

О. С. Гойстер¹, Р. В. Родік², В. І. Кальченко²,
С. В. Дзядевич³, В. І. Назаренко¹, О. Г. Мінченко¹

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ МІКОТОКСИНІВ З ТЕТРААЛКІЛКАЛІКС[4]РЕЗОРЦИН ОЛАРЕНАМИ МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

² Інститут органічної хімії НАН України, м. Київ

³ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

В останні роки спостерігається тенденція до збільшення забруднення зерна, зернопродуктів (комбікормів) та харчових продуктів токсигенними мікроскопічними грибами і мікотоксинами, отруйними низькомолекулярними метаболітами цих грибів. Навіть мінімальні їх рівні в кормах та продуктах харчування є небезпечними. Особливо це стосується мікотоксинів, які мають здатність до інтерференції з ДНК [1].

Виділений у 1943 році мікотоксин патулін синтезується грибом *Penicillium expansum*, що паразитує на деяких овочах та фруктах, особливо часто він зустрічається в яблуках. Патулін володіє високими мутагенними властивостями, у зв'язку з чим його рівень у фруктових соках не повинен бути вище 50 нг/мл [2].

Зеараленон — один з метаболітів мікроскопічних грибів роду *Fusarium*, який має високу естрогеноподібну активність та негативно впливає на організм [3] і його допустимі концентрації становлять 10–60 мкг/мл [4].

Т-2 токсин відомий своєю високою токсичністю для людини і тварин; він синтезується грибами роду *Fusarium*, тому вживання в їжу продуктів переробки зерна, ураженого цими грибами є небезпечним. Т-2 токсин застосовували в Афганістані як біологічну зброю. Т-2 є інгібітором синтезу білка і негативно впливає на імунну систему [5]. Відповідно до Державного стандарту України

(ДСТУ 3768-98), ГДК Т-2 токсину становить 0,1 мг/кг у продуктах харчування та 0,2 мг/кг у кормах.

Токсичність мікотоксинів, за наявності інших токсичних речовин біологічного та хімічного походження в їжі та кормі нерідко має синергічний характер, тому визначення Т-2 токсину, зеараленону та патуліну в продуктах харчування — актуальне завдання сучасності.

Контроль вмісту зеараленону, патуліну та Т-2 токсину в харчових продуктах та кормах здійснюється методами хроматографічного та імуноферментного аналізу [6], але ці методи потребують високої кваліфікації виконавців, ретельної підготовки зразків до аналізу багатоетапного здійснення та є довгот-

ривалими.

Синтетичні молекулярні рецептори здатні з високою селективністю та чутливістю розпізнавати та зв'язувати в супрамолекулярні комплекси різноманітні за природою аналіти в водних розчинах. Штучні рецептори легко синтезуються, мають низьку ціну, хімічно стійкі в різних середовищах. У зв'язку з цим були створені сенсорні системи з імобілізованими на поверхнях трансдукторів синтетичними рецепторами, які дозволяють визначати аналіти у розчинах без застосування мічених антитіл в режимі реального часу [7]. Раніше з метою визначення Т-2 токсину нами була розроблена методика формування моношарів тетраалкілкалікс[4]резорциноларенів на поверхні золотого шару трансдуктора в сенсорі, дія якого заснована на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [8].

Метою даної роботи було вивчення чутливості оптичного ППР сенсора, модифікованого тетраалкілкалікс[4]резорциноларенами, до патуліну, зеараленону та Т-2 токсину.

Матеріали і методи дослідження

В роботі використовували патулін та зеараленон, отримані від фірми Sigma, США. Патулін — біциклічний лактон з молекулярною масою 154,12 (Рис. 1а). Зеараленон — лактон резорцилової кислоти з молекулярною масою — 318,4 (Рис. 1б). Т-2 є трихотецевим мікотоксином, що належить до сполук сесквітерпеноїдного ряду (3-окси-4,15-діацетокси-8-ізобутирилокси-12,13-епокситрихотец-9-ен) (рис. 1в). Молекулярна маса — 466,5.

