

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОДНОГО РАСТВОРА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

© 2020 г. Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Е.Н. Тумаев, Г.П. Ильченко
Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149
E-mail: tekytska@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2019 г.

После доработки 02.03.2020 г.

Принята к публикации 31.03.2020 г.

Обсуждаются экспериментальные данные, полученные при изучении влияния переменного магнитного поля низкой частоты на конформационные переходы человеческого сывороточного альбумина в присутствии наночастиц серебра с помощью флуоресцентной спектроскопии при разных значениях рН. Обнаружен эффект резкого усиления интенсивности флуоресценции альбумина в присутствии наночастиц серебра, изменяющийся при воздействии переменным магнитным полем низкой частоты. Полученная формула для расчета сечения рассеяния света на сферической наночастице определенного радиуса позволяет рассчитывать размеры наномикроструктур на основе наночастиц и природных биополимеров по типу «ядро–оболочка», физико-химическими свойствами которых можно управлять с помощью магнитного поля. Предложенная модель образования в растворе ассоциатов «белок–наночастица» по диполь-дипольному механизму хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Ключевые слова: переменное магнитное поле низкой частоты, альбумин, наночастицы серебра, собственная флуоресценция, конформационные переходы.

DOI: 10.31857/S0006302920030060

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняет важную функцию, осуществляя транспорт эндогенных и экзогенных субстанций [1]. Альбумин обратимо связывает лиганды различной химической структуры: биологически активные вещества, жирные кислоты, неорганические ионы, лекарственные вещества и их метаболиты [2]. Существует ограниченное число мест связывания в молекуле ЧСА, в идентификации которых основополагающей считается работа G. Sudlow с соавт. [3]. Одним из важных центров связывания в структуре ЧСА или рекомбинантного ЧСА является участок в субдомене ПА, который содержит единственный в молекуле сывороточного альбумина человека остаток триптофана — Trp214. Это позволяет исследовать структурные изменения молекулы альбумина с помощью регистрации триптофановой флуоресценции. Во многих работах отмечается гибкость и конформа-

ционная лабильность молекулы ЧСА, а также восприимчивость к разного рода регуляторным влияниям [2, 4, 5].

Плазмонно-резонансные наночастицы серебра благодаря редкому сочетанию уникальных бактерицидных и оптических свойств широко применяются в медицинских целях [6–8], а также для включения в структуру оболочек микрокапсул в терапии онкологических заболеваний [9]. Для дистанционного высвобождения веществ из объема микрокапсул используется оптическое излучение, при этом механизм высвобождения, как правило, — это нагрев наночастиц, встроенных в оболочку микрокапсул [10, 11]. В новом направлении персонализированной медицины — тераностике — широкое распространение получили платформы гигантского комбинационного рассеяния на основе частиц, декорированных плазмонно-резонансными наночастицами, как сенсорные системы для внутриклеточных исследований [11, 12]. Как отмечается в работе [12], существенными проблемами в тераностике являются биосовместимость искусственных носителей с транспортными системами крови и

Сокращения: ЧСА — сывороточный альбумин человека, МП — магнитное поле.

экранирование биологически активных препаратов от действий иммунной системы.

Изучение объектов и систем, структурированных в нанометровом масштабе, вызывает большой интерес у исследователей вследствие наличия у них специфических физических свойств [13]. В качестве такой системы рассмотрены коллоидные растворы наночастиц серебра в растворе ЧСА. Высокая восприимчивость биополимеров к разного рода регуляторным влияниям, в том числе изменение их структуры при воздействии электромагнитных полей, как это отмечается в работах [14–16], создает предпосылки для реализации аллостерических влияний со стороны наночастиц серебра на процесс связывания с ЧСА.

