

УДК 535.32

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИХ ЧАСТИЦЫ МЕЗОПОРИСТОГО КРЕМНИЯ

© 2013 г. К. А. Аненкова, Г. П. Петрова, В. В. Гибизова, Л. А. Осминкина, К. П. Тамаров

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

E-mail: ksushik_1989@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2012 г.

Изучено взаимодействие молекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) с кремниевыми наночастицами (NPSi) в их водных растворах при различных значениях pH. Данные фотоннокорреляционной спектроскопии, а также ИК спектроскопии исследуемых растворов указывают на отсутствие взаимодействия между БСА и NPSi в диапазоне pH 3–7, о чем свидетельствуют характер экспериментально полученных зависимостей коэффициентов диффузии (D_f) от pH и отсутствие водородных связей между карбонильными группами белка и OH-группами на поверхности наночастиц мезопористого кремния. Полученные данные могут играть ключевую роль при использовании кремниевых наночастиц *in vivo*.

DOI: 10.7868/S0030403413080023

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине активно ведутся работы по исследованию свойств различных типов наночастиц для их дальнейшего применения при диагностике и лечении заболеваний. Использование кремниевых наночастиц для этих целей имеет существенные преимущества, обусловленные свойствами их биосовместимости и биodeградации [1–4].

В теле здорового человека массой 70 кг в норме содержится около 1 г кремния, что делает кремний одним из наиболее распространенных микроэлементов в организме человека [5]. В организме человека кремний отвечает за обеспечение защитных функций, процессы обмена веществ и детоксикации.

Создание биологически активных нанокomпозитных материалов на кремниевой основе дало толчок многочисленным исследованиям применения этого элемента для лечения и диагностики различных заболеваний. Было установлено, что наночастицы кремния могут быть использованы в качестве фотосенсибилизаторов синглетного кислорода и соносенсибилизаторов ультразвука [3], что открывает возможность их использования для терапии онкозаболеваний.

В настоящее время особое внимание уделяется вопросам адресной доставки наночастиц к пораженным клеткам, при этом в большинстве случаев используется доставка наночастиц через кровеносную систему. Попадание частиц в кровоток может повлечь за собой их транспорт через все тело и накопление в конкретных органах [6]. Хотя биорастворимый кремний и выводится из организма в виде ортокремниевой кислоты, нужно

исключить возможность образования агрегатов белок + кремний непосредственно в плазме крови. Поэтому необходимо исследовать взаимодействие наночастиц кремния с основными белками сыворотки крови, особенно с альбумином, одной из основных функций которого является транспорт веществ.

Эти исследования могут быть проведены методами рассеяния света и инфракрасной (ИК) спектроскопии. Сравнивая значения параметров светорассеяния для систем вода + частицы кремния + белок, вода + кремний, вода + белок и сопоставляя их ИК спектры, можно судить о наличии или отсутствии агрегатов — нанокластеров, которые могут образоваться в результате взаимодействия макромолекул альбумина и наночастиц кремния.

МЕТОД ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Молекулярные движения макромолекул протеинов и их агрегатов под воздействием тепловой энергии определяют динамику флуктуаций интенсивности рассеянного света в исследуемых системах. Эти движения представляют собой комбинацию трансляционной и вращательной диффузий, характер которых зависит от эффективных размеров и формы рассеивающих макромолекул, а также от их межмолекулярного электростатического взаимодействия, обусловленного величиной и характером пространственного распределения зарядовых центров на поверхности молекулы [7, 8].

Метод динамического рассеяния лазерного света (фотоннокорреляционная спектроскопия)

позволяет определить автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света. При дальнейшей обработке становится возможным получение искомого распределения размеров частиц или распределения коэффициентов трансляционной диффузии. Флуктуации интенсивности рассеянного света возникают из-за неоднородности диэлектрической проницаемости среды. В жидкости они напрямую связаны с флуктуациями локальной концентрации частиц, обусловленными броуновским движением макромолекул.

В простейшем случае монодисперсного раствора, содержащего невзаимодействующие сферические частицы одного размера, можно показать, что спектр мощности фототока представляет собой лоренцову кривую [8] с полушириной Γ , а корреляционная функция интенсивности — экспоненту с временем релаксации $\tau_{\text{рел}} = 1/\Gamma$:

$$g^{(2)}(t) = pe^{-2\Gamma t} + 1. \quad (1)$$

Коэффициент Γ связан с физическими параметрами среды и условиями эксперимента следующим образом:

$$\Gamma = q^2 D_t, \quad (2)$$

$$q = k_i - k_s = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2), \quad (3)$$

$$D_t = KT/6\pi\eta R_H, \quad (4)$$

где k_i — волновой вектор падающего излучения, k_s — волновой вектор рассеянного излучения, D_t — коэффициент трансляционной диффузии рассеивающих частиц, n — показатель преломления среды, λ — длина волны рассеянного излучения, θ — угол рассеяния, T — абсолютная температура среды, K — постоянная Больцмана, η — вязкость раствора, R_H — гидродинамический радиус частицы.

