

УДК 544.72:544.77:547.963.32

## СТРОЕНИЕ ГИДРАТНОГО СЛОЯ ПОВЕРХНОСТИ КОМПОЗИТНЫХ СИСТЕМ SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox) И SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox)/ФУЛЛЕРЕН C<sub>60</sub>

В.В. Туров<sup>1\*</sup>, А.П. Угнивенко<sup>1</sup>, В.Н. Барвинченко<sup>1</sup>, Т.В. Крупская<sup>1</sup>,  
С.В. Чехун<sup>2</sup>, Ю.И. Прилуцкий<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова 17, Киев 03164, Украина

<sup>2</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины  
ул. Васильковская 45, Киев 03022, Украина

<sup>3</sup> Киевский Национальный университет имени Тараса Шевченко, ННЦ "Институт биологии"  
ул. Владимирская 64, Киев 01033, Украина

Методом низкотемпературной <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии изучено строение гидратного покрова композитов SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox) и SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox)/C<sub>60</sub> в среде неполярного органического растворителя CCl<sub>4</sub>. Для кластеров сильноассоциированной межфазной воды получены распределения по радиусам и изменения свободной энергии Гиббса, обусловленным адсорбционными взаимодействиями с поверхностью частиц. Показано, что гидратные свойства таких композитов отличаются от гидратных свойств твердых частиц ДНК и композитов SiO<sub>2</sub>/ДНК строением кластеров слабоассоциированной воды. Установлено, что при введении дополнительных порций воды в дисперсионную среду (CCl<sub>4</sub>) вблизи межфазных границ формируются субмикронные кластеры сильноассоциированной воды, существующие продолжительное время и способные существенно влиять на соотношение концентраций сильно- и слабоассоциированной воды.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания остаются одной из главных причин преждевременной смертности населения в большинстве стран мира. Это стимулирует создание новых эффективных лекарственных препаратов, способных селективно подавлять рост/пролиферацию опухолевых клеток. Одним из таких препаратов является антибиотик антрациклинового ряда доксорубин (Dox), (8S-цис)-10-(3-амино-2,3,6-тридезоксид-альфа-L-ликсогексо-пиранозил)окси-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион (ИЮПАК) [1–3]. Он плохо растворим в воде и слабополярных органических растворителях. Тем не менее, Dox способен образовывать с молекулами ДНК соединения включения, что и определяет механизм его воздействия на раковые клетки. Интеркалирование ДНК молекулами Dox (внедрения между смежными парами комплементарных нуклеотидов) нарушает способность раковых клеток к воспроизведению ге-

нетической информации. Однако Dox способен оказывать на организм побочное патологическое действие, проявляющееся, прежде всего, в негативном влиянии на работу сердца [2, 4]. Поэтому во многих научных центрах проводится активный поиск способов уменьшения терапевтических доз при использовании этого препарата.

Для лечения опухолей, локализованных на коже или в непосредственной близости от кожного покрова, перспективным способом может стать его трансдермальное введение. При этом необходимо создать композитную систему, которая позволит программируемо высвободить активное вещество в течение достаточно длительного времени, обеспечивая высокую концентрацию Dox в зоне поражения при минимальной его концентрации вне этой зоны. Одной из главных проблем при конструировании таких композитов может стать сильная сольватация Dox полярными компонентами (такими как ДМСО), добавляемыми к системе для повышения проницаемости клеточных мембран кожного покрова, и слабое

\* контактный автор v\_turov@ukr.net

взаимодействие с большинством типов оксидных адсорбентов. В работе [5] было высказано предположение о возможности использования для повышения прочности связывания Dox с адсорбентами биополимерных коадсорбатов, роль которых играют молекулы полинуклеотидов. Тогда в качестве одной из функционализированных композитных систем может рассматриваться высокодисперсный кремнезем (ВДК), в котором адсорбционное закрепление Dox осуществляется за счет его интеркалирования в структуру молекул ДНК. Было также показано, что как сама ДНК, так и ее адсорбционные комплексы с кремнеземом в слабополярной органической среде проявляют способность структурировать воду таким образом, что в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР фиксируются несколько сигналов воды. Эти сигналы отвечают формированию на межфазной границе кластеров воды с разным средним числом водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды, или воды, связанной с разными активными центрами молекул ДНК. Строение граничного слоя воды в композите  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  может существенно изменяться при введении в поверхностный слой частиц фуллерена  $\text{C}_{60}$  (Full), поверхность которых сформирована  $\text{sp}^2$ -гибридизованными атомами углерода [6, 7], что обеспечивает с одной стороны высокую липофильность, а с другой возможность взаимодействия  $\pi$ -системы фуллерена с электронодонорными функциональными группами. Перспективность создания сложных композитных систем  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})/\text{Full}$  обусловлена высокой антиоксидантной активностью фуллерена  $\text{C}_{60}$ , что может положительно сказываться на свойствах изготавливаемых с его участием лекарственных композиций [8].

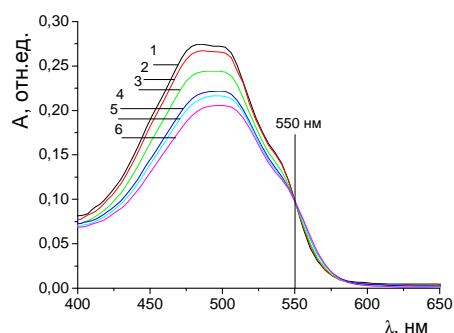
Целью настоящей работы было изучение строения гидратного слоя композитного адсорбента, созданного на основе ВДК А-300, адсорбционно модифицированного комплексом ДНК(Dox), и влияние на гидратацию наночастиц фуллерена  $\text{C}_{60}$ .

