

PACS 87.64.Cc; 87.15.N-; 78.67.Bf; 81.05.ug

Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами алмазов в водных растворах методом динамического рассеяния света

Ю.С.Самсонова, А.В.Приезжев, А.Е.Луговцов, Г.П.Петрова, В.В.Гибизова, И.-Щ.Е, Т.-Х.Су, Е.В.Переведенцева, Ч.-Л.Ченг

Методом динамического светорассеяния исследовано взаимодействие молекул белка альбумина с наночастицами алмазов в водных растворах. Показано, что в результате адсорбции альбумина на наночастицах алмаза образуются частицы больших размеров. Получены концентрационные зависимости среднего гидродинамического радиуса этих частиц. Выявлено, что карбоксилирование поверхности наночастиц алмаза и предварительное покрытие их альбумином приводит к снижению адсорбции молекул белка на поверхности наночастиц и уменьшению их среднего гидродинамического радиуса. Также показано, что в диапазоне концентраций наночастиц алмаза 2–10 мкг/мл их взаимодействие с молекулами альбумина при различных рН имеет разный характер.

Ключевые слова: наночастицы алмаза, сывороточный альбумин, динамическое рассеяние света, фотон-корреляционная спектроскопия, адсорбция, гидродинамический радиус, изоэлектрическая точка.

1. Введение

Наночастицы алмазов благодаря отсутствию у них токсичности и их способности к флуоресценции в настоящее время рассматриваются как потенциально высокоэффективные биомаркеры для биомедицинских приложений [1]. Вследствие малых размеров (5–100 нм) наноалмазы имеют большую удельную площадь поверхности (отношение числа атомов на поверхности вещества к числу атомов в его объеме) (рис.1). Наночастицы алмазов являются продуктом взрыва в специальных детонационных камерах [2, 3] либо их получают методом высокого давления/высокой температуры (НРНТ [3, 4]). Поверхность кристаллов наноалмазов всегда в той или иной степени дефектна, что обусловлено методами их производства и очистки, а поверхностные атомы углерода имеют нескомпенсированные связи, что приводит к высокой поверхностной активности наноалмазов [5]. Именно благодаря этому свойству наночастицы обладают уникальной сорбционной способностью, позволяющей с успехом использовать их в биомедицине при проведении терапии и биомедицинских исследований [6]. В перспективе наноал-

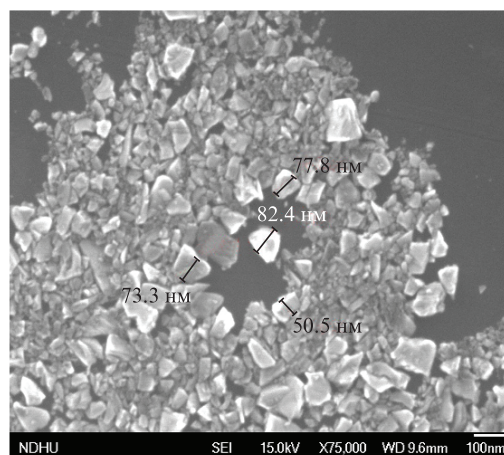


Рис.1. Изображение наноалмазов с характерными размерами 100 нм, полученное методом сканирующей электронной микроскопии.

мазы могут осуществлять доставку лекарственных препаратов к пораженным и модифицированным клеткам (мишеням).

В работах [7,8] отмечено разрушающее воздействие наночастиц алмазов на эритроциты, правда, другие авторы этого эффекта не наблюдают.

В нашей предыдущей работе [9] показано, что при инкубации пробы цельной крови человека с суспензией наночастиц алмазов *in vitro* изменяются микрореологические свойства эритроцитов, в частности изменяются параметры их агрегации и способность к деформации под действием сдвиговых напряжений. Возможные механизмы этого эффекта могут быть основаны на взаимодействии наноалмазов либо непосредственно с эритроцитами, либо косвенно с белками плазмы крови, например с альбумином, который является основным компонентом молекулярной плазмы крови.