В случае полидисперсных растворов, когда размеры частиц различаются, спектр фототока представляет собой непрерывное множество (интеграл) лоренцовых кривых с разными полуширинами. Следовательно, для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную спектральную задачу в виде интегрального уравнения с лоренцовым ядром:

$$g^{(2)}(t) = [g^{(1)}(t)]^2 + 1 + \zeta(t), \quad (5)$$

$$g^{(1)}(t) = \int_0^\infty P(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma, \quad (6)$$

где $g^{(1)}(t)$ — нормированная автокорреляционная функция сигнала, $g^{(2)}(t)$ — нормированная автокорреляционная функция интенсивности, $\zeta(t)$ — ошибка, связанная не с погрешностью измерения фототока или шумами регистрирующего тракта, а со стохастической природой самого сигнала [8].

Если пренебречь влиянием постоянного экспериментального шума $\zeta(t)$, уравнение (5), известное как соотношение Зигерта, позволит вычислить $g^{(1)}(t)$ через $g^{(2)}(t)$, накапливаемую коррелятором во время эксперимента.

Интегральное уравнение (6) формирует основной принцип обработки данных в методе фотоннокорреляционной спектроскопии. Это уравнение относительно $P(\Gamma)$ — интегральное уравнение Фредгольма первого рода, известное в математике как некорректно поставленная задача, т.е. задача с принципиально отсутствующим алгоритмом нахождения точного решения. В связи с этим разрабатываются различные приближенные методы решения, многие из которых дают весьма хорошие результаты.

В проводимых экспериментах обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения DYNALS, в котором поиск приближенного решения (6) осуществляется с помощью метода регуляризации А.Н. Тихонова для интегральных уравнений [8].

МЕТОДИКА СПЕКТРОСКОПИИ

Метод ИК спектроскопии, основанный на исследовании колебательных и вращательных переходов в молекулах, дает возможность получить, в частности, наглядное представление о химическом составе вещества [9]. Колебательно-вращательный спектр вещества определяется строением его молекул. Число и частоты полос поглощения ИК излучения в спектре зависят от числа образующих молекулу атомов, масс атомных ядер, геометрии и симметрии равновесной ядерной конфигурации и потенциального поля внутримолекулярных сил. Любая молекула имеет присущий только ей колебательный спектр, состоящий из набора полос разной частоты и интенсивности.

Экспериментальное определение характеристических частот позволяет, не производя никаких дополнительных расчетов, определять по спектру присутствие в молекуле различных групп и связей, и тем самым устанавливать строение молекулы [10].

ПОДГОТОВКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

Кремниевые наночастицы NPSi получались механическим водным измельчением пленок мезопористого кремния в планетарной мельнице FRITSCH Pulverisette 7 в течение 30 мин в соответствии с методикой работы [2]. Пленки мезопористого кремния формировались стандартным методом электрохимического травления пластин кристаллического кремния (с-Si) проводимости *p*-типа с ориентацией поверхности (100) и удельным сопротивлением 25 мОм см в растворе HF(50%) : C₂H₅OH при плотности тока травления 60 мА/см².

Исходные концентрации NPSi в их водных растворах составляли 1 г/л. Для выделения наночастиц необходимых размеров были взяты верхние фракции растворов, которые затем подвергались обработке в ультразвуковой ванне с частотой 30 кГц в течение четырех минут. После этого растворы пропускали через фильтр с диаметром ячейки 450 нм. Итоговые концентрации NPSi составляли 0.002 мг/мл.

После фильтрации в водные растворы NPSi добавлялся водный раствор БСА, концентрация которого составляла 0.5 мг/мл. Эксперименты по определению коэффициента диффузии динамическим методом проводились на оптической установке Photocor-FC, в которой используется диодный лазер с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВ. В кювете с исследуемым раствором поддерживается комнатная температура (20°C) при помощи встроенного в прибор термостата [11].