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве минеральной составляющей композита был выбран высокодисперсный кремнезем (ВДК марки А-300 с удельной поверхностью  $300 \text{ м}^2/\text{г}$  Калужского опытно-экспериментального завода Института химии

поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины). Для приготовления композита 0,2 г ДНК (Sigma), выделенной из молок лососевых рыб, и 0,0015 г доксорубина (Sinbias Pharma Ltd.) растворяли в 90 мл дистиллированной воды. В результате образовывалось соединение включения ДНК(Dox). Использовались стабильные водные коллоидные растворы (в бидистиллированной и деионизированной воде) чистых фуллеренов  $\text{C}_{60}$  (степень очистки 99,5%), содержащие отдельные гидратированные молекулы фуллеренов и кластеры размером до 3 нм. Образцы были приготовлены в химической лаборатории Технического университета Илменау (ФРГ).

Контроль за комплексообразованием ДНК(Dox) осуществляли путем измерения спектров поглощения в видимой области на UV/VIS спектрометре Specord M-40 (рис. 1).



**Рис. 1.** Спектры поглощения смесей ДНК-Dox ( $C_{\text{Dox}} = 2,51 \cdot 10^{-5}$  моль/л) в фосфатном буферном растворе (pH=6,86) при различных концентрациях ДНК: 1 – 0; 2 –  $0,41 \cdot 10^{-4}$ ; 3 –  $0,78 \cdot 10^{-4}$ ; 4 –  $1,16 \cdot 10^{-4}$ ; 5 –  $1,58 \cdot 10^{-4}$ ; 6 –  $2,33 \cdot 10^{-4}$  моль/л

Перед измерениями смешанные растворы Dox и ДНК выдерживали в течение 5 мин для установления равновесия. Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевых кюветах толщиной 10 мм. Как видно из рисунка, с ростом  $C_{\text{ДНК}}$  в широком интервале концентраций наблюдается bathochromный сдвиг и уменьшение интенсивности, что свидетельствует об интеркаляционном связывании [9, 10]. В то же время, спектры поглощения смесей проходят через изобестическую точку (550 нм), что однозначно свидетельствует об образовании только одного типа комплексов.

Раствор ДНК(Dox) подвергали лиофильной сушке (без буфера), для чего его замораживали жидким азотом и сублимировали воду в вакууме до образования твердого комплекса

ДНК(Dox). Затем в агатовой ступке проводили тщательное растирание смеси полученного комплекса (0,06 г) с 1 г ВДК А-300 (30 мин, 293 К). В соответствии с данными [11], в результате такого процесса, проводимого в присутствии небольшого количества воды, полимерные вещества равномерно распределяются по поверхности частиц кремнезема. При этом его насыпная плотность увеличивалась от 50 до 200 мг/г. Соответственно формировались агломераты кремнезема, размер которых измерялся единицами микрон [12]. Выполненные в [12] измерения показывают, что механическое уплотнение кремнезема не приводит к заметному изменению его адсорбционных свойств (взаимное расположение первичных частиц в агрегатах изменяется слабо), а влияет, прежде всего, на плотность упаковки агрегатов в агломератах.

Нанесение на поверхность частиц композита  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}$  фуллеренов  $\text{C}_{60}$  осуществлялось путем его смачивания 0,1% водной суспензией фуллерена  $\text{C}_{60}$  (примерно 1 г на 100 мг  $\text{SiO}_2$ ) и тщательного перемешивания образовавшейся пастообразной смеси. Затем образец высушивался на воздухе при 300 К в течение 7 дней. Предполагалось, что при таком способе нанесения создаются условия для равномерного распределения фуллерена  $\text{C}_{60}$  по поверхности и его достаточно высокая концентрация в композите, которая составляла около 0,8 мас.% относительно массы твердого вещества.

Спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian "Mercury") с рабочей частотой 400 МГц. Использовали  $90^\circ$  зондирующий импульс длительностью 3 мкс. Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью  $\pm 1$  град. Интенсивности сигналов определялись путем измерения площади пиков с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации его нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5%, а для перекрывающихся сигналов –  $\pm 10\%$ . Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры

210 К. Методика ЯМР-измерений, а также определения термодинамических характеристик и радиуса кластеров межфазной воды подробно описана в [13–15].

При анализе явлений, происходящих на границе раздела фаз твердое тело – жидкость – пар, используются два основных подхода – методы избыточных величин Гиббса и слоя конечной толщины [16]. В соответствии с первым из них предполагают, что весь избыток энергии, обусловленный формированием границ раздела фаз, сосредоточен в бесконечно тонком поверхностном слое, в то время как термодинамические параметры остальной жидкости не отличаются от объемных. При этом для определения геометрических размеров агрегатов жидкости, ограниченных твердой поверхностью, может быть использовано уравнение Гиббса-Томсона, связывающее радиус сферического или цилиндрического водного кластера ( $R$ ) с величиной депрессии температуры замерзания

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где  $T_m(R)$  – температура плавления льда, локализованного в порах радиуса  $R$ ,  $T_{m,\infty}$  – температура плавления объемного льда,  $\rho$  – плотность твердой фазы,  $\sigma_{sl}$  – энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью и  $\Delta H_f$  – объемная энтальпия плавления. Это уравнение может быть использовано для вычисления распределения пор по размерам из температурной зависимости концентрации незамерзающей воды  $C_{\text{нз}}(T)$ , полученной на основе метода  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии с послойным вымораживанием воды для водных суспензий твердых тел или гидратированных биологических объектов, когда применение других методов анализа пористой структуры затруднительно [17]. Для практического использования уравнение (1) можно применять в виде  $\Delta T_m = k/R$ , в котором константа  $k$  для многих гетерогенных систем, содержащих воду, близка к 50 [12, 15].