Сывороточные альбумины относятся к глобулярным белкам [10]. Общая площадь поверхности молекул альбу-

Ю.С.Самсонова, Г.П.Петрова, В.В.Гибизова. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: us.samsonova@physics.msu.ru

А.В.Приезжев. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет; Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы

А.Е.Луговцов. Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; **Y.-S.Ye, T.-H.Su, C.-L. Cheng.** National Dong-Hwa University, Hualien 974 Taiwan

Е.В.Переведенцева. Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 53; National Dong-Hwa University, Hualien 974 Taiwan

Поступила в редакцию 15 мая 2012 г.

мина очень велика. Альбумин участвует в процессе агрегации эритроцитов и влияет на микрореологические свойства крови [11], он хорошо растворяется в воде и легко диффундирует через стенки сосудов.

Биохимические исследования показали, что у сывороточного альбумина большинство ионизируемых атомных групп находится на поверхности белковой глобулы. Эти группы обуславливают значительный заряд белковой макромолекулы, а следовательно, и ее электростатические свойства в растворе. Молекула альбумина содержит порядка ста пар положительных и отрицательных зарядов. Дипольный момент молекулы человеческого сывороточного альбумина составляет около 500 Д. При изменении рН и ионной силы раствора изменяются структура молекулы белка и ее поверхностный заряд. Изоэлектрическая точка для альбумина находится вблизи рН 4.9 [12].

Целью настоящей работы является изучение взаимодействия молекул альбумина с наночастицами алмаза в водных растворах с помощью динамического рассеяния света. Характер взаимодействия наночастиц с биологическими молекулами и клетками существенно зависит от размера наноалмазов, а также от особенностей их поверхности и, в частности, от наличия на ней тех или иных функциональных групп.

2. Основы метода динамического рассеяния света

Суть метода динамического рассеяния света заключается в следующем [13]: при прохождении лазерного пучка через исследуемую жидкость, содержащую взвешенные дисперсные частицы, часть света квазиупруго взаимодействует с ними. Под действием электрического поля падающей волны заряды в каждой такой частице колеблются, вследствие чего каждая из них оказывается источником вторичной (рассеянной) электромагнитной волны.

Рассеивающие частицы совершают броуновское движение, которое может быть описано уравнением диффузии. Полуширина спектра рассеянного света Γ , а также время корреляции интенсивности рассеянного света T_c связаны с коэффициентом диффузии частиц D соотношениями $\Gamma = Dq^2 = 1/T_c$. При этом $|q| = |q_s - q_i| = (4\pi n/\lambda) \times \sin(\alpha/2)$, где q_i и q_s – волновые векторы падающего пучка и рассеянного света; n – показатель преломления среды; λ – длина волны зондирующего излучения в вакууме; α – угол рассеяния, определяемый положением фотоприёмника относительно направления зондирующего пучка. Отметим, что формула для полуширины спектра верна только в приближении сильно разбавленного раствора, когда многократным рассеянием света можно пренебречь.

Коэффициент диффузии D связан с гидродинамическим радиусом частиц R уравнением Стокса–Эйнштейна:

$$D = k_B T / (6\pi\eta R), \quad (1)$$

где k_B – константа Больцмана; T – абсолютная температура; η – динамическая вязкость растворителя. Хотя формула (1) получена для рассеивающих частиц сферической формы, она применима также к частицам произвольной формы, которые являются оптически изотропными и имеют достаточно малые размеры для того, чтобы амплитуду рассеяния можно было считать не зависящей от ориентации рассеивающей частицы. Эффективный гидродинамический радиус не обязательно в точности соответ-

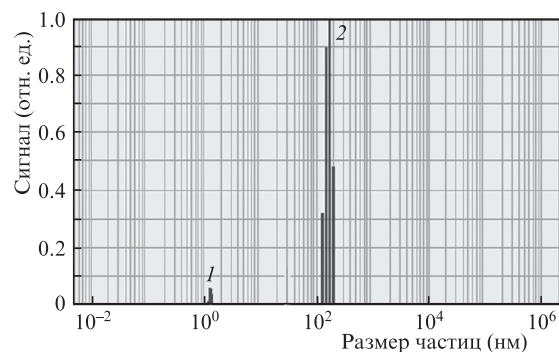


Рис.2. Распределение составляющих двухкомпонентного раствора по размерам: 1 – размер молекулы альбумина; 2 – ассоциат наночастицы алмаза и молекулы альбумина.