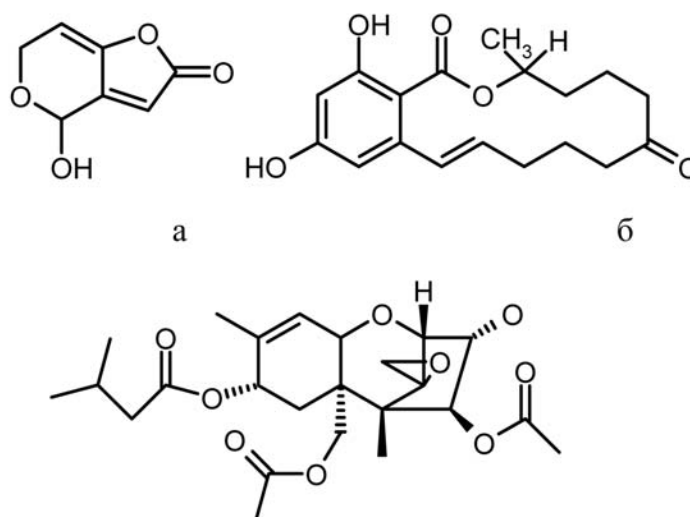


Рис. 1. Структура патуліна (а), зеараленона (б) та Т-2 токсина (в)

Досліджувані мікотоксини являють собою білі, кристалічні, хімічно стабільні та термостійкі сполуки, погано розчинні у воді та помірно — у полярних рідинах. Тому для виготовлення їх маточних розчинів брали 50% розчин етанолу.

Досліджувані тетраалкілкалікс [4] резорциноларени являють собою макроциклічні сполуки чашоподібної форми, що містять різні за довжиною алкільні групи на нижньому вінці та гідроксильні групи на верхньому вінці макроциклу (рис.2). Ці каліксарени отримані кислотнокаталізованою конденсацією резорцинолу або пірагололу з відповідними альдегідами [9].

Дослідження процесів специфічних молекулярних взаємодій на поверхні перетворювача проведено методом кутової спектроскопії ППР на автоматизованій установці SPR-4М, розробленій в Інституті фізики напівпровідників НАН України. Спектроскопію ППР проводили в конфігурації Кречмана з використанням He-Ne лазера з $\lambda = 632,8$ нм як джерела світла, гоніометра Г-5М, скляної призми та фотодіода ФД 263. Для забезпечення оптичного контакту між призмою і металевою плівкою, нанесеною на скляну основу, використовували іммерсійну рідину — поліфеніловий ефір ($n = 1,62$). Для забезпечення контакту робочої поверхні металевої плівки з пробою застосовували проточну кювету (об'єм 10 мкл з герметизуючим шаром силіконової резини).

Відомо, що при адсорбції та

взаємодії молекул на золотій поверхні перетворювача змінюються діелектричні властивості адсорбційного шару, що призводить до трансформації резонансної кривої. Таким чином, установка дає можливість одержати кінетичні криві ППР або сенсограми, які відображають процеси взаємодії молекул на поверхні перетворювача. При інтерпретації даних, одержаних методом ППР, вважали, що зміна величини кута ППР (відгук ППР) прямо пропорційна поверхневій концентрації речовини, нанесеної на золоту поверхню перетворювача.

Модифікацію поверхні перетворювача ППР сенсора проводили в два етапи. На першому етапі скляну пластинку, покрити шаром золота, експонували у 98%-ий розчин додекантіолу на 18 год. Далі поверхню сенсорної пластинки відмивали 50% етиловим спиртом. На другому етапі шар каліксарену формували безпосередньо в кюветі ППР-приладу шляхом прокачування зростаючих концентрацій (від 10 до 100 мкг/мл) його розчину в 50% спирті до припинення адсорбції, яку контролювали за відгуком ППР. Для видалення надлишку каліксарену, що не сорбувався на поверхні, кювету промивали 50% розчином спирту та реєстрували зсув резонансного кута (відгук ППР). Після цього кювету заповнювали розчином патуліну, зеараленону та Т-2 токсину в послідовно зростаючих концентраціях, та витримували 10 хв. Після вимірювань, комірку щоразу промивали 50% розчином спирту для

видалення аналітів, що не зв'язалися, та реєстрували відгук сенсора.

Результати та їх обговорення

Мікотоксини були проаналізовані п'ятьма біосенсорами, отриманими на основі калікс[4]резорциноларенів 1-5, які мають внутрішньомолекулярну порожнину, стабілізовану в конусоподібній конфігурації чотирма водневими зв'язками між найближчими гідроксильними групами сусідніх резорцинольних кілець (рис.2).

Методом рентгеноструктурного аналізу встановлено, що в кристалічному стані довгі аліфатичні радикали калікс[4]резорциноларенів, взаємодіючи між собою за рахунок багатьох слабких нековалентних зв'язків, утворюють щільноупаковані гідрофобні бішари [10]. Це може призвести до стеричної недоступності молекулярної порожнини каліксарену для взаємодії з досліджуваними аналітами. Дійсно, попередніми дослідженнями було показано, що безпосереднє нанесення калікс[4]резорциноларенів на вкриту шаром золота поверхню трансдуктора практично не змінює величину відгуку сенсора при контакті з мікотоксином Т-2 [8].

