
ІННОВАЦІЙНІ АСПЕКТИ ПІДВИЩЕННЯ РІВНЯ ЕКОБЕЗПЕКИ

УДК 535.37

ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ РОЗЧИНІВ АЛЬБУМІНУ З НАНОЧАСТИНКАМИ СПОЛУК МЕТАЛІВ

Бордун І.М.¹, Пташник В.В.¹, Сардыга М.В.¹,
Дмитруха Н.М.², Короленко Т. К.²

¹ Національний університет «Львівська політехніка»
вул. Кн. Романа, 5, 79005, м.Львів

bordun.igor@gmail.com;

² ДУ «Інститут медицини праці НАМН України»
вул. Саксаганського, 75, 01033, м.Київ
dmytrukha@ukr.net

Досліджено флуоресценцію водних розчинів людського сироваткового альбуміну з наночастинками Феруму та цитратів Феруму і Купруму. Встановлено, що зміна характеру свічення альбуміну при взаємодії з наночастинками і зменшення власного свічення триптофана зумовлені денатуруючою дією наночастинок. Це може призводити до порушення функціональної активності цього білка у живих організмах. *Ключові слова:* альбумін, наночастинки, флуоресценція, конформаційні зміни.

Флуоресценция растворов альбумина с наночастицами соединений металлов. Бордун И.М., Пташник В.В., Сардыга М.В., Дмитруха Н.Н., Короленко Т.К. Исследовано флуоресценцию водных растворов человеческого сывороткового альбумина с наночастицами железа и цитратов железа и меди. Установлено, что изменение характера свечения альбумина при взаимодействии с наночастицами и уменьшение собственного свечения триптофана обусловлены денатурирующим действием наночастиц. Это может способствовать нарушению функциональной активности данного белка в живых организмах. *Ключевые слова:* альбумин, наночастицы, флуоресценция, конформационные изменения.

The fluorescence of albumin solutions with metal compounds nanoparticles. Bordun I., Ptashnyk V., Sardyga M., Dmytrukha N., Korolenko T. The fluorescence of human serum albumin aqueous solutions with nanoparticles of iron, ferric citrate and copper citrate was investigated in this work. It was established that the change nature of fluorescence due to interacting albumin with nanoparticles and reducing their own tryptophan fluorescence caused by denaturing effect of nanoparticles. This may lead to a breach of the protein functional activity in living organisms. *Keywords:* albumin, nanoparticles, fluorescence, conformational changes.

У сучасному світі методи отримання та застосування наночастинок (НЧ) відкривають нові можливості у багатьох напрямках людської діяльності. Саме використання частинок металів, які володіють унікальними хімічними, фізичними, біологічними, фармакологічними властивостями, допомагає людству створювати надпотужні комп'ютери, надміцні матеріали, розробляти високоефективні методи лікування та діагностики захворювань [1-4]. Однак, з іншого боку, швидкі темпи впровадження НЧ у повсякденну життєдіяльність людини не дають змоги дослідити їх вплив на живі організми та беззаперечно можуть призвести до погіршення стану як здоров'я людини, так і довкілля [4, 5]. Значна хімічна активність і висока здатність НЧ до проникнення в організм зумовлена їх малими розмірами та великою питомою поверхнею. Відомо, що НЧ можуть проникати в організм людини різними шляхами: через слизові оболонки дихальних шляхів і травного тракту, трансдермально (наприклад, при використанні косметичних засобів), через кровотік у складі вакцин і сироваток тощо. Взаємодія НЧ з нуклеїновими кислотами, білками та клітинами призводить до змін в їх метаболізмі та функціональній активності. Безпека поширення НЧ у навколишньому середовищі, їх проникнення в організм людини ще не повністю усвідомлена, але, безсумнівно, велика вже сьогодні і наростатиме у майбутньому.

Актуальність та мета дослідження

З'ясування причин негативного впливу НЧ і розробка способів боротьби із захворюваннями, викликани-

ми проникненням їх в організм, стають зараз предметом нового наукового напрямку у біофізиці [6]. Тому науковий пошук багатьох дослідників спрямований на вивчення впливу наноматеріалів на біологічні об'єкти на різних рівнях організації живого, зокрема, на субклітинному, клітинному, органному, цілому організмі. Переважно маловідомими залишаються тонкі механізми взаємодії НЧ із клітиною та її компонентами, а також вплив на виконувани ними функції.

Серед існуючих оптичних методів флуоресценція є одним із найчутливіших методів аналізу біологічних зразків. Тому метою роботи було дослідження взаємодії між білком альбуміном, який виконує транспортну функцію, та НЧ металів Купруму та Феруму флуоресцентним методом.