ствует размерам рассеивающей частицы. Даже для сферических рассеивающих частиц гидродинамический радиус обычно должен быть больше, чем физический размер «сухой» частицы, вследствие возникновения оболочки из молекул растворителя, движущейся вместе с рассеивающей частицей [11].

Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в корреляционной функции интенсивности рассеянного света. Можно показать [14], что в приближении не взаимодействующих сферических частиц автокорреляционная функция интенсивности экспоненциально спадает во времени, и характерное время спада однозначно связано с D . Сигнал с выхода фотоприемника обрабатывается цифровым коррелятором. Связь флуктуаций интенсивности оптического сигнала (поля) с флуктуациями измеряемого фототока находится с помощью соотношения Зигерта:

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + |g^{(1)}(\tau)|^2, \quad (2)$$

где $g^{(2)}(\tau)$ – нормированная корреляционная функция интенсивности рассеянного света; $g^{(1)}(\tau)$ – нормированная автокорреляционная функция поля. Важность соотношения Зигерта заключается в том, что оно позволяет вычислить спектральные характеристики первого порядка по функции $g^{(2)}(\tau)$, которая может быть измерена с учетом специфики процесса детектирования. Измерить $g^{(2)}(\tau)$ непосредственно невозможно, и необходимо находить корреляцию последовательности фотоэлектронов, испускаемых фотокатодом, когда на него падает световой сигнал с определенной интенсивностью. Измеряя корреляционную функцию сигнала в виде дискретной последовательности импульсов на выходе детектора и используя соотношение (2), можно вычислить спектральные характеристики оптических сигналов [13].

Обратная задача – определение распределений частиц по коэффициентам диффузий – решается методом регуляризации Тихонова (метод минимизации функционала) [15]. Полученные значения коэффициента диффузии позволяют вычислить средний размер частиц по формуле (1) или распределение дисперсных частиц по размерам (гидродинамическим радиусам) (рис.2).

3. Экспериментальные установки

Измерения проводились с помощью спектрометров динамического рассеяния света: Photocor-F (Россия) [16], в котором используется диодный лазер (647 нм), и DLS

VI-200SM (Brookhaven, США) [17] с твердотельным лазером (532 нм) с диодной накачкой. В обоих спектрометрах для обработки сигналов используются цифровые автокорреляторы, позволяющие определить функцию автокорреляции и коэффициенты диффузии.

Сфокусированный пучок лазерного излучения проходит через кювету с исследуемым раствором. Рассеянный под углом 90° свет регистрируется ФЭУ, выходной сигнал которого в виде последовательности фотоотсчетов обрабатывается на компьютере (рис.3). В кювете с исследуемым раствором поддерживается постоянная температура (20°C) при помощи встроенного в прибор термостата.

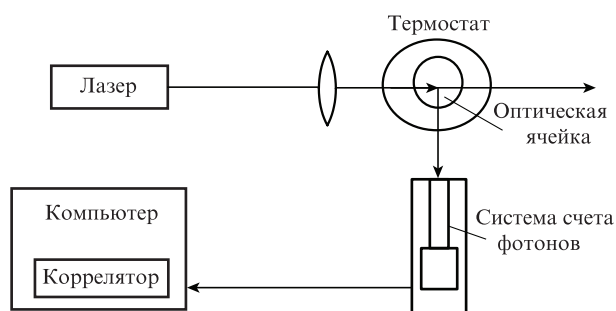


Рис.3. Схема спектрометра динамического рассеяния света.

Обработка сигнала, длительность и число выборок которого устанавливаются экспериментатором, включает в себя построение и усреднение автокорреляционных функций, а затем решение обратной задачи определения коэффициентов диффузии и гидродинамических радиусов рассеивающих частиц по формуле (1). В наших типичных экспериментах длительность выборок составляла 20 с, их число равнялось 10.

Для проведения калибровочных измерений размеров использовались эталонные рассеивающие частицы латекса полистерола, паспортный размер которых был 120 нм. Погрешность таких измерений составила 1%–5%, тогда как их паспортный разброс был равен 1%–2%. В серии экспериментов с наночастицами и водными растворами альбуминов погрешности измерений составили 10%–25%, что обусловлено, главным образом, довольно значительным разбросом размеров рассеивающих частиц.