З метою оптимальної просторової орієнтації молекулярних порожнин калікс[4]резорциноларенів, поверхню сенсора було модифіковано додекантіолом, атоми сірки якого мають високу спорідненість до золота. В результаті цього поверхня трансдуктора стає покрита "щіткою" із додецильних ланцюжків [11]. Оброблена додекантіолом поверхня трансдуктора зв'язує тетраалкілкалікс[4]резорциноларени з водно-спиртових розчинів за рахунок гідрофобних взаємодій з їх алкільними групами. Таким чином вдається забезпечити направлене експонування молекулярних порожнин у розчин мікотоксину.

В ряду сполук 1-4 найкраще зв'язування з усіма досліджуваними мікотоксинами забезпечує тетрапропілкалікс[4]резорциноларен 2 (рис.2). Характер ППР-відгуку при зв'язування патуліну, зеараленону та Т-2 токсину, калікс[4]резорциноларенами 1, 3, 4 при досліджуваних концентраціях був практично ідентичним відгуку, характерному для тетрапропілкаліксарену 2. Однак величина відхилення резонансного

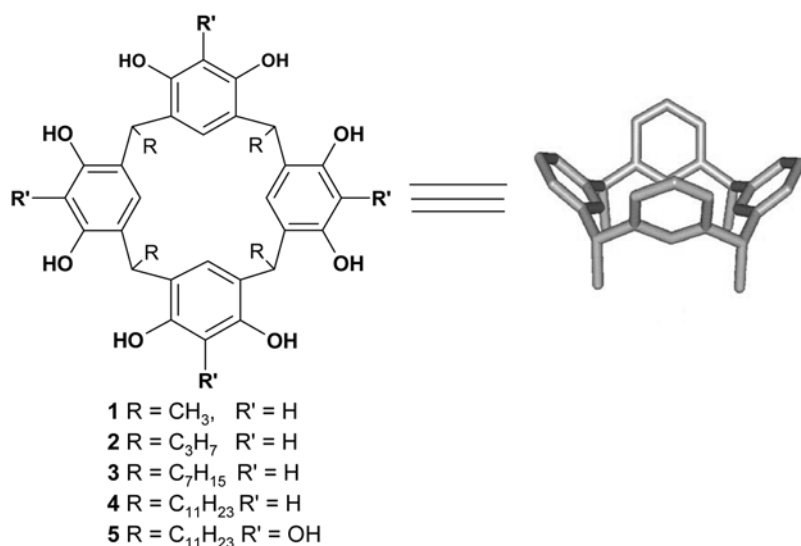


Рис.2. Хімічна будова та просторова структура тетраалкілкалікс[4]резорциноларенів 1-5.

кута для калікс[4]резорциноларенів 1, 3 та 4 була меншою (рис.3.А, Б, В). Це свідчить про вибіркиму селективність калікс[4]резорциноларенів 1-4 до молекул мікотоксинів.

В цілому, ефективність зв'язування каліксаренів з мікотоксинами може залежати від конформації та геометричної мобільності каліксарену, раціонального просторового розміщення гідроксильних груп на верхньому вінці, а також кислотно-основних властивостей мікотоксину.

Зв'язування досліджуваних аналітів з поверхнею вкритою шаром калікс[4]резорцинарену ймовірно відбувається за рахунок комплексоутворення за типом "Гість-Господар" між мікотоксином та макроциклом. Задля оцінки просторової будови таких комплексів ми провели моделювання включення токсинів в порожнину калікс[4]резорцинарену 2 з використанням програми "HyperChem 6.03". Для цього, на першому етапі, напівемпіричним методом PM3 розраховували структуру каліксарену (існує у конусоподібній конформації, рис. 2 та мікотоксину [11]. Потім довільними шляхами зближували молекули каліксарену та мікотоксину і розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів методом молекулярної механіки. З поміж різноманіття модельованих структур кожного з комплексів була відібрана структура з найменшою загальною енергією Е. Просторова будова енергетично мінімізованих комплексів представлена на рисунках 4-6.

Можлива будова комплексу калікс[4]резорцинарену 2 з патуліном наведена на рис. 4. В процесі комплексоутворення каліксарен змінює конформацію і утворює порожнину, витягнуту у напрямку сплосчених кілець макроциклу, тобто відбувається підлаштування молекули "Господаря" до геометрії "Гостя". В таку порожнину входить практично плоска біциклічна молекула патуліну. Утворений супрамолекулярний комплекс стабілізується $\text{CH}\cdots\pi$ взаємодіями між CH_2 групою патуліну та найближчим ортогональним кільцем макроциклу (відповідна відстань $\sim 3.9\text{\AA}$) та дисперсійними та сольватобонними взаємодіями.

Атоми водню, які не беруть участь у міжмолекулярних взаємодіях не показані.

