мембранный потенциал ( $\Delta\psi$ ) ("плюс" на внутренней поверхности мембраны) в присутствии АТФ и ионов Mg<sup>2+</sup> в инкубационной смеси благодаря функционированию в этой мембране электрогенной H<sup>+</sup>-АТФ-азы [3]. Кинетика MgАТФ-зависимой генерации  $\Delta\psi$  на ПБМ симбиосом, регистрируемая с помощью потенциалчувствительного зонда оксонола VI [7], показана на рисунке (b, кривая 1). Можно видеть, что после достижения стационарного уровня  $\Delta\psi$  на ПБМ добавление к симбиосомам C<sub>60</sub>-Асп инициирует относительно быструю разрядку мембранного потенциала, и этот эффект усиливается с увеличением концентрации вносимого производного фуллерена. Со-



a) 1 — кинетика MgATФ-зависимой генерации мембранного потенциала на ПБМ симбиосом люпина желтого и его диссипация в присутствии C<sub>60</sub>-Асп. Симбиосомы инкубировали в среде, содержащей 0.4 М сорбита, 20 мМ НЕРЕС-ВТР (pH 7.0), 1 мМ АТФ и 1 μМ оксонол VI. Стрелки указывают моменты добавления 3 мМ MgSO<sub>4</sub>, 130 μМ C<sub>60</sub>-Асп и 20 мМ KNO<sub>3</sub>. 2 — кинетика MgATФ-зависимого закисления перибактероидного пространства симбиосом, инициируемого добавлением к ним 50 μМ C<sub>60</sub>-Асп. Инкубационная среда имела тот же состав, что и в случае 1, но содержала 3 мМ MgSO<sub>4</sub> и 12 μМ акридинового оранжевого вместо АТФ и оксонола VI соответственно. Стрелки указывают моменты добавления 1 мМ АТФ, 50 μМ C<sub>60</sub>-Асп, 200 μМ ванадата натрия и 5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 3 — кинетика Mg-АТФ-зависимого закисления перибактероидного пространства симбиосом, находящихся в той же среде, но в присутствии 1 μМ валиномицина. Стрелки указывают моменты добавления 1 мМ АТФ и 50 μМ C<sub>60</sub>-Асп. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Hitachi 557 в двухволновом режиме работы прибора (590–610 и 492–540 nm для оксонола VI и акридинового оранжевого соответственно). b) Кинетика генерации K<sup>+</sup>-диффузионного потенциала на мембране эритроцитов человека, инициируемая добавлением к ним валиномицина, и его диссипация в присутствии C<sub>60</sub>-Арг. Эритроциты инкубировали в среде, содержащей 0.48 М сорбит, 20 мМ НЕРЕС-ВТР (pH 7.6), 3 мМ MgSO<sub>4</sub> и 1 μМ diS-C<sub>3</sub>-(5). Стрелки указывают моменты добавления 1 μМ валиномицина, 300 μМ C<sub>60</sub>-Арг и 25 мМ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измерения флуоресценции потенциалчувствительного зонда diS-C<sub>3</sub>-(5) проводили при 670 nm на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi 850  $\lambda_{exc} = 622$  nm.

гласно нашим наблюдениям подобное деполаризующее действие обнаруживает и другое аминокислотное производное фуллерена, C<sub>60</sub>-Pro, вероятно, также несущее отрицательный заряд в физиологическом диапазоне pH (данные не приведены). Обнаруженное влияние C<sub>60</sub>-Асп и C<sub>60</sub>-Pro на величину мембранного потенциала дает основание предположить, что выбранные соединения ведут себя как липофильные анионы, способные проникать через ПБМ симбиосом. Справедливость этого предположения подтверждается результатами других экспериментов, в которых с помощью ΔpH индикатора акридинового оранжевого [8] мы следили за кинетикой MgATФ-зависимого закисления перибактероидного пространства симбиосом. Представленные на рисунке данные показывают, что C<sub>60</sub>-Асп, добавленный в инкубационную смесь, содержащую АТФ и ионы Mg<sup>2+</sup>, инициирует этот процесс (кривая 2), но вместе с тем оставляет его кинетику неизменной (кривая 3), когда он запускается с помощью K<sup>+</sup>-ионофора валиномицина, катализирующего выход из симбиосом ионов K<sup>+</sup> и тем самым обеспечивающего диссипацию MgATФ-индуцируемого мембранного потенциала на ПБМ. Эти результаты позволяют заключить, что C<sub>60</sub>-Асп и C<sub>60</sub>-Pro транспортируются через симбиосомальную мембрану как липофильные анионы и вызывают тем самым диссипацию Δψ и благодаря этому стимулируют MgATФ-зависимое формирование ΔpH на ПБМ. Более того, последний эффект, вызываемый рассматриваемыми производными фуллерена, говорит о том, что снятие в их присутствии мембранного потенциала на симбиосомальной мембране связано не с подавлением в ней активности протонного насоса, а всецело обусловлено их способностью проникать в форме анионов через гидрофобный барьер данной мембраны. Существенно также отметить, что добавление к симбиосомам C<sub>60</sub>-Арг вместо C<sub>60</sub>-Асп или C<sub>60</sub>-Pro практически оставляло неизменной кинетику процессов генерации Δψ или ΔpH на ПБМ (данные не приведены).