4. Материалы

В работе использовались человеческий сывороточный альбумин (Sigma, США) и наночастицы алмаза с характерными размерами 5 нм (5ND) и 100 нм (100ND) (General Electric, США). По сравнению с тестовыми частицами латекса полистерола (Sigma) распределение по размерам 5ND и 100ND существенно более широкое (см. рис.1), что повышает погрешность измерений и затрудняет интерпретацию результатов исследования взаимодействия частиц. Такое широкое распределение по размерам объясняется способом получения наночастиц и агрегацией самих наночастиц.

Для измерений использовались три различных образца наночастиц: без функционализации поверхности (ND), с функционализацией поверхности карбоксильными группами (сND) и покрытые слоем молекул человеческого сывороточного альбумина (ND + HSA). Наночастицы сND были карбоксиллированы путем обработки смесью кислот $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3 = 1:3$, что способствовало образованию

поверхностных карбоксильных COOH -групп [18]. Частицы наночастицы, покрытые слоем альбумина (ND + HSA), готовились методом [9], в основе которого также лежит адсорбция белка на поверхности наночастиц. Раствор альбумина с концентрацией 40 мг/мл смешивался с водной суспензией наночастиц с концентрацией 4 мг/мл в пропорции 1:1. После тщательного перемешивания в течение двух часов смесь центрифугировалась и наночастицы с адсорбированным на поверхности белком отделялись. Осадок отмывался в дважды дистиллированной воде для удаления раствора неадсорбированного или слабо связанного с поверхностью наночастицы белка. Ранее было показано [9, 18], что таким методом формируется стабильный комплекс наночастица–белок.

5. Приготовление образцов

В экспериментах концентрация человеческого сывороточного альбумина (HSA) в физрастворе составила 40 мг/мл, а концентрации наночастиц трех видов были следующими: ND 100 нм – 4 мкг/мл, сND 5 и 100 нм – 2–10 мкг/мл, ND + HSA 100 нм – 4 мкг/мл.

Водородный показатель среды pH варьировался с помощью добавления малых количеств уксусной кислоты CH_3COOH или щелочи KOH. При $\text{pH} < \text{pI}$ (изоэлектрическая точка) заряд альбумина становится положительным, при $\text{pH} > \text{pI}$ – отрицательным.

При приготовлении образцов во всех случаях использовалась дистиллированная вода (ОАО «Новосибхимфарм») с pH 7.0. Измерения проводились при температуре 20°C .

6. Результаты экспериментов

6.1. Агрегация молекул альбумина при изменении pH водного раствора

Вначале были проведены измерения зависимости размеров молекул белка альбумина от pH. При этом был взят водный раствор HSA в концентрации 40 мг/мл (в такой концентрации он содержится в крови человека). Основываясь на приведенных выше теоретических данных, мы провели эксперименты с водным раствором альбумина при трех различных значениях pH: 3.9, 4.9 и 7.4 (рис.4).

Видно, что при pH 4.9, когда молекула альбумина в целом электронейтральна, размеры агрегатов максимальны и составляют ~ 10 нм. При удалении от изоэлектрической точки в сторону уменьшения pH каждая молекула в растворе в целом становится положительно заряженной, что приводит к возникновению сил отталкивания. В нашем эксперименте при pH 3.9 размеры агрегатов молекул существенно уменьшились и составили ~ 5 нм. При удалении от изоэлектрической точки в сторону увеличения pH молекулы альбумина приобретают отрицательный заряд, что также вызывает возникновение сил отталкивания. Измерения, проведенные при pH 7.4, показали, что агрегация молекул отсутствует. В этом случае в водном растворе находятся свободные молекулы альбумина с гидродинамическим радиусом ~ 2.5 нм. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что при большем удалении pH от изоэлектрической точки заряд каждой молекулы по модулю в целом растет, а значит и силы отталкивания между отдельными молекулами уве-

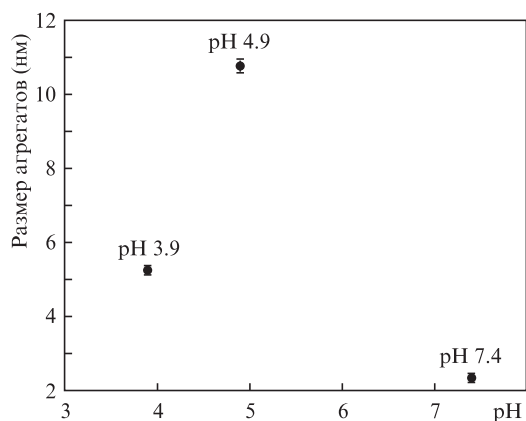


Рис. 4. Зависимости размеров агрегатов молекул альбумина от pH.