Инфракрасные спектры образцов снимались с использованием приставки многократно нарушенного полного внутреннего отражения. Для этого изучаемые водные растворы помещались на приставку, высушивались на ней в течение получаса при температуре 40°C. Измерительная камера вакуумировалась до 10⁻³ Торр.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом динамического рассеяния света были получены экспериментальные зависимости коэффициентов трансляционной диффузии рассеивающих центров D_t от значений pH в исследуемых растворах (рис. 1–3). Уровень pH 4.9 соответствует изоэлектрической точке для белка альбумина, pH 7.0 – нейтральной среде [7].

Исходя из полученных данных был рассчитан коэффициент межмолекулярного взаимодействия B для БСА (рис. 4). Связь между параметрами D_t и B задается следующей формулой:

$$D_t = D_0 \{ 1 + (2BM - [\eta])c \}. \quad (7)$$

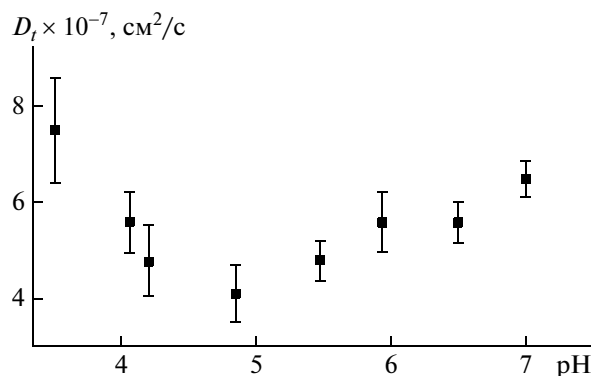


Рис. 1. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH для БСА.

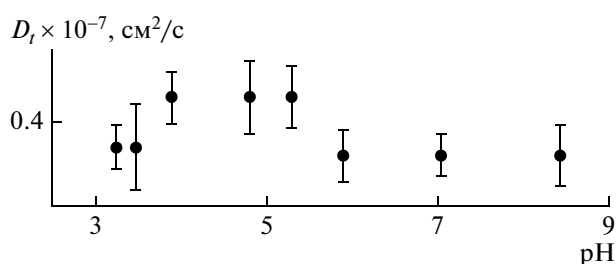


Рис. 2. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH для NPSi.

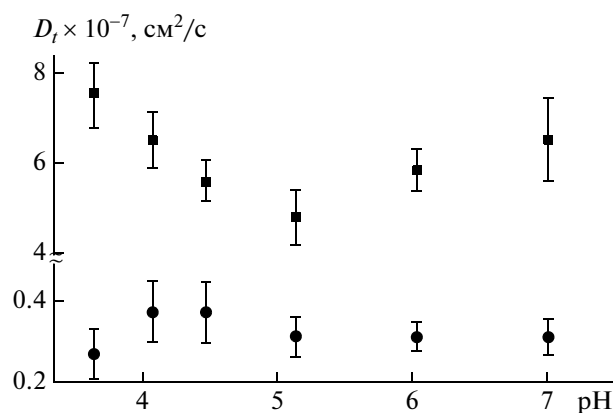


Рис. 3. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH для водного раствора смеси БСА и NPSi: квадраты – БСА, кружки – NPSi.

Здесь $[\eta]$ – характеристическая вязкость (иначе – предельное значение вязкости), определяемое относительным изменением вязкости раствора при добавлении полимера [12]. Характеристическая вязкость определяется соотношением

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} c^{-1} \frac{(\eta - \eta_s)}{\eta_s}, \quad (8)$$

где η – вязкость раствора, η_s – вязкость растворителя, c – концентрация полимера в растворе.

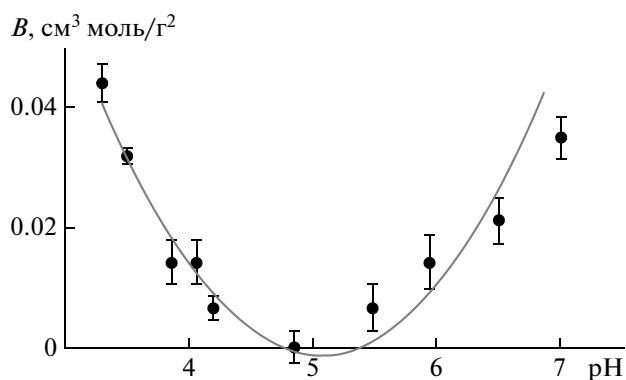


Рис. 4. Зависимость коэффициента межмолекулярного взаимодействия от pH для БСА: кружки — эксперимент, сплошная кривая — расчет.