Цель настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия наночастиц серебра заданного размера с человеческим сывороточным альбумином методом флуоресцентной спектроскопии под действием переменного магнитного поля низкой частоты, по уровню напряженности сопоставимого с геомагнитным полем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали водный раствор наночастиц серебра (диаметр $12 \text{ нм} \pm 10\%$) с исходной концентрацией 630 мкг/мл . Раствор содержал в качестве стабилизатора поливинилпирролидон. Размеры наночастиц серебра контролировали с помощью электронного растрового микроскопа JSM-7500F (Jeol, Япония). Водный раствор ЧСА был получен путем разведения белка до концентрации 5 мкМ в буферной системе (рН 6.5). Рабочие растворы ЧСА готовили с использованием физиологического раствора. Для исследования смешивали растворы таким образом, чтобы концентрации ЧСА и наночастиц серебра составляли 10^{-6} М и 0.33 мкг/мл соответственно.

Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре F-2700 (Hitachi, Япония). Триптофановую флуоресценцию раствора ЧСА регистрировали в диапазоне длин волн от 270 до 500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}}$ 290 или 295 нм.

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Обработка проб магнитным полем. В ходе экспериментов использовали разработанное ранее устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в переменном магнитном поле (рис. 1) [17]. Обработку растворов ЧСА и наночастиц серебра переменным магнитным полем (МП) низкой частоты проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при температуре $20\text{--}22^\circ\text{C}$ и толщине обрабатываемого слоя 2 мм. Образец размещали в центр со-

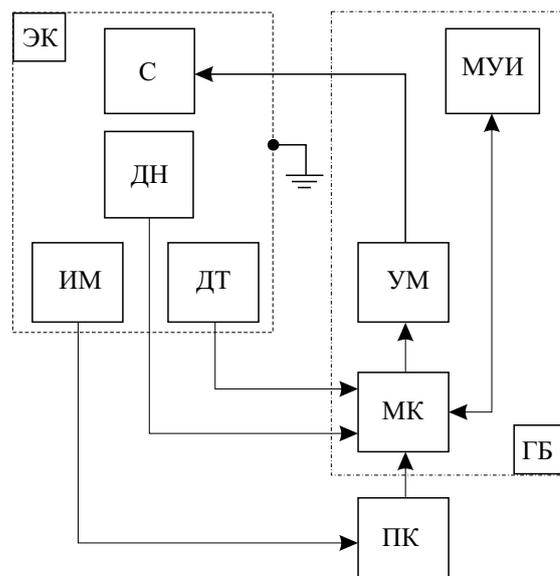


Рис. 1. Структурная схема устройства для автоматизированного поиска оптимальных параметров обработки биологических жидкостей переменным МП: ИМ – измерительный модуль; ДН, ДТ – датчики напряженности магнитного поля и температуры соответственно; ЭК – заземленная экранированная камера; С – соленоид; МУИ – модуль управления и индикации; УМ – усилитель мощности; МК – микроконтроллер; ГБ – генераторный блок; ПК – персональный компьютер

леноида, где МП с достаточной точностью можно считать однородным, поскольку размеры соленоида много больше размеров образца. Напряженность МП в месте нахождения образца составляла $24 \pm 4 \text{ А/м}$, частота МП изменялась с шагом 0.2 Гц в диапазоне от 3 до 30 Гц.

В модуль для измерения физических характеристик биологических жидкостей помещали водный раствор ЧСА, содержащий или не содержащий наночастицы серебра. Температуру раствора контролировали с помощью датчика температуры с точностью до 0.2°C , задавали начальную частоту МП и соответствующую напряженность и проводили обработку образца в течение 10 мин. Затем регистрировали интенсивность флуоресценции образца при соответствующей длине волны. Далее микроконтроллер изменял частоту МП с шагом в 0.5 Гц . После каждого изменения частоты МП и обработки образца регистрировали интенсивность его флуоресценции и делали паузу в течение 30 с.

Статистическая обработка. Полученные данные анализировали в пакете статистического анализа Statistica 6.0. Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием двухвыборочного t -критерия Стьюдента. Корреляционную зависимость и силу связи устанавливали, используя корреляционный анализ