В методе слоя конечной толщины [16] предполагают, что влияние поверхности границы раздела фаз распространяется на несколько молекулярных слоев вглубь жидкой фазы. Тогда процесс замерзания (размерзания) межфазной воды, локализованной в твердой пористой матрице, проходит в соответствии с

изменениями свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ), обусловленными влиянием поверхности, которое тем меньше, чем дальше от поверхности изучаемый слой воды. При  $T = 273 \text{ K}$  замерзает вода, свойства которой не отличаются от свойств воды в объеме, а по мере понижения температуры (без учета эффекта переохлаждения) замерзают слои воды, расположенные ближе к поверхности. При этом для межфазной воды справедливо соотношение

$$\Delta G_{\text{ice}} = -0,036 (273,15 - T), \quad (2)$$

где коэффициент перед скобками является параметром, связанным с температурным коэффициентом изменения свободной энергии Гиббса для льда [14]. Определяя по величине интенсивности сигнала температурную зависимость величины  $C_{\text{sw}}(T)$ , в соответствии с методикой, подробно описанной в работах [13–15], можно рассчитать количества сильносвязанной (SAW) и слабосвязанной (WAW) воды, а также термодинамические характеристики этих слоев.

Как было показано ранее [13–15], метод низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии с вымораживанием жидкой фазы позволяет рассчитывать количество связанной воды, ее термодинамические характеристики, а также распределение по размерам заполненных водой наноразмерных полостей в макромолекулах. Величина химического сдвига протонов ( $\delta_{\text{H}}$ ) в связанной воде позволяет определить среднее число Н-связей, приходящихся на одну молекулу воды. Поскольку для неассоциированной воды (газовая фаза, раствор в слабополярном растворителе)  $\delta_{\text{H}} = 1\text{--}1,5$  м.д., а для льда  $\delta_{\text{H}} = 7$  м.д. [14, 19], можно заключить, что участие воды в формировании одной Н-связи в качестве протонодонора приводит к увеличению  $\delta_{\text{H}}$  на 2,7 м.д. При этом следует помнить, что другая молекула воды участвует в формировании водородной связи в качестве электронодонора. Исследования различных объектов [13–15] показали, что при определенном гидрофобно-гидрофильном балансе функциональных групп на поверхности вода может переходить в слабоассоциированное состояние, для которого характерно появление в спектрах сигнала протонов при  $\delta_{\text{H}} = 1\text{--}2$  м.д. В этом состоянии среднее число протонов Н-связях, приходящееся на каждую молекулу воды, меньше 1 или молекулы воды образуют водородносвязанные комплексы с сильно ис-

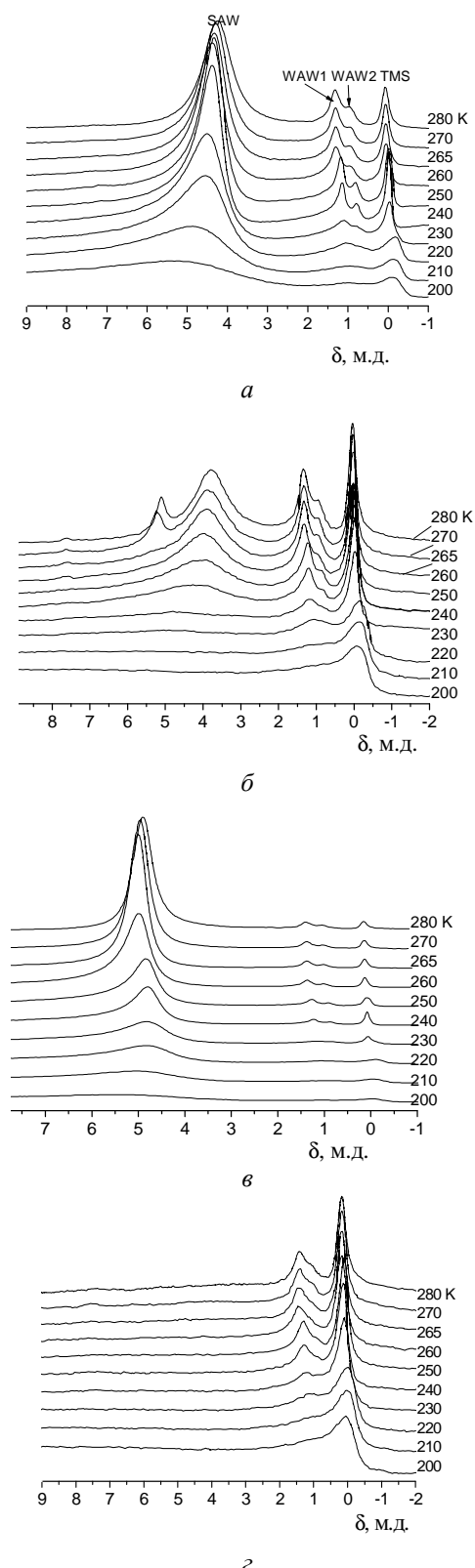
каженной геометрией (уменьшение угла  $\text{O}\text{--}\text{H}\dots\text{O}$  приводит к увеличению магнитного экранирования протонов [20]).

Измерения выполнялись в среде химически чистого органического растворителя  $\text{CCl}_4$  ( $\epsilon = 2,2$ ) как неполярного вещества, не образующего водородносвязанных комплексов даже с сильными протонодонорами и не дающего паразитных сигналов в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР. Поскольку стабилизация поля в ЯМР-спектрометрах осуществляется по ядрам дейтерия, который в наших опытах отсутствовал, для определения величин химического сдвига использовался внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС), концентрация которого не превышала 0,2 мас.%. Суспензии композитов  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  или  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})/\text{Full}$  в  $\text{CCl}_4$  готовились непосредственно в ампулах ЯМР диаметром 5 мм. При этом к порошку твердого образца добавлялось такое количество жидкого  $\text{CCl}_4$ , которое требовалось для полного смачивания и формирования над твердым образцом слоя жидкости, толщина которого не превышала 15% от высоты слоя твердой фазы. Перед измерениями образцы тщательно перемешивали и выдерживали 15–20 мин до отстаивания образовавшихся суспензий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены снятые при разной температуре в среде  $\text{CCl}_4$ , спектры  $^1\text{H}$  ЯМР воды в композитах  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$ , содержащих разное количество воды. Концентрация воды в исходном образце (рис. 2а) составляла 5 мг/г. Варьирование концентрации осуществляли двумя способами: добавлением воды к суспензии (порошку композита, погруженному в органическую среду) с помощью микродозатора (рис. 2б) и переносу ее на адсорбент через фазу  $\text{CCl}_4$  или добавлением воды к порошку сухого вещества при интенсивном встряхивании в течение 10 мин с последующим выдерживанием в ампуле в течение 1 ч перед добавлением  $\text{CCl}_4$  (рис. 2в). Дегидратацию исходного образца осуществляли его прогреванием при 350 К в течение 10 мин (рис. 2г).