личиваются, т.е. размеры агрегатов становятся все меньше. Наибольший интерес представляют результаты, полученные при pH 7.4, поскольку такое значение водородного показателя характерно для крови человека. При данном pH молекулы альбумина не образуют агрегатов, и размер 2.5 нм является характерным для данного белка [19].

6.2. Зависимость размеров ассоциатов альбумина и наноалмазов от pH раствора

Была исследована зависимость размеров образующихся ассоциатов от pH раствора (рис. 5). Данные приведены для водного раствора HSA с концентрацией 40 мг/мл при добавлении наночастиц ND 100 нм с концентрацией 4 мкг/мл. Измерения проведены при pH водного раствора 3.9, 4.9 и 7.4. Поскольку ζ -потенциал наноалмазов при данных pH не меняется и остается отрицательным ($-40 \dots -50$ мВ), взаимодействие между наночастицами мало.

Если считать, что главным механизмом адсорбции альбумина на наноалмазах является их электростатическое взаимодействие, то полученная зависимость позволяет сделать следующие выводы. В случае pH 3.9 наноалмазы имеют отрицательный потенциал, а заряд молекул белка в целом положительный; вследствие этого они сильно взаимодействуют и средние размеры ассоциатов весьма велики (~ 312 нм). В случае pH 4.9 наноалмазы по-прежнему имеют отрицательный потенциал, а у альбумина при таком pH поверхность в целом электронейтральна (изоэлектрическая точка). Поэтому адсорбция имеет место, но она не такая сильная, как в случае pH 3.9, и средние размеры ассоциатов достигают лишь ~ 256 нм. При pH 7.4 потенциал наноалмазов по-прежнему отрицателен, как и, в целом, потенциал белков. Но поскольку распределение зарядов в молекулах неравномерное, то взаимодействие, хотя и более слабое, также может иметь

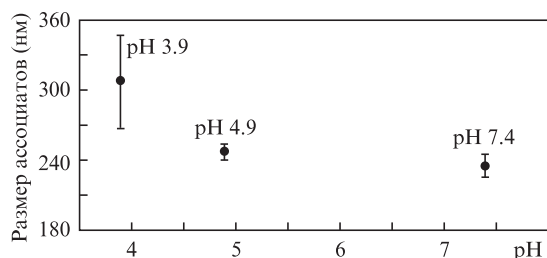


Рис. 5. Зависимости размеров ассоциатов наноалмазов 100 нм и молекул альбумина от pH.

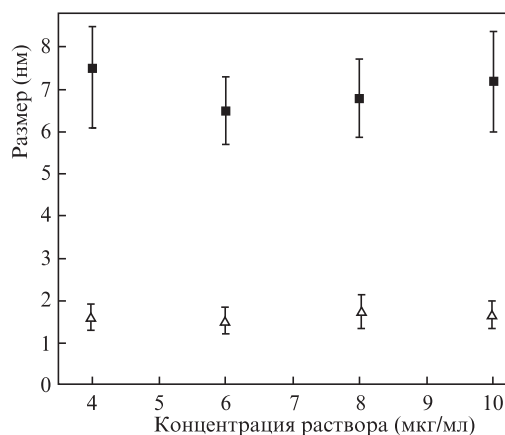
место. При этом размеры ассоциатов не превышают ~ 236 нм.