Бликий к параболическому характер зависимости, представленных на рис. 1–4, согласуется с теорией Скэтчарда [13]. Согласно данной теории парные взаимодействия в растворах частиц, содержащих кроме низкомолекулярного растворителя еще и третью компоненту — сильный электролит, описываются вторым вириальным коэффициентом в разложении для свободной энергии:

$$B = \frac{V_1}{M_2^2} \left(\frac{Z^2}{4m_3} + \frac{\beta_{22}}{2} - \frac{\beta_{23}^2 m_3}{4 + 2\beta_{33} m_3} \right). \quad (9)$$

Здесь V_1 — удельный объем растворителя, Z — заряд макроиона, M_2 — масса макроиона, m_3 — концентрация ионов соли. Параметры β_{ij} характери-

зуют различные взаимодействия между ионами в растворе — эффект исключенного объема и взаимодействие между парами ионов (индекс 2 — макромолекула белка, 3 — ион соли).

Коэффициент взаимодействия B меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке. Параметр β_{22} обычно незначителен, а третий член в (9) может принимать достаточно большие значения. Таким образом, при существенной концентрации соли в растворе коэффициент B может стать отрицательным. При возрастании ионной силы (m_3) вокруг заряженной молекулы белка в растворе возникает облако противоионов, экранирующее кулоновские взаимодействия. Коэффициент B уменьшается и стремится к величине, характерной для полностью незаряженных молекул и определяемой ван-дер-ваальсовыми силами, однако параболический вид зависимости $B(\text{pH})$ сохраняется.

Как видно из полученных результатов, диапазон изменения и средние значения коэффициентов диффузии рассеивающих частиц для чистых растворов (рис. 1, 2) и для смеси (рис. 3) совпадают в пределах погрешности. Не наблюдается резкое уменьшение коэффициента трансляционной диффузии для водного раствора наночастицы ++ белок БСА, что могло бы отвечать образованию какого-либо агрегата. Таким образом, две компоненты исследуемых растворов — NPSi и БСА — существуют в растворе независимо друг от друга, и взаимодействие между ними при заданных значениях pH и концентрациях отсутствует.

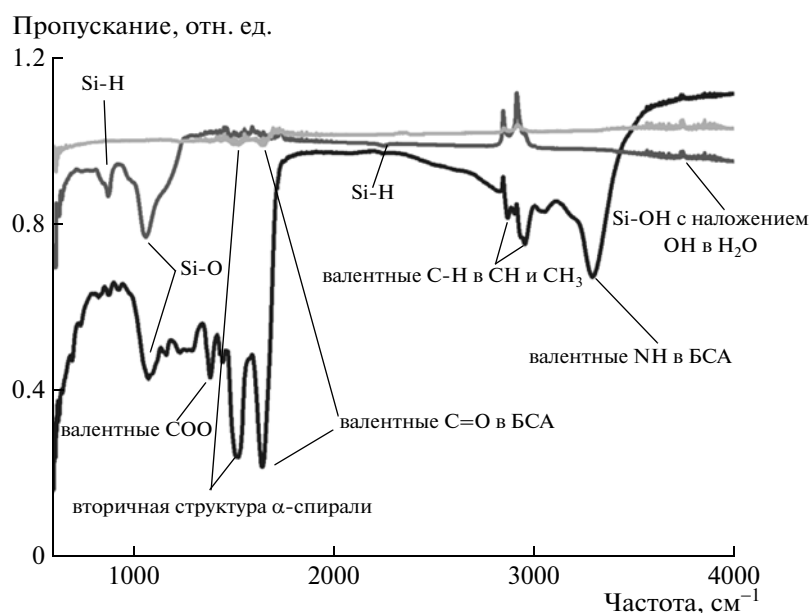


Рис. 5. Инфракрасные спектры пропускания NPSi (1), пленки альбумина (2), смеси NPSi с альбумином (3).

На рис. 5 представлены спектры пропускания исследуемых образцов. В спектре чистого БСА (кривая 2) в представленном диапазоне частот четко выражены линии поглощения, соответствующие колебаниям C=O и вторичной структуре α -спирали на частотах 1644 и 1520 см^{-1} .

В спектре NPSi (кривая 1) присутствуют полосы поглощения ИК излучения на валентных колебаниях Si—H и Si—O на частотах около 2266 и 1064 см^{-1} соответственно. На рис. 5 можно наблюдать также поглощение на валентных колебаниях Si—OH (3746 см^{-1}). Данный тип ИК спектров NPSi свидетельствует о кислородно-водородном покрытии поверхности частиц.

В спектрах БСА + NPSi (кривая 3) проявляются пики поглощения ИК излучения в БСА, обусловленные следующими группами: C—H (2864 см^{-1}), C—H₃ (2954 см^{-1}), N—H (3297 см^{-1}), COO (1396 см^{-1}). Более интенсивный и четкий вид пиков поглощения БСА в спектре на кривой 3 по сравнению с кривой 2 обусловлен адсорбцией молекул альбумина на развитой поверхности NPSi при высушивании их водных суспензий.