Вірогідна будова комплексу калікс[4]резорцинарену 2 з зеараленом

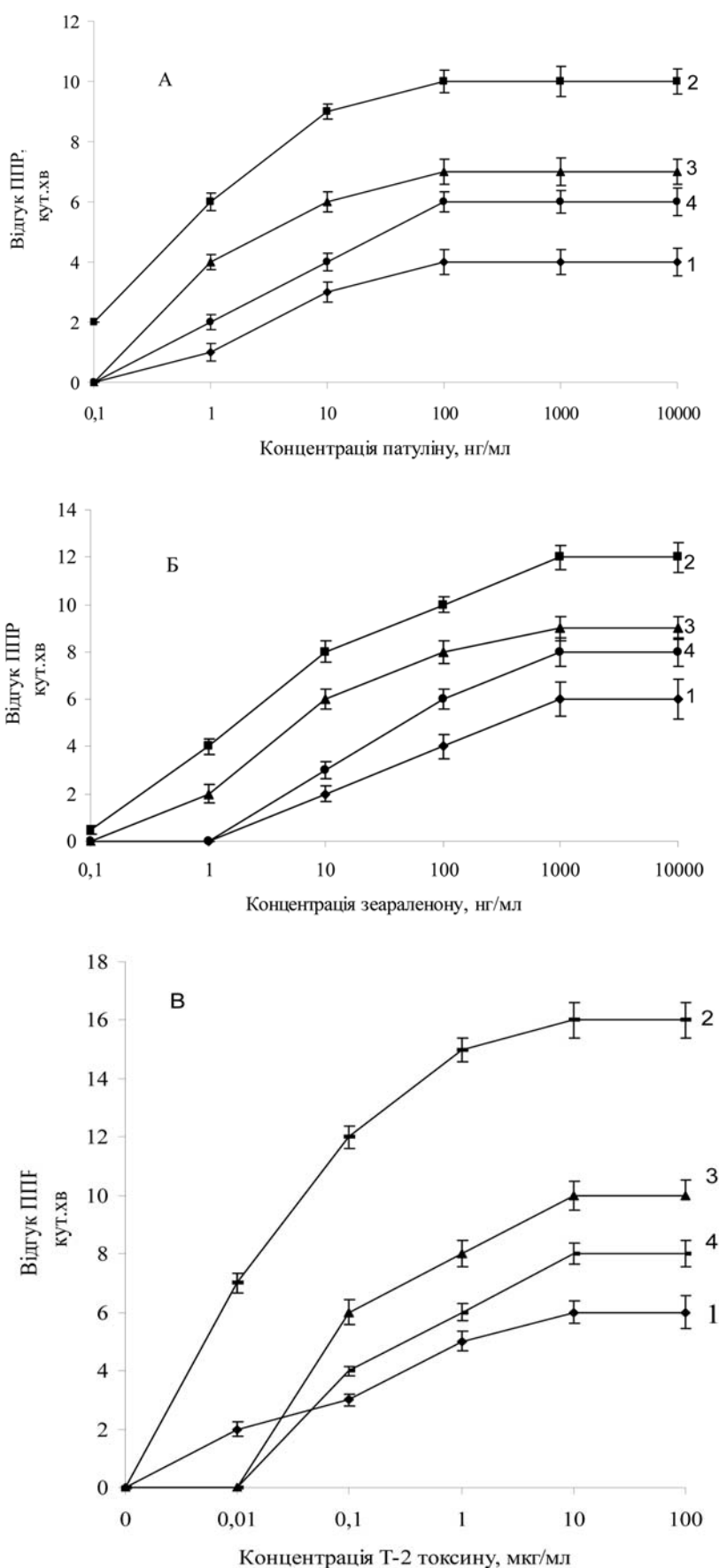


Рис.3. Сенсограми зв'язування патуліну (А), зеараленону (Б) та Т-2 токсину (В) на поверхні золота, покритій каліксаренами 1-4: 1 ($\text{R}=\text{CH}_3$), 2 ($\text{R}=\text{C}_3\text{H}_7$), 3 ($\text{R}=\text{C}_7\text{H}_{15}$), 4 ($\text{R}=\text{C}_{11}\text{H}_{23}$).