6.3. Концентрационная зависимость размеров ассоциатов наночастиц алмаза и молекул альбумина

Для проведения первой серии экспериментов с наночастицами алмаза был приготовлен водный раствор альбумина с нейтральным pH 7.0 и суспензии наночастиц размером 5 нм, имеющих карбоксилированное покрытие. Исследовалась концентрационная зависимость ассоциатов при концентрациях 4, 6, 8 и 10 мкг/мл (рис. 6). В растворах присутствуют свободные молекулы альбумина, характерные размеры которых в среднем составляют 1.7 ± 0.3 нм. Это обусловлено большой концентрацией альбумина в растворе ($C = 40$ мг/мл), в 1000 раз превышающей концентрацию в нем наноалмазов. Кроме того, в растворах присутствует еще один компонент, предположительно – ассоциат наночастицы алмаза и нескольких молекул альбумина, поскольку его размер равен в среднем 6.7 ± 1.2 нм. Таким образом, молекулы альбумина адсорбируются на поверхности наноалмазов, причем в случае частиц 5 нм адсорбированный слой имеет толщину порядка размера одной молекулы альбумина. Все это позволяет сделать вывод о наличии взаимодействия между этими частицами. Причем, вероятно, данное взаимодействие не зависит от концентрации наноалмазов (в области концентраций 4–10 мкг/мл), поскольку при ее росте размер ассоциатов не увеличивается (рис. 6).

Аналогичные исследования были проведены с карбоксилированными наноалмазами, имеющими средний размер 100 нм при pH 7.0 (рис. 7). Измерения показали, что в растворе, кроме молекул альбумина, присутствует компонент со средним размером 147 ± 23 нм. Вероятно, эти образования представляют собой наноалмазы, покрытые слоем молекул альбумина, причем этот слой имеет толщину порядка 20–25 размеров молекул альбумина. При изменении концентрации взаимодействие не усиливается, поскольку в пределах погрешности размеры ассоциатов более не увеличиваются.

Таким образом, характер взаимодействия наночастиц с молекулами альбумина существенно зависит от размера наноалмазов. С увеличением размеров частиц наноалмаза на их поверхности растет адсорбционный слой белка альбумина.

Рис. 6. Зависимости размеров составляющих двухкомпонентного раствора от концентрации (■ – ассоциаты наноалмазов 5 нм и молекул альбумина, Δ – свободные молекулы альбумина).

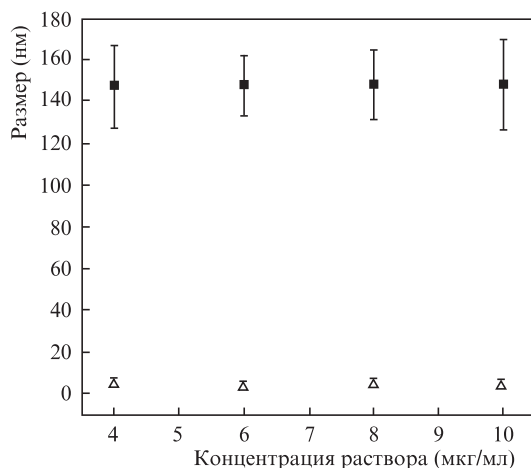


Рис.7. Зависимости размеров составляющих двухкомпонентного раствора от концентрации (■ – ассоциаты наноалмазов 100cND и молекул альбумина, △ – свободные молекулы альбумина).

6.4. Зависимость размеров ассоциатов от поверхностных свойств наноалмазов

Были проведены эксперименты с наноалмазами размером 100 нм, имеющими три различных вида поверхности: не функционализированные, карбоксилированные и заранее покрытые слоем альбумина. Из рис.8 видно, что ассоциаты, образованные нефункционализированными наноалмазами и молекулами альбумина, имеют наибольший размер. С появлением функционального покрытия размеры ассоциатов сильно уменьшаются. Наночастицы, заранее покрытые слоем альбумина, при взаимодействии с его молекулами образуют ассоциаты минимального размера. Заметим, что частицы наноалмазов, покрытые молекулами альбумина, взаимодействуют с клетками испытуемых организмов в меньшей степени [20]. Таким образом, свойства поверхности наночастиц алмаза сильно влияют на их взаимодействие с другими компонентами раствора.

Наночастицы, покрытые альбумином, слабее взаимодействуют с молекулами альбумина, в то время как наноалмазы без покрытия взаимодействуют с ними более сильно, что объясняет изменения относительных размеров образующихся ассоциатов.