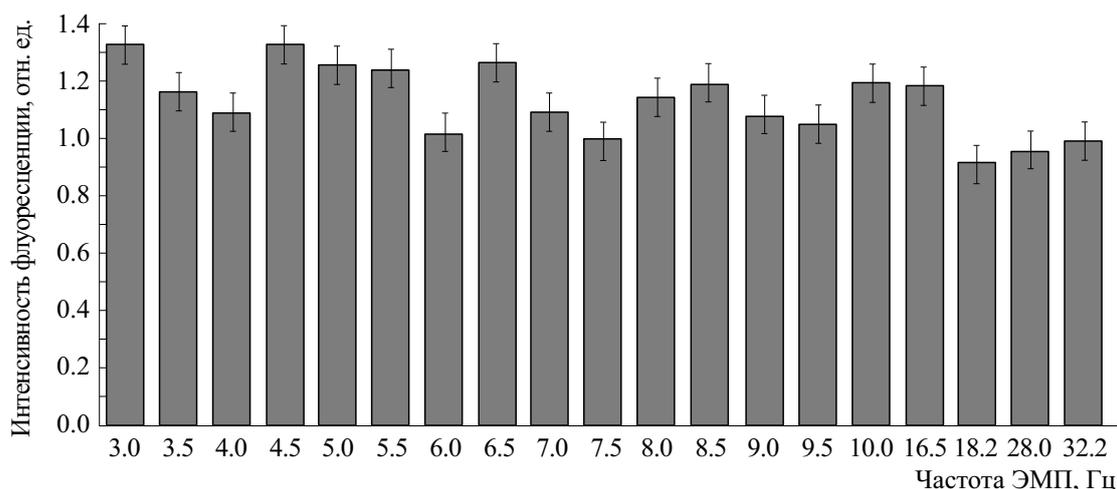


Рис. 2. Относительная интенсивность триптофановой флуоресценции человеческого сывороточного альбумина при обработке ЭМП разной частоты и pH 4.5. Время облучения образцов 10 мин, $t = 22^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм ($n = 10$, $p = 0.95$, $t_{0.95} = 1.96$).

по Спирману. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$ [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресценцию водного раствора ЧСА селективно возбуждали при длинах волн $\lambda_{\text{возб}}$ 290 или 295 нм, при которых поглощает главным образом аминокислотный остаток триптофана в молекуле ЧСА. Величина интенсивности флуоресценции ЧСА при обработке переменным МП разной частоты изменялась от 950 до 1300 отн. ед. в зависимости от используемой частоты МП. Относительную интенсивность флуоресценции определяли, как отношение суммарной флуоресценции для образца, обработанного МП, к флуоресценции контроля (необлученный образец). При подсчете суммарной флуоресценции для всех образцов брали диапазон длин волн излучения от 270 нм до 440 нм. Относительная интенсивность флуоресценции вычислялась по формуле:

$$I_{\text{отн}} = I_{\text{сум.ф}} / I_{\text{сум.К}} \quad (1)$$

Зависимость $I_{\text{отн}}$ от частоты облучения при pH, близком к изоэлектрической точке ЧСА, представлена на рис. 2.

Исследования флуоресцентно-спектральных характеристик аминокислотного остатка триптофана в молекуле ЧСА при различных значениях pH растворов в отсутствие действия МП показали, что при увеличении значения pH от 3.5 до 6.5 происходит значительное увеличение интенсивности флуоресценции в максимуме спектра $I_{\text{фл-мах}}$, что согласуется с данными, полученными в работе [19] (рис. 3). Как видно из рис. 3, при изменении pH раствора от 4.0 до 6.5 наблюдается

смещение максимума интенсивности флуоресценции на 20 нм в длинноволновую область, а интенсивность флуоресценции $I_{\text{фл-мах}}$ увеличивается от 50 до 1250 отн. ед. Это свидетельствует о существенном изменении конформации молекулы альбумина при изменении pH и подтверждает так называемый конформационный N–F-переход, который не приводит к денатурации альбумина, а лишь разворачивает аминокислоты относительно друг друга [1].

Помимо разгорания триптофановой флуоресценции ЧСА при увеличении pH происходит красный сдвиг максимума спектра флуоресценции (рис. 3), что, по-видимому, обусловливается протонированием карбоксильных групп белка, поскольку F-форма ЧСА, имеющая место при низких значениях pH, характеризуется более рыхлой структурой с разупорядоченными гидрофобными областями, более доступными для молекулы воды [1].