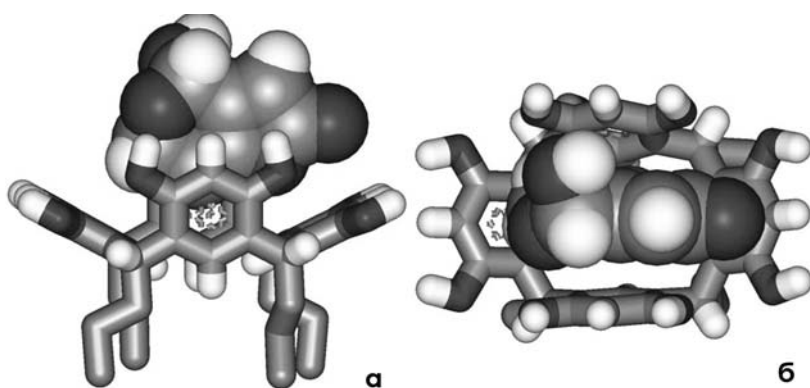


Рис. 4. Латеральна (а) та апікальна (б) проекція комплексу калікс[4]резорцинарену 2 з патуліном. (HyperChem 6.03, MM+). Атоми водню алкільних залишків не показані

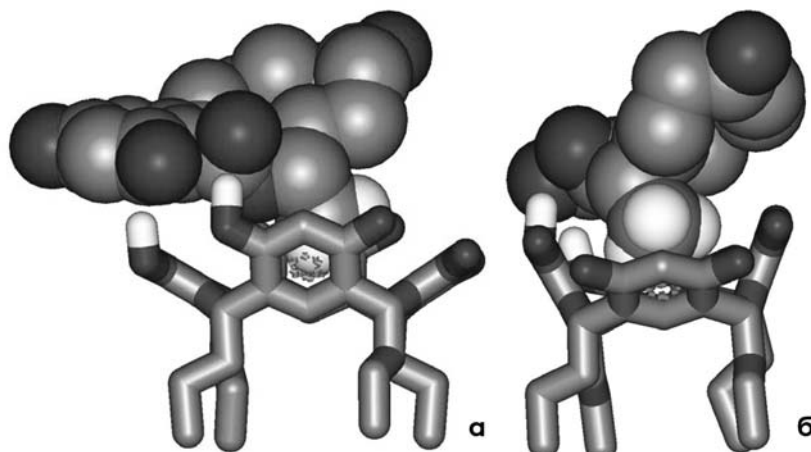


Рис. 5. Дві латеральні (а, б) проекції комплексу калікс[4]резорцинарену 2 з зеараленоном (HyperChem 6.03, MM+).

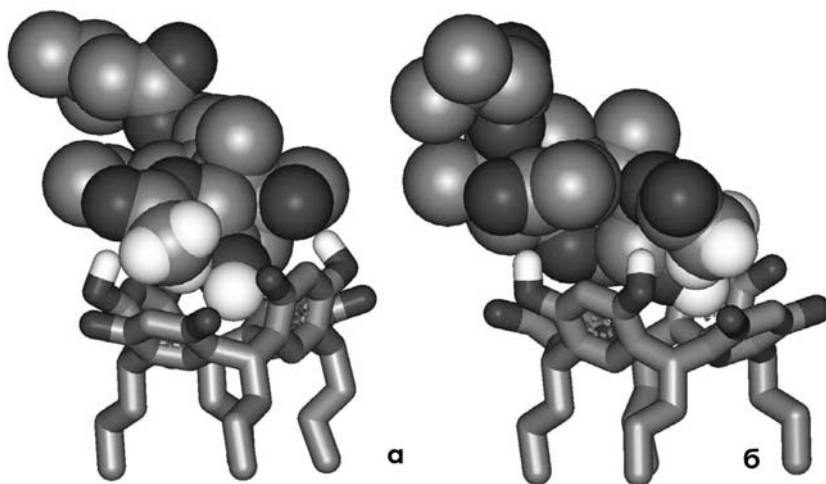


Рис. 6. Дві латеральні (а, б) проекції комплексу калікс[4]резорцинарену 2 з Т-2 токсином (HyperChem 6.03, MM+). Атоми водню, які не беруть участь у міжмолекулярних взаємодіях не показані

ноном наведена на рис. 5. Зеараленон має несиметричну просторову будову з плоским резорциновим кільцем та об'ємним макроциклічним фрагментом. Найменшу енергію має комплекс, де в каліксаренову порожнину включений ме-

тильний залишок. Такий комплекс стабілізований СН- π зв'язками з двома бензольними кільцями макроциклу, водневими зв'язками між гідроксильною групою одного з перпендикулярних кілець макроциклу та карбонільною групою мікотокси-

ну (відстань О...О дорівнює 3.25 Å), а також водневими зв'язками між гідроксильними групами "Гостя" та "Господаря" (відповідна відстань О...О 3.17 Å).