На основании приведенных выше данных следует ожидать, что проницаемость биологических мембран для C<sub>60</sub>-Арг должна отражаться в диссипации этим соединением мембранного потенциала другой полярности. Такая гипотеза была апробирована нами в другой серии экспериментов, выполненных на эритроцитах человека с использованием потенциалчувствительного зонда diS-C<sub>3</sub>-(5) [9]. Как показано на рисунке (часть b), внесение в суспензию эритроцитов в бескальциевой среде валиномицина инициирует генерацию на их мембране K<sup>+</sup>-диффузионного потенциала ("минус" внутри эритроцитов) за счет выхода из клеток ионов K<sup>+</sup>, что отражается в снижении флуоресценции этого красителя. Однако временной ход последней постепенно обращался после добавления к эритроцитам C<sub>60</sub>-Арг и начальная скорость этой ответной реакции возрастала с ростом концентрации данного соединения (данные не приведены). Очень быстрое восстановление исходного уровня флуоресценции красителя наблюдалось после последующего внесения в инкубационную смесь сульфата калия

из-за существенного снижения в этих условиях величины трансмембранного градиента ионов  $K^+$  на эритроцитарной мембране. Напротив, кинетика генерации на ней  $K^+$ -диффузионного потенциала не изменялась после добавления к эритроцитам  $C_{60}$ -Аср и  $C_{60}$ -Про — отрицательно заряженных, как мы полагаем, аминокислотных производных фуллерена при выбранных значениях рН (данные не приведены).

В целом, результаты проведенных экспериментов позволяют сделать общий вывод о том, что использованные в настоящей работе аминокислотные производные фуллерена способны проникать в своей ионизированной форме через биологические мембраны и тем самым вызывать их деполяризацию.

## Список литературы

- [1] R.A. Kotelnikova, A.I. Kotelnikov, G.N. Bogdanov, V.S. Romanova, E.F. Kuleshova, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin. *FEBS Lett.* **389**, 111 (1996).
- [2] R.V. Besanson, E. Bienvenue, M. Delinger, S. Leach, P. Seta. *J. Phys. Chem.* **98**, 3 492 (1994).
- [3] I. Andreev, P. Dubrovo, V. Krylova, I.N. Andreeva, V. Koren'kov, E.M. Sorokin, S.F. Izmailov. *J. Plant Physiol.* **151**, 563 (1997).
- [4] В.С. Романова, В.А. Цыряпкин, Ю.А. Ляховецкий, З.Н. Парнес, М.Е. Вольпин. *Изв. РАН. Сер. хим.* **43**, 1 151 (1994).
- [5] М.Е. Вольпин, З.Н. Парнес, В.С. Романова. *Изв. РАН. Сер. хим.* **5**, 1 050 (1998).
- [6] M.E. Vol'pin, E.M. Blavtseva, V.S. Romanova, A.I. Lapshin, L.I. Aref'eva, Z.N. Parnes. *Mendeleev Commun.* 129 (1995).
- [7] H.-J. Apell, B. Bersch. *Biochim. Biophys. Acta* **903**, 480 (1987).
- [8] M.G. Palmgren. *Anal. Biochem.* **192**, 316 (1991).
- [9] P.J. Sims, A.S. Waggoner, C.-H. Wang, J.F. Hoffman. *Biochemistry* **13**, 3 315 (1974).