На рис. 4 приведены спектры флуоресценции водного раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра при pH 6.5, соответствующего физиологическому значению плазмы крови, полученные после их обработки переменным МП низкой частоты. Добавление в раствор ЧСА эквимольных количеств наночастиц серебра приводит к резкому увеличению интенсивности флуоресценции с 450 отн. ед. (рис. 3) до 3900 отн. ед. (рис. 4). Видно, что дальнейшая обработка МП раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра приводит к еще более значительному увеличению интенсивности флуоресценции.

На рис. 5 приведены зависимости интенсивности флуоресценции раствора наночастиц серебра ($C(\text{Ag}) = 0,33$ мг/л), водного раствора ЧСА,

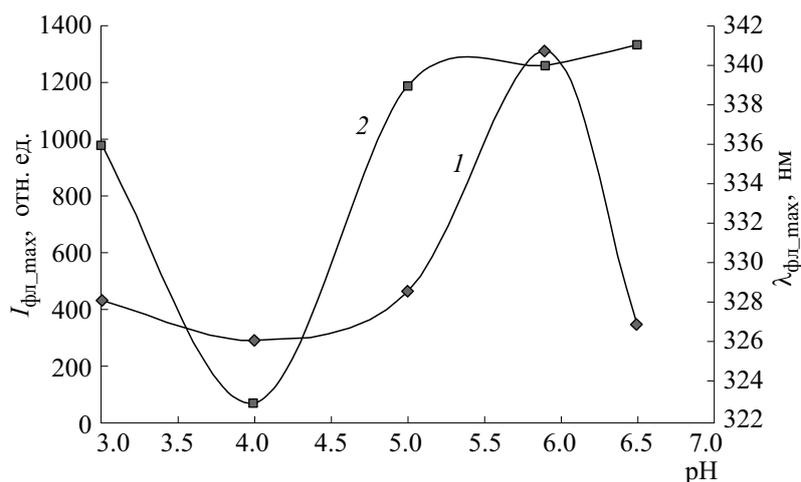


Рис. 3. Зависимости интенсивности флуоресценции I_{fl_max} (1, левая шкала) и длины волны λ_{fl_max} (2, правая шкала) в максимуме спектра флуоресценции ЧСА (5 мкМ) от рН растворов ($\lambda_{возб} = 290$ нм).

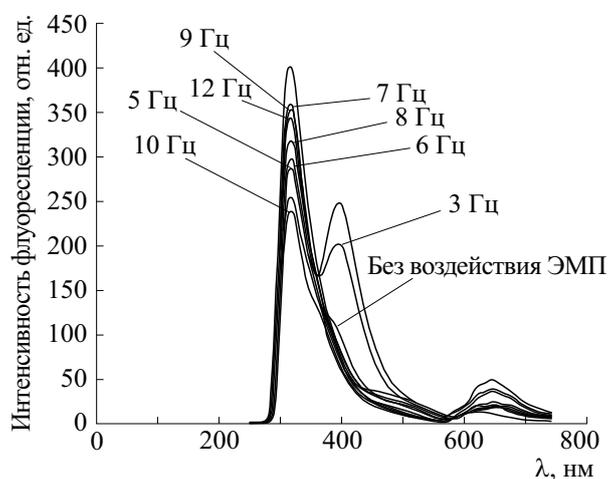


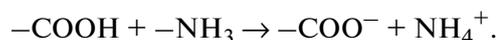
Рис. 4. Спектр флуоресценции раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра ($C(Ag) = 0.34$ мг/л) при рН 6.5 и $t = 22^\circ\text{C}$ после воздействия магнитным полем ($\lambda_{возб} = 290$ нм).

а также водного раствора ЧСА в присутствии наночастиц серебра при рН 6.5 от частоты воздействующего переменного МП на раствор, из которых видно, что максимальное значение интенсивности флуоресценции наблюдается при воздействии на изучаемые растворы МП с частотой 4 и 12 Гц. Также, как видно из рис. 5, интенсивность флуоресценции растворов HSA с наночастицами серебра возрастает в 15–20 раз по сравнению с интенсивностями флуоресценции растворов, содержащих только наночастицы серебра и только ЧСА.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе транспортной функции альбумина лежит способность к обратимому связыванию

лигандов различной химической структуры. Считается, что одним из механизмов транспортировки является поляризация входящих в структуру ЧСА функциональных групп аминокислотных остатков по схеме



В изоэлектрической точке при рН 4.7 поляризация ЧСА отсутствует [1], но при изменении рН возникают поляризованные участки альбумина, способные взаимодействовать с лигандами.