Из рис. 2 видно, что вода в исходном образце композита проявляется в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР в виде трех сигналов с химическими сдвигами в области 0,5–1,3 м.д. (WAW) и 4–5 м.д. (SAW).



**Рис. 2.** Полученные при разных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР воды, связанной с композитом  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$ , при варьировании концентрации межфазной воды:  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 5\text{ мг/г}$  (а);  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 15\text{ мг/г}$  (б);  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 105\text{ мг/г}$  (в); без воды (г)

С ростом температуры наблюдается некоторое смещение сигналов в область более сильных магнитных полей (меньшие величины  $\delta_H$ ), что может быть связано с уменьшением ассоциированности воды в кластерах [12]. В спектрах также наблюдается сигнал ТМС ( $\delta_H = 0$  м.д.), концентрация которого не превышала 0,1% .

Температура замерзания жидкого  $\text{CCl}_4$  составляет около 230 К. Как видно из данных рис. 2, межфазная вода и ТМС фиксируются в спектрах и при более низкой температуре. Следовательно,  $\text{CCl}_4$  и после его замерзания слабо влияет на подвижность молекул ТМС и воды (их сигналы при  $T < 230$  К уширяются слабо). Вероятно, часть  $\text{CCl}_4$ , находящаяся в наноразмерных пустотах внутри композита, остается в незамерзшем состоянии из-за адсорбционных взаимодействий, что дает возможность молекулам воды, формирующим кластерные структуры, сохранять как вращательную, так и трансляционную подвижность. В то же время, молекулы ТМС (который не замерзает во всем доступном температурном диапазоне) концентрируются в полостях, окруженных твердым  $\text{CCl}_4$ , в которых температура замерзания  $\text{CCl}_4$  понижена в соответствии с законом Рауля.

WAW наблюдается в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР в виде двух сигналов (WAW1 и WAW2). Аналогичный вид спектров наблюдался и для WAW в порошках твердой ДНК или ДНК, иммобилизированной на частицах кремнезема А-300 [5, 21]. Особенностью изучаемой системы является то, что оба сигнала, WAW1 и WAW2, с понижением температуры смещаются в сильные магнитные поля, в то время как для твердой ДНК [21] фиксировалось существенное смещение сигнала WAW1 в слабые магнитные поля, причем его интенсивность во всем температурном интервале оставалась меньшей, чем для сигнала WAW2. Вероятно, различия обусловлены присутствием в композите Dox, молекулы которого уменьшают возможность участия молекул межфазной воды в формировании водородосвязанных комплексов с активными центрами молекул ДНК.

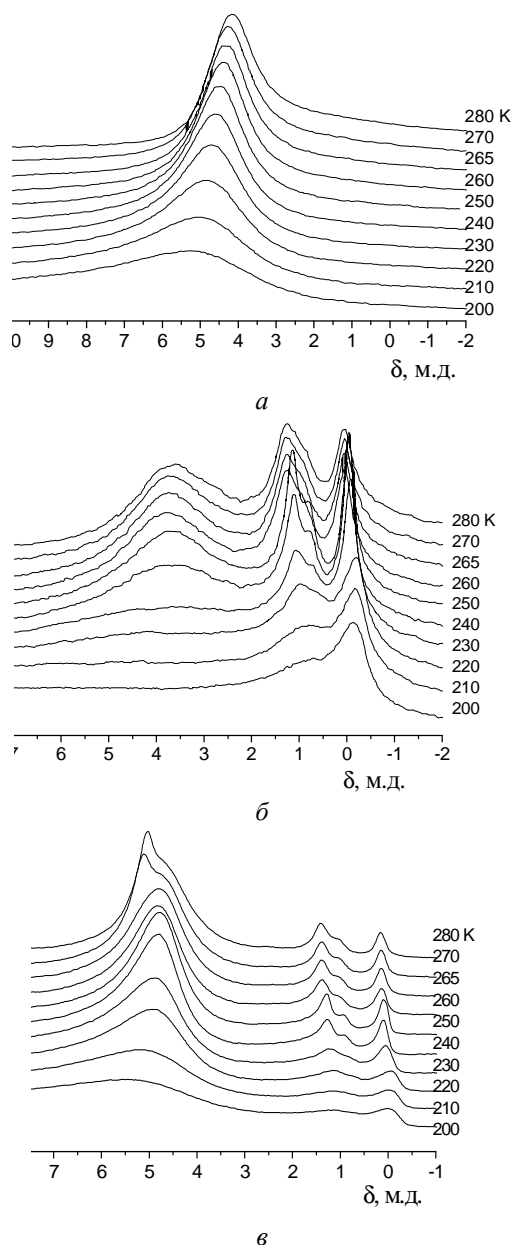
С ростом концентрации воды ( $C_{\text{H}_2\text{O}}$ ) до 105 мг/г (рис. 2в) наблюдается значительный рост интенсивности сигнала SAW при относительно слабом изменении соотношения интенсивностей сигналов WAW1, WAW2 и ТМС.

Отсюда следует, что количество WAW зависит, прежде всего, от структурных особенностей поверхности композита и при варьировании величины  $C_{\text{H}_2\text{O}}$  изменяется лишь в небольших пределах.