Комплекс калікс[4]резорцинарену з Т-2 токсином зображений на рисунку 6. Т-2 токсин має складну просторову будову, одна з проекцій якої нагадує літеру Т. Токсин досить добре включається в порожнину каліксарену і утворює СН- π зв'язок ацетильного залишку з ортогональним кільцем макроциклу (відстань між площиною ароматичного кільця та Карбоном метильної групи дорівнює 4.30 Å). При цьому спостерігаються чотири водневі зв'язки за участю гідроксильних груп як молекули "Господаря", так і молекули "Гостя" (відстані О...О варіюють в межах 2.88-3.55 Å). В одному з них донором протону є спиртова група мікотоксину, а акцептором кисень перпендикулярного кільця макроциклу. Три інших водневі зв'язки утворені між гідроксилами двох перпендикулярних кілець макроциклу та карбоксильними і етерними атомами кисню Т-2 токсины.

Молекула патуліну, найменша за розмірами та кількістю функціональних груп для зв'язування, зумовлює відгук ППР-сенсора у вузьких межах концентрації: 0,1 – 100 нг/мл і становить 6-9 кут.хв (рис.7, крива 1). Збільшення концентрації патуліну вище 100 нг/мл не приводить до значного зростання отриманого сигналу, оскільки відбувається насичення сенсора. Невелика молекулярна маса патуліну не в змозі зумовити сильний відгук при його зв'язуванні каліксареном. Межа виявлення патуліну становить 0,1 нг/мл. Вона визначалася тією концентрацією токсину, при якій величина відгуку в 3 рази перевищувала рівень шумів нашої системи. Таким чином, для нашого випадку вірогідний результат отримували тоді, коли величина відгуку була не меншою 2 кут.хв. Отримані нами результати узгоджуються з даними, отриманими іншими авторами [12] при імуносенсорному дослідженні афлатоксину В1 та охратоксину А. В цій роботі було показано, що відносно висока концентрація виявлення (5-10 нг/мл) і вузький діапазон визначення, використаних в досліджах мікотоксинів, зумовлені їх маленькою молекулярною вагою (312,3 і 403,8, відповідно).

Мікотоксин зеараленон можна виявляти в концентраціях 0,2-1000 нг/мл (рис.7, крива 2). Порівняльний аналіз даних, отриманих для патуліну, зеараленону та Т-2 токсину показує, що Т-2 токсин, який має найбільшу кількість груп для зв'язування з тетраалкілалікс[4]резорциноларенами, забезпечує найбільш стабільні та відтворювані відгуки сенсора, які досягають середнього значення 16 кут.хв. при концентрації 10 мкг/мл (рис.7, крива 3). Отже насичення каліксаренових рецепторів порівняно великими молекулами Т-2 токсину відбувається в ширшому діапазоні визначуваних концентрацій (1,2 нг/мл — 10 мкг/мл), порівняно з меншими молекулами зеараленону чи патуліну.

Обробка поверхні додекантіолом для всіх досліджуваних мікотоксинів дає значне збільшення відгуку сенсора, як видно з рис. 8. Відсутність алкантіолу на чутливій поверхні зумовлює відгук менший, ніж межа визначення (2 кут.хв), тому застосування додекантіолу є обов'язковим.

Також показано, що збільшення кількості гідроксильних груп на молекулярній платформі калікс[4]резорциноларену від 8 (сполука 4) до 12 (сполука 5) дозволяє ефективніше зв'язувати молекули Т-2 токсину у стійкі комплекси типу "гість-господар" [8]. Порівняльне визначення патуліну та зеараленону каліксаренами 4 та 5 показує, що характер ППР-кривих не змінюється. Найвищий відгук при визначенні патуліну каліксареном 4 становив 6 кут.хв, а каліксареном 5 — 10 кут.хв. Для зеараленону ці значення становили 8 та 12 кут.хв, відповідно (рис.9). Отриманий результат свідчить, що функціоналізація верхнього вінця макроциклу тетраалкілалікс[4]резорциноларенів додатковими гідроксильними групами є перспективним підходом для підвищення чутливості визначення мікотоксинів методом поверхневого плазмонного резонансу.

Таким чином, в роботі показано можливість детектування патуліну, зеараленону та Т-2 токсину методом поверхневого плазмонного резонансу за умов використання каліксаренових модифікаторів поверхні перетворювача. Такий метод є експресним (тривалість 10 хв) та дає можливість селективного виявлення окремих мікотоксинів.