Наночастицы серебра в водных растворах взаимодействуют с ЧСА по диполь-дипольному механизму, образуя ассоциаты, о наличии которых свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции ЧСА в присутствии наночастиц серебра (рис. 4). При обработке растворов ассоциа-

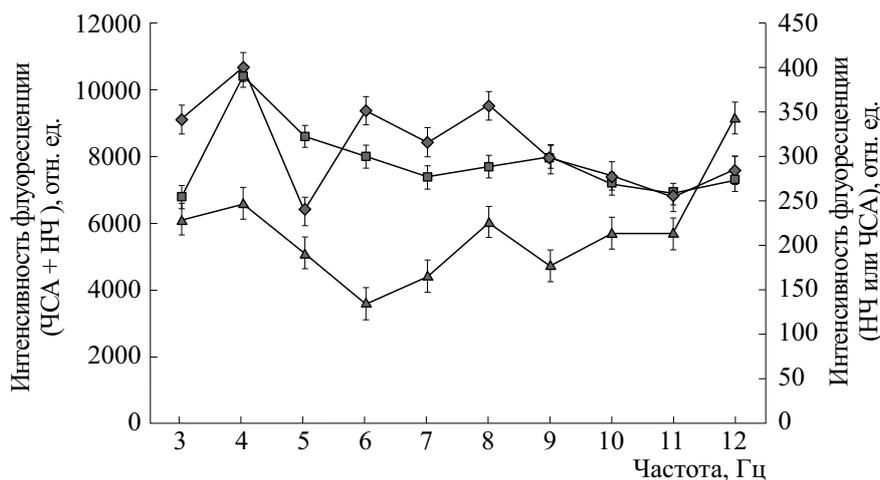


Рис. 5. Зависимости интенсивности флуоресценции раствора ЧСА и наночастиц серебра ($C(\text{Ag}) = 0.33$ мг/л) – правая шкала и водного раствора ЧСА (1 мкМ) в присутствии наночастиц серебра – левая шкала при pH 6.5 и $t = 22^\circ\text{C}$ после воздействия магнитным полем различной частоты в течение 10 мин, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 354$ нм ($n = 10$, $p = 0.95$, $t_{0.95} = 1.96$).

тов ЧСА с наночастицами серебра переменным МП низкой частоты наблюдается дальнейшее значительное увеличение интенсивности флуоресценции, что объясняется индуктивно-резонансным переносом энергии плазмонных колебаний наночастиц на молекулы ЧСА.

Для подтверждения высказанной гипотезы был проведен теоретический анализ процесса резонансного рассеяния, который, в отличие от теории Ми [19], опирался на разложение падающей плоской электромагнитной волны по сферическим волнам для всех мультипольностей $l \geq 1$. Нами была получена следующая формула для сечения рассеяния электромагнитной волны на сферической наночастице радиуса r :

$$\frac{\sigma}{\pi r^2} = 2 \sum_{l=1}^{\infty} \left(\frac{2l+1}{l(l+1)} \right)^2 \frac{2l+1}{3l+2} \text{Im} \left(\frac{l(\epsilon_m - \epsilon_r)}{l\epsilon_m + (l+1)\epsilon_r} \right), \quad (2)$$

где ϵ – комплексная диэлектрическая проницаемость материала наночастицы, ϵ_m – диэлектрическая проницаемость окружающей среды, и символом Im обозначено взятие мнимой части. При $l = 1$ формула (2) переходит в соответствующую формулу теории Ми [20].