При введении в образец дополнительно количества воды через фазу органического растворителя (рис. 2б) вид спектров существенно изменяется – замерзание SAW происходит при более высокой температуре, а при температуре около 273 К в спектрах фиксируется еще один сигнал сильно-ассоциированной, но слабосвязанной воды (исчезает при  $T < 270$  К) с более высоким значением химического сдвига, что свидетельствует о большей ассоциированности этого типа воды. Этот тип SAW, в соответствии с уравнением (1), следует относить к водным агрегатам большего размера. Вероятно, это микрокапли SAW, находящиеся вблизи межфазных границ частиц композита. Ввиду присутствия между гидрофильными участками композита слоя  $\text{CCl}_4$ , система может оставаться в неравновесном состоянии достаточно долго, хотя сродство поверхности частиц композита к воде остается высоким. Так, в соответствии с данными рис. 2в, в гидратную оболочку частиц композита без появления замерзающих вблизи 273 К наноклапель может быть введено в 6 раз большее количество воды.

На рис. 2г приведены спектры  $^1\text{H}$  ЯМР образца, дегидратированного путем выдерживания при  $T = 350$  К. В спектрах практически полностью отсутствует сигнал SAW, в то время как интенсивность сигналов WAW (по сравнению с сигналом TMC) уменьшилась не более, чем вдвое. Отсюда следует, что вся WAW является сильносвязанной и ее удаление с поверхности происходит со значительно большими затратами энергии, чем для SAW.

Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР образцов композита  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}/\text{Full } C_{60}$  приведены на рис. 3. Концентрация фуллерена  $C_{60}$  в композите (0,8 мас.%) была сопоставима с концентрацией ДНК. Измерения для одного и того же образца проводились в воздушной среде (рис. 3а) и среде  $\text{CCl}_4$  (рис. 3б). Затем в образец через фазу органического растворителя вводилась дополнительная порция воды (рис. 3в).



**Рис. 3.** Полученные при разных температурах спектры  $^1\text{H}$  ЯМР воды в композите  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}/\text{Full } C_{60}$  на воздухе (а) и в среде  $\text{CCl}_4$  (б) при  $C_{\text{H}_2\text{O}}=5$  мг/г, а также в среде  $\text{CCl}_4$  при  $C_{\text{H}_2\text{O}}=32,6$  мг/г (в)

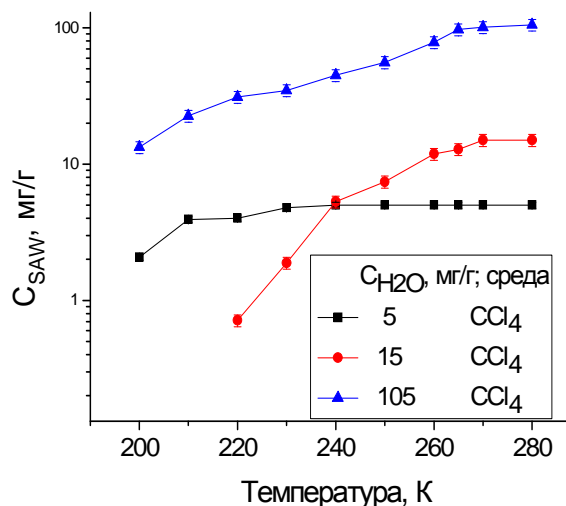
Из сопоставления спектров, приведенных на рис. 3а и 3б, следует, что наличие слабоассоциированных форм воды во многом определяется присутствием фазы неполярного органического растворителя. Хотя в исходном образце (рис. 3а) и фиксируется некоторая асимметричность сигнала (особенно вблизи 273 К), которая может быть связана с присутствием небольшого количества WAW, ее слишком мало для того, чтобы она наблюдалась в виде

отдельного сигнала. Химический сдвиг сигнала SAW на воздухе изменяется от 5 м.д. при 200 К до 4 м.д. при 280 К, что свидетельствует о некотором уменьшении ее ассоциированности. При этом интенсивность сигнала воды изменяется относительно слабо, что указывает на сильное связывание воды с поверхностью твердых частиц композита.

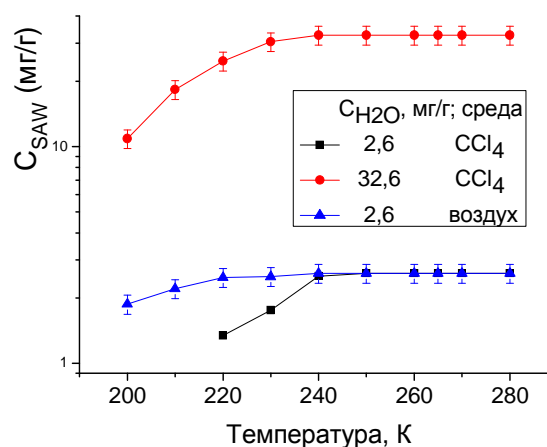
В среде  $\text{CCl}_4$  вид спектров кардинально изменяется (рис. 3б). При 280 К наблюдаются близкие по интенсивности сигналы SAW и WAW. Сигнал SAW имеет химический сдвиг в диапазоне 3,2–4 м.д., т.е. ассоциированность SAW становится существенно ниже, чем для того же образца в воздушной среде. Еще одной особенностью является замерзание SAW при относительно высокой температуре (выше 240 К). Тогда в соответствии с данными [14] ее следует квалифицировать как слабосвязанную. Введение в систему дополнительной порции воды (рис. 3в) приводит к росту, прежде всего, интенсивности сигнала SAW, которая становится менее чувствительной к варьированию температуры. Сопоставление спектров, приведенных на рис. 2а и 3б, дает основание полагать, что перераспределение между разными формами воды (стабилизация WAW) обусловлено присутствием на поверхности фуллера  $\text{C}_{60}$ .