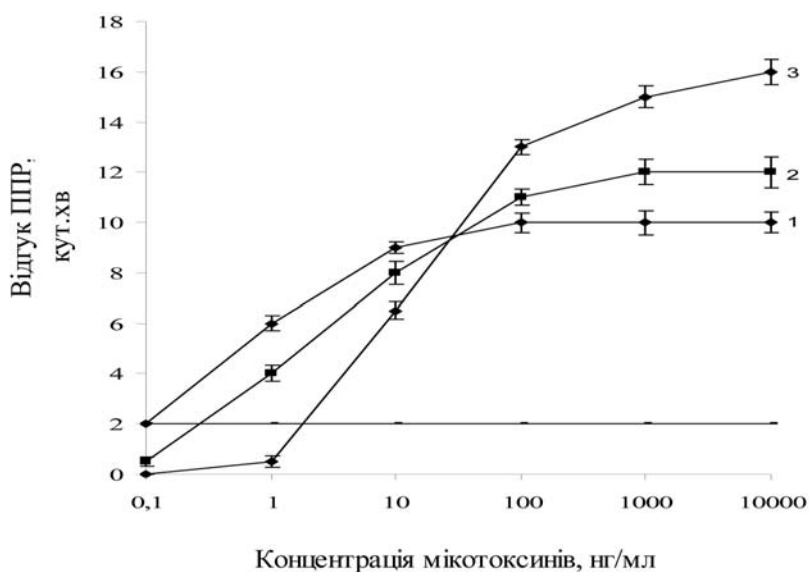


Рис.7. Сенсограми зв'язування патуліну (крива 1), зеараленону (крива 2) та Т-2 токсину (крива 3) на поверхні золота, вкритій тетрапропілалікс[4]резорцинолареном 2

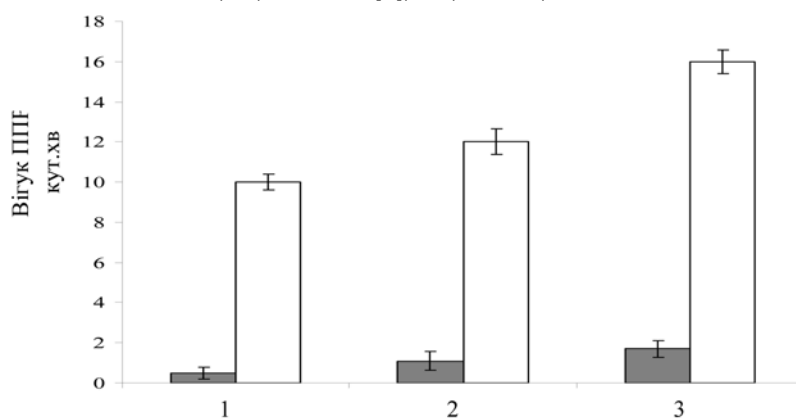


Рис.8. Відгуки сенсорів, покритих каліксареном № 2 на патулін (1), зеараленон (2) та Т-2 токсин (3) при концентрації мікотоксинів 10 мкг/мл. Високі (світлі) стовпчики — модифікована додекантіолом поверхня; низькі (темні) стовпчики — немодифікована поверхня

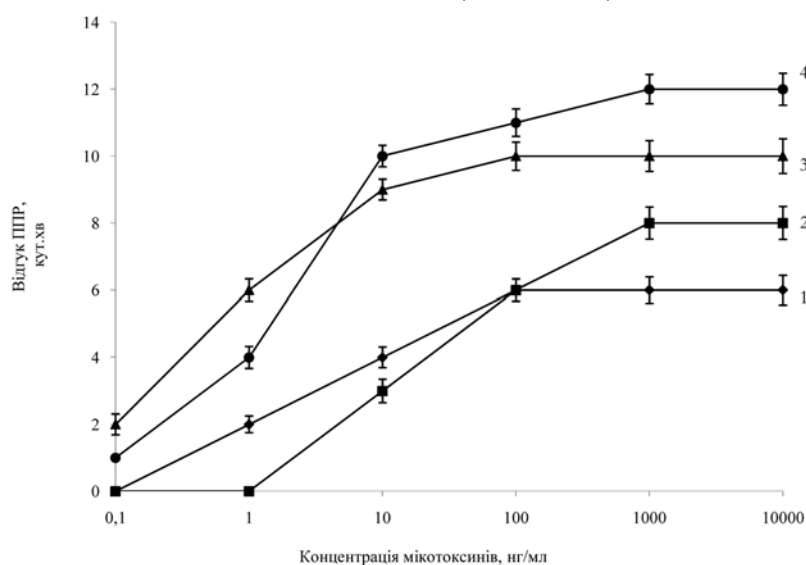


Рис.9. Сенсограми зв'язування патуліну (криві 1,3) та зеараленону (криві 2,4) на поверхні золота, модифікованій каліксаренами 4 і 5: 4-R=C₁₁H₂₃ (криві 1,2) 5-R=C₁₁H₂₃ R'=OH (криві 3,4)