Спектры флуоресценции как раствора ЧСА, так и ЧСА в присутствии наночастиц Ag имели четко выраженный пик в области длин волн от 300 до 400 нм, который имел почти гауссову форму. Наличие такого пика объясняется резонансным рассеянием света на наночастице серебра. Использование экспериментальных данных для диэлектрической проницаемости серебра позволило рассчитать резонансную длину волны для наночастицы диаметром 12 нм, которая оказалась равной 354 нм, что хорошо согласуется с экспери-

ментом (рис. 4). Высота пика резонансного рассеяния составляла около 400 отн. ед. для раствора, содержащего только наночастицы серебра, и свыше 8000 отн. ед. для раствора ЧСА с наночастицами Ag. Полученный результат можно объяснить, если предположить, что молекулы ЧСА, взаимодействующие с наночастицами Ag посредством диполь-дипольного механизма, образуют систему двух связанных резонаторов, что и приводит к резкому усилению интенсивности флуоресценции по сравнению с флуоресценцией раствора, содержащего только альбумин. Такая модель позволяет объяснить влияние низкочастотного переменного МП на спектры флуоресценции ЧСА в присутствии наночастиц Ag. Расчеты, проведенные для пары ЧСА+Ag, позволили подтвердить это предположение, показав, что возрастание сечения рассеяния света происходит при образовании ассоциатов. Поскольку присутствие наночастиц серебра в растворе ЧСА приводит к увеличению интенсивности флуоресценции более чем в 20 раз, а концентрации молекул ЧСА и наночастиц Ag сопоставимы по величине и размеры молекул альбумина и наночастиц примерно одинаковы, то, возможно, в растворе образуются сложные ассоциаты, содержащие несколько молекул белка, связанных с наночастицами Ag. Образование таких ассоциатов может приводить к радикальной перестройке структуры и функций белков, а влияние МП на структуру ассоциатов позволяет в определенной степени управлять этими свойствами.

Эффект усиления люминесценции наночастиц серебра в присутствии молекул ЧСА может быть также объяснен сенсibilизацией люминесценции. Это явление, хорошо исследованное для

неорганических материалов [21], наблюдается как значительное увеличение интенсивности люминесценции при дополнительном введении в люминофор примеси, которая сама по себе либо не светит вообще, либо обладает незначительными люминесцентными свойствами. Суть явления сенсбилизации люминесценции заключается в том, что центры-сенсбилизаторы (в данном случае – молекулы ЧСА) переходят из основного в возбужденное состояние при поглощении света, после чего передают свою энергию электронного возбуждения акцепторам – люминесцирующим центрам (наночастицам Ag) с последующим свечиванием. Механизм передачи энергии электронного возбуждения – индуктивно-резонансный, взаимодействие в паре «сенсбилизатор–акцептор», как правило, диполь-дипольное. В наших системах сенсбилизация люминесценции наночастиц Ag приводит к увеличению интенсивности свечения более чем в 20 раз, следовательно, сечение поглощения молекул ЧСА превышает сечение поглощения наночастиц серебра более чем в 20 раз. Таким образом, добротность системы составляет около 20, поскольку часть энергии электронного возбуждения молекул ЧСА теряется при внутрицентральной релаксации, т.е. в конечном счете переходит в тепло.

С помощью предложенной математической модели возможен расчет резонансных длин волн переменного МП для сферических наночастиц серебра заданного размера в присутствии ЧСА, при которых внутри клетки будет происходить самоорганизация и образование крупных ассоциатов «наночастица–ЧСА». Это может быть использовано для внутриклеточных исследований или последующего воздействия на подобную нано/микроструктуру оптическим излучением в терапии онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

Влияние наночастиц серебра на молекулярное окружение определяется наличием у них плазмонных колебаний плотности электронного газа, что изменяет эффективность взаимодействия близлежащих молекул ЧСА с внешним переменным МП. Обнаружен эффект резкого усиления интенсивности флуоресценции альбумина в присутствии наночастиц серебра, который изменяется при воздействии на раствор, содержащий ЧСА и наночастицы серебра в соизмеримых количествах, переменного МП. Образование таких ассоциатов может приводить к радикальной перестройке функций белков. Предложенная универсальная математическая модель позволяет рассчитывать размеры нано-микроструктур на основе плазмонно-резонансных наночастиц и природных биополимеров по типу «ядро–оболочка», физико-химическими свойствами ко-