Аналогично тому, как это наблюдалось для композита  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}$  (рис. 2б) при введении дополнительной порции воды через среду неполярного  $\text{CCl}_4$ , в спектрах, приведенных на рис. 3в, фиксируется некоторое количество SAW, находящейся в виде достаточно больших кластеров или нанодоменов, а также воды, не перешедшей в адсорбционный слой частиц композита. Такие неравновесные акваагрегаты могут существовать достаточно долго (по крайней мере, часы). Вероятно, диффузия входящей в их состав воды к поверхности ограничена присутствием в межчастичном пространстве среды  $\text{CCl}_4$ , создающей значительные пространственные ограничения.

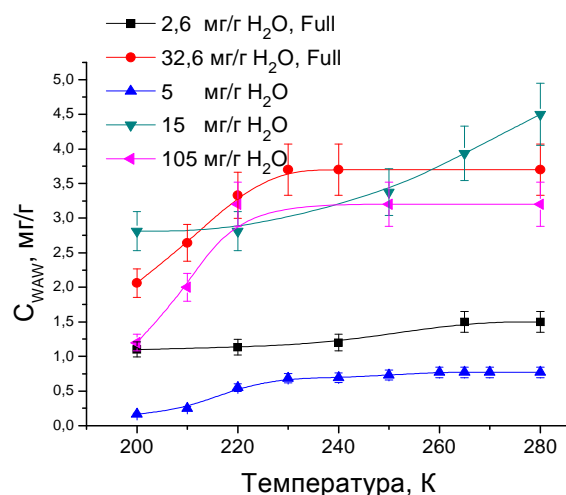
На рис. 4 приведены температурные изменения интенсивности сигналов SAW и WAW при различной концентрации воды в композитах  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}$  и  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}/\text{Full } \text{C}_{60}$ , а на рис. 5 – рассчитанные в соответствии с уравнениями (1) и (2) распределения кластеров адсорбированной воды по размерам (а) и по энергии взаимодействия с границами раздела фаз (б).



а

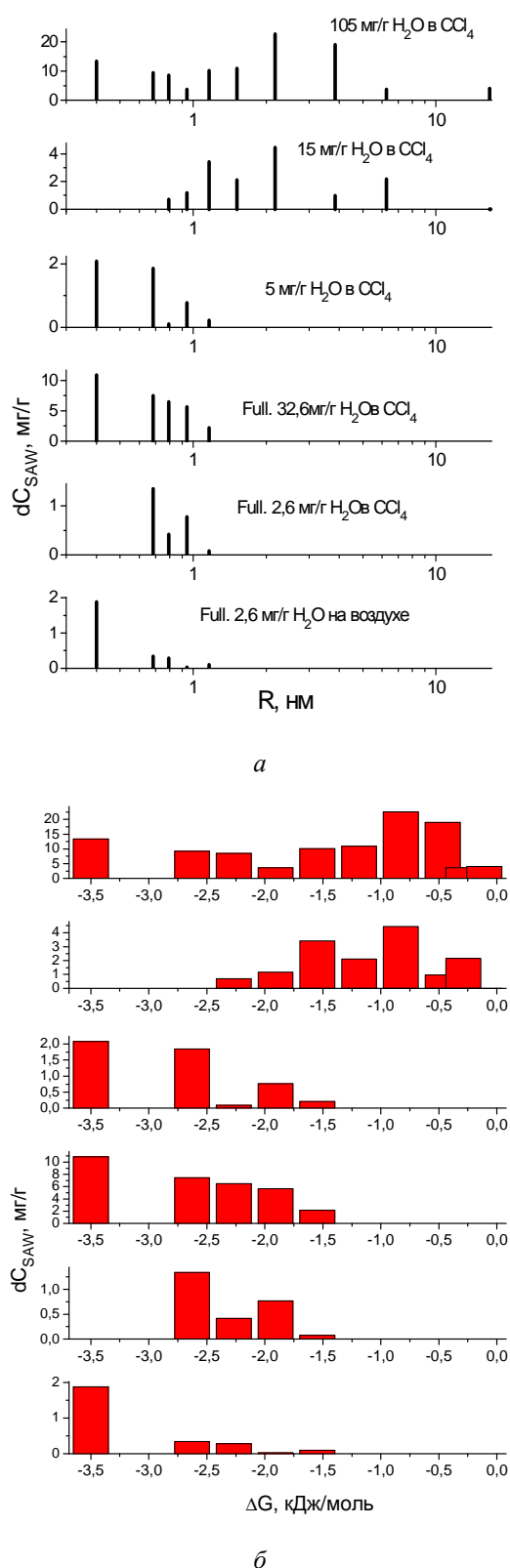


б



в

Рис. 4. Температурные зависимости концентрации SAW (а, б) и WAW (в) для композитов  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}$  (а) и  $\text{SiO}_2/\text{ДНК(Dox)}/\text{Full } \text{C}_{60}$  (б)



**Рис. 5.** Распределения кластеров адсорбированной воды по их радиусам (а) и изменениям свободной энергии Гиббса, обусловленным адсорбционными взаимодействиями (б)

Поскольку измерения осуществлялись в температурном диапазоне 200–280 К, для части воды, которая оставалась в незамерзшем состоянии при более низкой температуре, условно принималось присутствие ее в виде кластеров со средним радиусом 0,4 нм.

Для образца  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  на зависимостях  $C_{\text{SAW}}(T)$  (рис. 4а) отсутствует участок, который может быть отнесен к слабосвязанной воде (замерзающей при  $T > 250$  К [14]).

При  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 15$  мг/г для  $T < 240$  К кривая  $C_{\text{SAW}}(T)$  проходит ниже, чем для образца, содержащего меньшее количество воды.