Методика досліджень

Для приготування досліджуваних розчинів використовувався людський сироватковий альбумін у концентрації 10 г/л. Для досліджень розчин розводився бідистильованою водою до концентрації 1 г/л. До такого розчину додавали колоїдний розчин НЧ Феруму (усереднені розміри 40 нм) концентрацією 10 мг/мл, цитрат Феруму (усереднені розміри 200 нм) концентрацією 1 мг/мл, НЧ Купруму (усереднені розміри 20 нм) концентрацією 10 мг/мл та цитрат Купруму (усереднені розміри 200 нм) концентрацією 2 мг/мл. НЧ Феруму отримані методом хімічного синтезу в Інституті біологічної хімії ім. О. Д. Овчаренка НАН України. Цитрати Феруму та Купруму отримані за допомогою нанотехнології методом

ерозійно-вибухового диспергування Каплуненка-Косінова [7]. Хоча розмір вихідних частинок був більшим за 100 нм, тобто за класичним визначенням вони не відносяться до НЧ, однак у водних розчинах цитрат Феруму є добре розчинною, а цитрат Купруму – слабозрозчинною сполукою, тому внаслідок розчинності їхні розміри будуть меншими за розміри вихідних частинок.

Отримані розчини НЧ з альбуміном інкубували за кімнатної температури впродовж 2 годин, поміщали у кварцові кювети зі скла КУ-1 з довжиною оптичного ходу 10 мм і проводили вимірювання спектрів флуоресценції за допомогою спектрофлуориметра Solar CM 2203. Довжина хвилі збудження становила 280 нм, вимірювання спектрів флуоресценції проводили у повільному режимі з кроком 1 нм.

Результати та їх обговорення

Альбумін є основним білком плазми крові, складає 40-60 % від загальної кількості білка. Основна функція альбуміну – участь у підтриманні об'єму циркулюючої крові і колоїдно-осмотичного тиску плазми, а також транспорт та депонування різних речовин, у тому числі металів. Структура альбуміну настільки лабільна, що навіть при невеликій зміні інтенсивності фізико-хімічних факторів (рН, температура, денатуруючі агенти) відбуваються його конформаційні зміни, які, в свою чергу, відбиваються на його функціях.

Відомо, що білки у водному розчині і, відповідно, в організмі зберігаються у нативному стані за рахунок факторів стійкості, до яких належать

заряд білкової молекули і гідратна оболонка навколо неї. Такі розчини є поліелектролітами, основною взаємодією у яких є сили кулонівського відштовхування. При попаданні НЧ чи іонів металів у розчин відбуватиметься взаємодія з різними групами на поверхні білка, нейтралізуючи поверхневий заряд макромолекул. У такому випадку характер взаємодії білкових макромолекул буде визначатися конкуренцією сил диполь-дипольного притягання і сил кулонівського відштовхування. А це спричинить утворення нанокластерів, характер флуоресценції яких залежатиме від взаємодії білкових молекул та НЧ.

На рисунку 1 наведено спектр флуоресценції вихідної бідистильованої води.

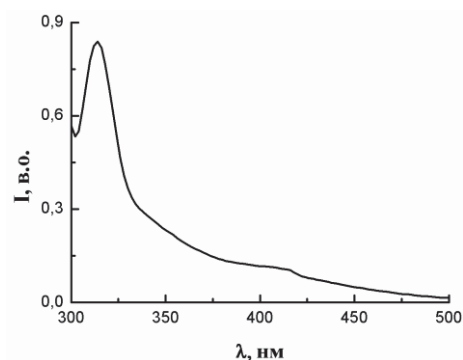


Рис. 1. Спектр флуоресценції вихідної бідистильованої води

З аналізу спектра видно, що чиста вода практично не люмінесціює, а інтенсивний пік при 320 нм є піком комбінаційного розсіювання [8]. Це підтверджує той факт, що полярні розчинники є активними гасниками флуоресценції.

При додаванні до такої води білка альбуміну і збудженні розчину в області поглинання складових білка спостерігаємо досить інтенсивну власну флуоресценцію з максимумом в області 340 нм (рис. 2).

Флуоресценція білків визначається виключно флуоресценцією ароматичних амінокислот, які входять до його складу [9]. У білках, які мають усі три амінокислоти, як у альбуміні, таке випромінювання відповідає свіщенню триптофана. Така ситуація зумовлена тим, що хоча сировотковий альбумін і має 33 залишки фенілаланіна, 18 залишків тірозину і лише один залишок триптофана, останній флуоресцює лише тому, що вся енергія збудження передається йому. Це означає, що триптофан володіє найнижчим рівнем збудження.

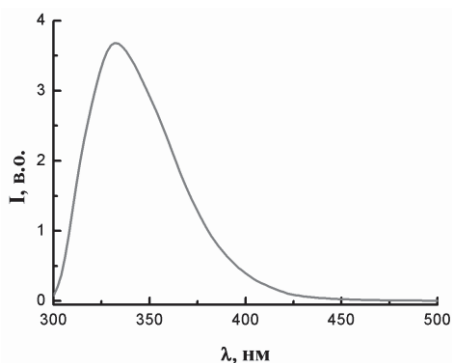


Рис. 2. Спектр власної флуоресценції альбуміну у водному розчині

При додаванні до розчину альбуміну НЧ Феруму спостерігаємо на порядок слабшу флуоресценцію, ніж у розчині білка (рис. 3).