торых можно управлять с помощью МП. Полученные результаты могут найти применение в развитии персонализированной медицины, направленной на повышение качества лечения, связанной с разработкой функциональных нано- и микроструктур на основе наночастиц в новом направлении медицины – тератоноктике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Peters, Jr., *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, San Diego, 1996).
2. Н. Н. Пшеникина, *Фармакология* **12** (1), 1065 (2011).
3. G. Sudlow, D. J. Birkett, and D. N. Wade, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2** (2), 129 (1975).
4. J. K. Kamal, L. Zhao, and A. H. Zewail, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101** (37), 13411 (2004).
5. B. A. Noskov, A. A. Mikhailovskaya, S. Y. Lin, et al., *Langmuir* **26** (22), 17225 (2010).
6. Ю. А. Крутиков, А. А. Кудринский, А. Ю. Олейник и др., *Успехи химии* **77** (3), 242 (2008).
7. И. Е. Станишевская, А. М. Стойнова, А. И. Марихова и др., *Разработка и регистрация лекарственных средств* **1** (14), 66 (2016).
8. S. S. Dzhimak, V. V. Malyshko, A. I. Goryachko, et al., *Nanotechnologies in Russia* **14** (1–2), 48 (2019). DOI: 10.1134/S199507801901004X
9. A. A. Skirtach, A. A. Antipov, et al., *Langmuir* **20** (17), 6988 (2004).
10. A. Wang and Y. Cui, *Chem.-An Asian* **5** (8), 1780 (2010).
11. С. М. Dvorocek, G. Sukhonosova, et al., *Langmuir* **25** (17), 10322 (2009).
12. А. М. Яшенков, Автореф. дис. ... докт. физ.-мат. наук (Сарат. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2016).
13. А. К. Зейниденов, Н. Х. Ибраев и М. Г. Кучеренко, *Вестн. ОГУ* **9** (170), 96 (2014).
14. Е. Е. Tekutskaya, M. G. Barishev, and G. P. Ilchenko, *Biophysics* **60** (6), 913 (2015). DOI: 10.1134/S000635091506024X
15. Е. Е. Tekutskaya, *Rus. Open Med. J.* **8** (2), e0202 (2019). DOI: 10.15275/rusomj.2019.0202

16. E. E. Tekutskaya, S. S. Dzhimak, A. A. Basov, et al., *Med. News of North Caucasus* **10** (3), 287 (2015). DOI: 10.14300/mnnc.2015.10067
17. G. P. Il'chenko, M. G. Baryshev, E. E. Tekutskaya, et al., *Measur. Techn.* **60** (6), 632 (2017). DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7
18. А. Н. Герасимов, *Медицинская статистика* (Медицинское информационное агентство, М., 2007)
19. И. М. Власова и А. М. Салецкий, *Хим. физика* **28** (12), 66 (2009).
20. C. R. Bohreh and D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley-VCH, 2009).
21. В. Л. Ермолаев, Е. Н. Бодунов и Е. Б. Свешникова, *Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения* (Наука, Л., 1977).

The Influence of an Alternating Magnetic Field and Silver Nanoparticles on the Spectral Characteristics of an Aqueous Solution of Human Serum Albumin

E.E. Tekutskaya, M.G. Baryshev, E.N. Tumaev, and G.P. Ilchenko

Kuban State University, ul. Stavropolskaya 149, Krasnodar, 350040 Russia

In this paper we are concerned with experimental data that are obtained from the study of the effect of low-frequency alternating magnetic field on the conformational transitions of human serum albumin in the presence of silver nanoparticles by means of fluorescence spectroscopy at different pH values. Albumin in the presence of silver nanoparticles showed a sharp increase of fluorescence intensity with further variations of this effect due to exposure to low frequency alternating magnetic field. The obtained formula for calculating a cross-section of the light scattering from a spherical nanoparticle of a certain radius can be used to calculate sizes of nano/microstructures based on natural biopolymer core-shell nanoparticles, physico-chemical properties of which can change under the influence of a magnetic field. The proposed model for the formation of interactions between protein and nanoparticle as a dipole-dipole interaction in a solution is in good agreement with the experimental data.

Keywords: low-frequency alternating magnetic field, albumin, silver nanoparticles, natural fluorescence, conformational transitions