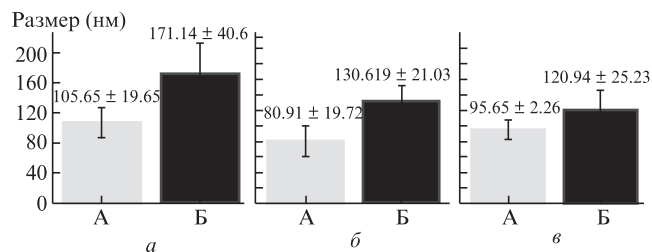


Рис.8. Размеры наночастиц алмаза 100ND (а), 100cND (б) и 100ND + HSA (в) до (А) и после (Б) взаимодействия с альбумином.

7. Выводы

Методом динамического светорассеяния измерены эффективные гидродинамические радиусы молекул человеческого сывороточного альбумина и наночастиц алмаза в водных растворах. Выявлено наличие взаимодействия между исследуемыми наноалмазами и молекулами альбумина, а также отсутствие концентрационной зависимости взаимодействия в области концентраций наноалмазов 2–10 мкг/мл, которые в дальнейшем предполагается вводить в кровь. Обнаружено, что на характер и силу взаимодействия наноалмазов с альбумином существенно влияют параметры самих наночастиц, их размеры и покрытие. Сила взаимодействия явным образом зависит от pH раствора, что доказывает мысль о том, что главным механизмом адсорбции альбумина на наноалмазах является их электростатическое взаимодействие.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 08-02-92002-ННС и грантом ННС Тайваня № NSC 97-2923-M-259-001-MY3.

1. Krueger A. *Chem. Eur. J.*, **4**, 1382 (2008).
2. Пузырь А.П., Бондарь В.С. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью. Авт. свид. № 2003119416/15 14 (2005).
3. Mochalin V.N., Shenderova O., Ho D., Gogotsi Y. *Nature Nanotechnol.*, **7**, 11 (2012).
4. Долматов В.Ю., Веретенникова М.В., Марчуков В.А., Сущев В.Г. *ФТТ*, **46**, 596 (2004).
5. Cheng C.L., Perevedentseva E.V., Lugovtsov A.E., Priezhev A.V. *Proc. Intern. Symp. on Topical Problems of Biophotonics* (N.Novgorod, 2011, p. 131).
6. Ho Ed. D. *Nanodiamonds. Applications in Biology and Nanoscale Medicine* (New-York-Dordrecht-Heidelberg-London: Springer, 2010, p. 286).
7. Пузырь А.П., Нешумаев Д.А., Тарских С.В. *Биофизика*, **50**, 101 (2005).
8. Пузырь А.П., Тарских С.В., Макарская Г.В. *Докл. РАН*, **43**, 561 (2002).
9. Priezhev A.V., Lugovtsov A.E., Ionova V.G., Samsonova Yu.S., Cheng C.L., Perevedentseva E.V. *Proc. Intern. Symp. on Topical Problems of Biophotonics* (N.Novgorod, 2011, p. 180).
10. Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. *Методы в молекулярной биофизике* (М.: изд. Книжный дом «Университет», 2009, т. 1, с. 67).
11. Нейрат Г., Бейли К. *Белки* (М.–Л.: ИЛ, 1958).
12. Oliva F.Y., Avalle L.B., Cámara O.R., De Pauli C.P. *J. Coll. Interface Sci.*, **261**, 299 (2003).
13. Камминс Г.З., Пайк Э.Р. *Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов* (М.: Мир, 1978).
14. Вережников В.Н., Пояркова Т.Н., Сергеева М.Н., Шабанова Н.А. *Химия и химическая технология*, **51**, 9 (2008).
15. Тихонов А. Н., Арсенин В. Я. *Методы решения некорректных задач* (М.: Наука, 1979).
16. <http://www.photocor.ru/dls-instrument/>.
17. http://www.brookhaveninstruments.com/products/molecular_weight/p_MW_BI-200SM.html.
18. Chung P.-H., Perevedentseva E., Tu J.-S., Chang C. C., Cheng C.-L. *Diamond and Related Mater.*, **15**, 622 (2006).
19. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тэн Д.И. *Квантовая электроника*, **32** (10), 897 (2002).
20. Tzeng Y.-K., Faklaris O., Chang B.-M., Kuo Y., Hsu J.-H., Chang H.-Ch. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 2262 (2011).