Это свидетельствует о влиянии количества адсорбированной воды на распределение по размерам кластеров воды и энергии их взаимодействия с границами раздела фаз. Действительно, из рис. 5а следует, что при  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 5$  мг/г вода присутствует в виде системы кластеров, размер которых не превышает 1,05 нм, в то время как при  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 15$  мг/г величина кластеров находится в интервале 0,8–5,5 нм. Соответственно, понижение свободной энергии Гиббса, обусловленное адсорбционными взаимодействиями для исходного образца (при  $C_{\text{H}_2\text{O}} = 5$  мг/г), максимально и достигает  $-3,5$  кДж/моль, а для образца, в котором содержание воды увеличено путем ее введения через органическую фазу ( $C_{\text{H}_2\text{O}} = 15$  мг/г), оно не превышает  $-2,25$  кДж/моль (рис. 5б). При уравновешивании образца дополнительной порцией воды на воздухе ( $C_{\text{H}_2\text{O}} = 105$  мг/г) на распределениях  $dC_{\text{SAW}}(R)$  и  $dC_{\text{SAW}}(\Delta G)$  фиксируются кластеры воды, размеры которых изменяются во всем доступном измерению интервале, а величина  $\Delta G$  может превышать  $-3,5$  кДж/моль (такая вода замерзает при температуре  $T < 200$  К).

Для композита  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})/\text{Full } \text{C}_{60}$  зависимость  $C_{\text{SAW}}(T)$  при постоянном содержании  $C_{\text{H}_2\text{O}}$  сильно изменяется при замене воздушной среды на среду  $\text{CCl}_4$  (рис. 4б). При  $T < 240$  К наклон кривой возрастает. Таким образом, органическая среда  $\text{CCl}_4$  способствует процессу замерзания межфазной воды. В результате средний радиус кластеров воды возрастает от 0,4 до 0,8 нм (рис. 5а), а суммарное понижение свободной энергии Гиббса от  $-3,5$  до  $-2,25$  кДж/моль (рис. 5б).



Подобный эффект неоднократно регистрировался ранее для многих типов углеродных материалов и некоторых видов мезопористых кремнеземов [13, 14]. Он обусловлен тем, что при формировании кластеров сильно ассоциированной воды на слабо гидрофильной поверхности они взаимодействуют с поверхностью путем формирования относительно небольшого числа водородных связей.

В то же время, они взаимодействуют с поверхностью как единая коллигативная система посредством дисперсионных взаимодействий. При этом между адсорбционным слоем воды и поверхностью находятся пустоты, в которые, в случае совместной адсорбции воды и неполярного вещества ( $\text{CCl}_4$ , находящегося в избытке), могут проникать молекулы органического вещества. Для них (ввиду малого расстояния) эффективность дисперсионных взаимодействий с поверхностью оказывается выше, чем для воды. В результате энергия связывания кластеров SAW с поверхностью понижается. В соответствии с данными, представленными на рис. 4б, этот процесс сопровождается ростом среднего размера кластеров воды.

Для обоих композитных материалов ( $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  и  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})/\text{Full C}_{60}$ ) вся слабо ассоциированная вода может быть квалифицирована как сильносвязанная, поскольку замерзает при температуре  $T < 250 \text{ K}$  [14]. Исключение составляет образец  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  с добавкой воды через фазу  $\text{CCl}_4$  (рис. 4в). Можно полагать, что слабо ассоциированная вода, которая стабилизируется средой  $\text{CCl}_4$  существует в виде малых кластеров, в которых молекулы воды взаимодействуют между собой преимущественно не через водородные связи (поскольку химический сдвиг мал), а по диполь-дипольному механизму, причем кластерные структуры WAW формируются с участием не только активных центров поверхности, но и молекул  $\text{CCl}_4$ . В соответствии с уравнением (1), размер кластеров слабо ассоциированной воды не превышает 1,2 нм, однако в рамках проведенных исследований их строение не может быть определено достаточно надежно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружены существенные различия в строении гидратного слоя композита, созданного путем адсорбционного закрепления на поверхности кремнезема А-300 комплекса включения ДНК(Dox), и порошка твердой ДНК или композита  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}$ . В гидратированном композите  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  в неполярной среде  $\text{CCl}_4$  на поверхности присутствуют  $^1\text{H}$  ЯМР-сигналы SAW и двух типов WAW, но не обнаруживаются сигналы воды, связанной с электронодонорными центрами молекул ДНК, регистрируемые в порошках твердой ДНК. Вероятной причиной этого может быть появление фрагментов молекул Dox в местах локализации такой воды, что сопровождается ускорением обменных процессов между разными типами адсорбированной воды.

При включении в композит  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  наночастиц фуллерена  $\text{C}_{60}$  (в среде  $\text{CCl}_4$ ) происходит существенная перестройка гидратного слоя, которая проявляется в уменьшении связывания кластеров сильноассоциированной воды с поверхностью и в увеличении размера этих кластеров.

Обнаружено, что при введении дополнительных порций воды в композиты  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})$  и  $\text{SiO}_2/\text{ДНК}(\text{Dox})/\text{Full C}_{60}$  (в среде  $\text{CCl}_4$ ) происходит увеличение количества сильноассоциированной воды. Концентрация слабоассоциированной воды с ростом гидратированности изменяется нелинейно.

При добавлении воды через слой жидкого  $\text{CCl}_4$  на поверхности формируются долгоживущие неравновесные водные агрегаты субмикронного размера, слабо связанные с поверхностью частиц.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики. – Москва: Медицина, 1987. – 173 с.
2. Hrelia S., Fiorentini D., Maraldi T. et al. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes //

- Biochem. Biophys. Acta. – 2002. – V. 1567. – P. 150–156.
3. *Abou El Hassan M.A., Verheul H.M., Jorna A.S. et al.* The new cardioprotector monohydroxyethylrutoside protects ageist doxorubicin-induced inflammatory effects *in vitro* // Br. J. Cancer. – 2003. – V. 98, N 2. – P. 357–362.
  4. *Чекман І.С., Трофімова Т.С.* Доксорубіцин: профілактика та фармакотерапія побічних реакцій // Наук. Вісн. Нац. мед. універ. – 2009. – № 2. – С. 202–207.
  5. *Туров В.В., Гунько В.М.* Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наукова думка, 2011. – 314 с.
  6. *Шпак А.П., Куницкий Ю.А., Карбовский В.Л.* Кластерные и наноструктурные материалы. – Киев: Академперіодика, 2001. – Т. 1. – 586 с.
  7. *Hirsch A.* The Chemistry of Fyllerenes. – Stuttgart: G. Thieme Verlag, 1994. – 215 p.
  8. *Макин Д.Н., Венгерович Н.Г., Тюнин М.А.* Применение фуллеренов в биоактивных раневых покрытиях // Науч.-техн. Вест. СПб Гос. универ. информ. технол., механ. и оптики. – 2008. – № 47. – С. 78–83.
  9. *Zhang L.Z., Tang G.Q.* The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study.// J. Photochem. Photobiol. B. – 2004. – V. 74, N 2–3. – P. 119–125.
  10. *Biver T., De Biasi A., Secco F. et al.* Cyanine dyes as intercalating agents: Kinetic and thermodynamic studies on the DNA/Сyan40 and DNA/ССyan2 systems // Biophys. J. – 2005. – V. 89, N 1. – P. 374–383.
  11. *Воронин Е.Ф., Носач Л.В., Василенко А.П.* Геометрическое модифицирование наноразмерного кремнезема путем механоактивации // Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии: матер. VI Междунар. науч.-техн. конф. (26–30 апр., 2010, Севастополь, Украина). – С. 252–255.
  12. *Gun'ko V.M., Voronin E.F., Nosach L.V. et al.* Structural, textural and adsorption characteristics of nanosilica mechanochemically activated in different media // J. Colloid Interface Sci. – 2011. – V. 355. – P. 300–311.
  13. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et al.* Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // Adv. Colloid Interface Sci. – 2005. – V. 118, N 1–3. – P. 125–172.
  14. *Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П.* Вода на межфазной границе. – Киев: Наукова думка, 2009. – 694 с.
  15. *Turov V.V., Leboda R.* Application of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbens // Adv. Colloid Interface Sci. – 1999. – V. 79, N 2–3. – P. 173–211.
  16. *Фролов Ю.Г.* Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы. – Москва: Химия, 1982. – 400 с.
  17. *Petrov O.V., Furo I.* NMR cryoporometry: Principles, applications and potential // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. – 2009. – V.54, N 2. – P. 97–122.
  18. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова. – Москва: Наука, 1978. – 495 с.
  19. *Kinney D.R., Chaung I-S., Maciel G.E.* Water and the silica surface as studied by variable-temperature high-resolution proton <sup>1</sup>H NMR // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – V. 115, N 15. – P. 6786–6794.
  20. *Gun'ko V.M., Turov V.V.* Structure of hydrogen bonds and <sup>1</sup>H NMR spectra of water at the interface of oxides // Langmuir. – 1999. – V. 15, N 19. – P. 6405–6415.
  21. *Туров В.В., Чехун В.Ф., Гунько В.М. и др.* Влияние органических растворителей и доксорубицина на кластеризацию воды, связанной ДНК // Хімія, фізика і технологія поверхні. – 2010. – Т.1, № 4. – С. 465–472.

Поступила 23.03.2011, принята 20.04.2011

## **Будова гідратного шару поверхні композитних систем SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox) і SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox)/фуллерен C<sub>60</sub>**

**В.В. Туров, А.П. Угнівенко, В.М. Барвінченко, Т.В. Крупська,  
С.В. Чехун, Ю.І. Прилуцький**

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова 17, Київ 03164, Україна, v\_turov@ukr.net*

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
вул. Васильківська 45, Київ 03022, Україна*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології"  
вул. Володимирська 64, Київ 01033, Україна*

*Методом низькотемпературної <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії вивчено будову гідратного покриву композитів SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox) та SiO<sub>2</sub>/ДНК(Dox)/C<sub>60</sub> в середовищі неполярного органічного розчинника CCl<sub>4</sub>. Для кластерів сильноасоційованої міжфазної води отримано розподіл за радіусами та зміну вільної енергії Гіббса, що обумовлені адсорбційними взаємодіями з поверхнею наночастинок. Показано, що гідратні властивості таких композитів відрізняються від гідратних властивостей твердих частинок ДНК чи композитів SiO<sub>2</sub>/ДНК будовою кластерів слабоасоційованої води. Встановлено, що при введенні додаткових порцій води в дисперсне середовище (CCl<sub>4</sub>) поблизу межі фаз формуються субмікронні кластери сильноасоційованої води, які існують певний проміжок часу та здатні істотно впливати на співвідношення концентрацій сильно- та слабоасоційованої води.*

## **Hydration Shell Structure of the Surface of SiO<sub>2</sub>/DNA(Dox) and SiO<sub>2</sub>/DNA(Dox)/Fullerene C<sub>60</sub> Composite Systems**

**V.V. Turov, A.P. Ugnivenko, V.M. Barvinchenko, T.V. Krupska,  
S.V. Chekhun, Yu.I. Prylutsky**

*Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Street, Kyiv 03164, Ukraine, v\_turov@ukr.net*

*Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine  
45 Vasilkivs'ka Street, Kyiv 03022, Ukraine*

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Department of Biophysics, ESC "Institute of Biology"  
64 Volodymyrs'ka Street, Kyiv 01033, Ukraine*

*The structure of the hydrate cover of SiO<sub>2</sub>/DNA(Dox) and SiO<sub>2</sub>/DNA(Dox)/Full nanocomposites in the medium of non-polar organic solvent CCl<sub>4</sub> was studied using the low-temperature <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. For strongly associated interfacial water clusters the distributions were obtained along the radius as well as the changes in the Gibbs free energy stipulated by adsorption interaction with the surface of nanoparticles. It has been shown that the hydration properties of these composites differ from those of the solid particles of DNA or SiO<sub>2</sub>/DNA composite structure of weakly associated water clusters. It has been found that the introduction of additional portions of water into the dispersion medium (CCl<sub>4</sub>) near interfaces results in formation long-living of sub-micron clusters the submicron clusters of strongly associated water which can significantly affect the concentration ratio of strongly and weakly associated water.*