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайченко А. М., Андриенко Е. В., Цыганенко Е. С. Макроциклические трихотеновые микотоксины: биологическая активность // Совр. пробл. токсикол. — 2006. — № 3. — С. 59-66.
2. Katerere D. R., Stockenström S., Thembo K. M., Balducci G., Shephard G. S. Investigation of patulin contamination in apple juice sold in retail outlets in Italy and South Africa // Food Additives & Contaminants: Part A. — 2007. — V. 24, N 6. — P. 630 — 634.
3. Dönike S., Dörs S., Goyarts, H. Valenta T., Ueberschär K.-H., Flachowsky G. Zur Beurteilung des Vorkommens der Fusarium-Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sowie ihrer Metaboliten in physiologischen Substraten des Schweins // Tierärztliche Praxis Großtiere. — 2008. — V. 36, N 1. — P. 35-47.
4. FAO Food and Nutrition Paper 64-Worldwide Regulations for Mycotoxins. 1995. Rome FAO Fiat
5. Артюх В. П., Гойстер О. С., Хмельницкий Г. А., Стародуб Н. Ф. Трихотеновые микотоксины: природа, биотрансформация, биологические эффекты // Совр. пробл. токсикол. — 2002. — №4. — С. 19-26.
6. Артюх В. П., Гойстер О. С., Хмельницкий Г. А., Стародуб Н. Ф. Трихотеновые микотоксины: определение в объектах окружающей среды // Биополимеры и клетка. — 2003. — Т. 19, № 3. — С. 1-8.
7. Hoaa X. D., Kirkb A. G., Tabriziana M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress // Bios. Bioelectronics. — 2007. — V.23, N 2. — P. 151-160.
8. Starodub N.F., Gajster O.S., Shivanjuk O.M., Kalchenko V.I. Modelling specific sites for the determination of endocrine disrupting factors by chemical sensors / Матеріали Міжнародної науково-технічної конференції Panis, 1997. — 43 p.
9. "Сенсорна електроніка і мікросистемні технології. СЕМСТ-3", Одеса, 2-7 червня. — 2008. — С. 82-83.
10. Tunstall L. M., Tucker J. A., Dalcanele E. et al. Host-guest complexation. 48. Octal building blocks for cavitands and carcerands // J. Org. Chem. — 1989. — V. 54, N 6. — P. 1305-1312.
11. Шиванюк О. М. Функціональні калікс [4] арені та калікс[4]резорциноларени в самоорганізації та молекулярному розпізнаванні. Дисертація ... д-ра хім. наук: 20.10.05. — К., 2005. — 312с.
12. Стародуб Н. Ф., Стародуб В. М. Ориентированная иммобилизация узнающих элементов биосенсорных датчиков // Укр. біохім. журн. — 2003. — Т. 75, № 2. — С. 14-24.
13. AdAbyia N., Levkovets I. A., Rodriguez-Gilc S., Ronald A., VAEadia M., Szendr e I. Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A // Bios. Bioelectronics. — 2007. — V. 22, N 6. — P. 797-802.

О. С. Гойстер, Р. В. Родик, В. И. Кальченко, С. В. Дзядевич,
В. И. Назаренко, А. Г. Минченко

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОТОКСИНОВ С ТЕТРААЛКИЛКАЛИКС[4]РЕЗОРЦИНОЛАРЕНАМИ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

Методом поверхностного плазмонного резонанса исследованы субстрат-рецепторные взаимодействия микотоксинов патулина, зеараленона и Т-2 токсина с упорядоченными молекулярными слоями тетраалкилкаликс[4]резорциноларенов, которые нанесены на поверхность золота, модифицированного додекантиолом. Граница определения микотоксинов в водных растворах составляет 0,1 нг/мл для патулина, 0,2 нг/мл - зеараленона, 1,2 нг/мл - Т-2 токсина. Проанализирована зависимость величины отклика ППР-сенсора от химического строения микотоксинов и плотности гидроксильных групп в верхней части тетраалкилкаликс[4]резорциноларенов.

O. S. Gajster, R. V. Rodik, V. I. Kalchenko,
S. V. Dzyadevych, W. I. Nasarenko, A. G. Minchenko

INVESTIGATION OF INTERACTION BETWEEN MYCOTOXINS AND TETRAALKYL CALIX[4]RESORCINARENES BY SURFACE PLASMON RESONANCE

Substrate-receptor interaction between mycotoxins (patulin, zearalenone, T-2 toxin) and well-ordered molecular layers of tetraalkylcalix[4]resorcinarenes deposited on the dodecanethiol coated gold surface were studied by surface plasmon resonance method. The detection limit for patulin, zearalenone, T-2 toxin in aqueous solutions is 0,1 ng/ml, 0,2 ng/ml and 1,2 ng/ml correspondingly. The analysis of SPR sensor response dependence on mycotoxin structure and density of hydroxyl groups on the upper rim of tetraalkylcalix[4]resorcinarenes was conducted