Согласно данным [14], при водородном типе связывания альбумина с NPSi должен наблюдаться сдвиг линий поглощения валентных колебаний C=O в область меньших частот (1650 $\rightarrow$ 1635 см^{-1}). Полученные данные указывают на отсутствие такого сдвига, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия NPSi и БСА. По-видимому, отсутствие данного взаимодействия обусловлено гидрофильными свойствами NPSi и недостаточным для образования устойчивого соединения C=O $\cdots$ H—Si—O количеством водорода на их поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом динамического рассеяния света были исследованы параметры водных растворов белка альбумина, содержащих NPSi при различных значениях pH. В полученных спектрах наблюдаются две составляющие для коэффициентов трансляционной диффузии частиц. Одна из них соответствует подвижности макромолекулы альбумина, другая — исследуемым наночастицам. Какой-либо компоненты, указывающей на возникновение агрегатов кремния с белком в изученных растворах, не обнаружено.

В полученных ИК спектрах не выявлен сдвиг линий поглощения БСА в низкочастотную область, характерный для образования водородных связей между карбонильными группами белка и OH-группами на поверхности наночастиц мезопористого кремния.

Представленные данные свидетельствуют об отсутствии взаимодействия между молекулами альбумина и наночастицами кремния в рассмотренном диапазоне концентраций и pH. Для связывания NPSi и альбумина можно, по видимому, модифицировать поверхность кремниевых наночастиц с помощью каких-либо аминокислот [4] с целью изменения их поверхностного заряда.

Обнаруженный факт отсутствия взаимодействия кремниевых наночастиц с макромолекулами белка является интересным и может быть основополагающим при использовании NPSi в биомедицинских целях.

Авторы выражают благодарность проф. В.Ю. Тимошенко за помощь в проведении работы и плодотворные обсуждения результатов. Работа была поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.513.12.3010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Даугель-Дауге Н.О., Жанатаев А.К., Шредер Е.Д., Немова Е.П., Шредер О.В., Велигура В.А., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю., Середенин С.Б. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2010. Т. 149. № 4. С. 429–433.
2. Осминкина Л.А., Лукьянова Е.Н., Гональский М.Б., Кудрявцев А.А., Гайдарова А.Х., Полтавцева Р.А., Кашкаров П.К., Тимошенко В.Ю., Сухих Г.Т. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2011. Т. 151. № 1. С. 91–96.
3. Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А., Осминкина Л.А., Воронцов А.С., Рябчиков Ю.В., Белогорохов И.А., Ковалев Д., Кашкаров П.К. // Письма в ЖЭТФ. 2006. Т. 83. № 9. С. 492–495.
4. Tasciotti E., Liu X., Bhavane R., Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Ming-Cheng Cheng M., Decuzzi P., Nour J.M., Robertson F., Ferrari M. // www.nature.com/naturenanotechnology. V. 3. march 2008. P. 151–157.
5. Canham L.T. // Nanotechnology. 2007. V. 18. P. 185704.
6. Wang J. et al. // Toxicol. Lett. 2007. V. 168. P. 176.
7. Петрова Г.П., Петрусевиц Ю.М. // Биомед. радиоэлектрон. 2000. № 3.
8. Камминс Г., Пайк Э. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М.: Книжный дом “Университет”, 2002.
9. Ершов А.В., Машин А.И., Карабанова И.А. Изучение колебательных свойств аморфного кремния методом ИК спектроскопии. Лабораторная работа по курсу “Физика аморфных и нанокристаллических полупроводников”. Н. Новгород: ННГУ, 2007. 24 с.
10. Егоров Н.Б., Шагалов В.В. Инфракрасная спектроскопия редких и рассеянных элементов. Учебно-методические указания. Томск: Изд-во ТПУ, 2008. 20 с.

11. *Петрова Г.П.* // Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Ч. 2. Учебное пособие. М.: Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. 2009. С. 38–39.
12. *Хохлов А.Р., Говорун Е.Н., Назаров В.Г.* Энциклопедия полимеров / Под ред. В.А. Каргина и др. М.: Советская энциклопедия, 1972–1977. Т. 1. С. 576.
13. *Петрова Г.П.* // Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов. Ч. 1. Учебное пособие. М.: Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. 2008. С. 34–35.
14. *Тарасевич Ю.И.* // Теор. и эксп. химия. 2001. Т. 37. № 2. С. 95–99.