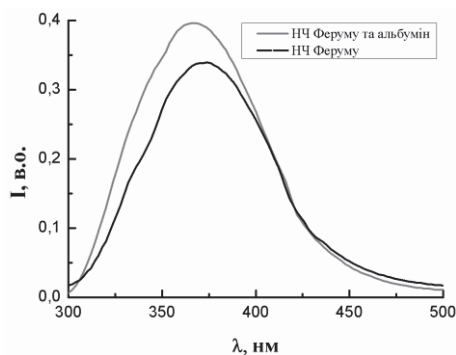


Рис. 3. Спектр флуоресценції водних розчинів НЧ Феруму та системи НЧ Феруму-альбумін

Це викликано тим, що іони Феруму найчастіше характеризуються як гасники флуоресценції, хоча у роботі [10] пропонується використовувати оксид Феруму як флуоресцентну мітку при дослідженні біооб'єктів методами флуоресцентної мікроскопії та флуоресцентної томографії. НЧ нуль-валентного заліза (Fe^0) мають високу активність у окисно-відновних процесах і застосовуються для очищення навколишнього середовища від забруднювачів органічного та неорганічного походження [11]. Часткове або повне окиснення НЧ Fe^0 у водних розчинах призводить до зниження їхньої окисно-відновної активності. При додаванні альбуміну енергія збудження передається на ці окиснені НЧ, викликаючи флуоресцентне свічення саме останніх. Відсутність власної флуоресценції альбуміну показує достатньо сильну взаємодію НЧ Феруму та молекул білка.

Якщо розглядати цитрат Феруму, то у водному розчині він за рахунок доброї розчинності переходить у іонний стан, утворюючи іони Fe^{3+} та

цитрат-іони $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3^{3-}$. Іони Феруму Fe^{3+} , хоча й мають найменший іонний радіус у ряді Fe^0 - Fe^{2+} - Fe^{3+} , але, як і іони інших важких металів, міцно зв'язуються з зарядами на поверхні білкової молекули, чим спричиняють денатурацію частини білка [12].

Оскільки цитрат Феруму добре розчиняється у воді, то його розчин практично не люмінесціює (рис. 4). При денатурації білка, який активно взаємодіє з іонами Феруму, спостерігається суттєве – майже на порядок – зростання інтенсивності флуоресценції.

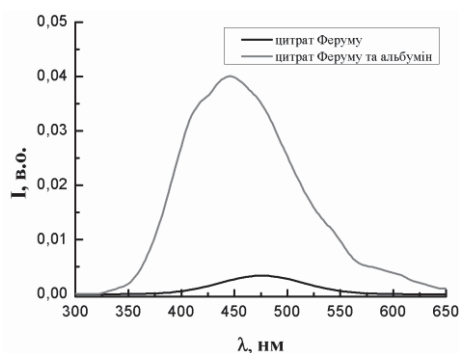


Рис. 4. Спектр флуоресценції водних розчинів цитрату Феруму та системи цитрат Феруму-альбумін

Якщо ж розглядати цитрат Купруму, який практично не розчиняється у воді, то його взаємодія з білком є набагато слабшою, що проявляється незначною зміною спектрів флуоресценції (рис. 5). Як бачимо, смуга з максимумом при 360 нм дещо зменшує свою інтенсивність, а смуга з максимумом при 420 нм практично не змінює своєї інтенсивності. І, як і у попередніх випадках, власна флуо-

ресценція альбуміну не спостерігається.

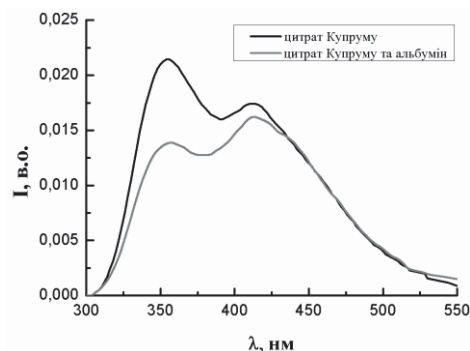


Рис. 5. Спектр флуоресценції водних розчинів цитрату Купруму та системи цитрат Купруму-альбумін

Висновки

З наведеного можна зробити висновки, що зміна характеру свічення альбуміну при взаємодії з НЧ і зменшення власного свічення триптофана зумовлені денатуруючою дією НЧ металів. У першу чергу порушується система гідрофобних зв'язків, у результаті чого починає порушуватися третинна структура, а триптофан змінює своє положення у білковій глобулі. Він позбувається того оточення, яке мав у нативному білку, а це спричиняє суттєве зменшення інтенсивності флуоресценції. Окрім того, можливі процеси гасіння флуоресценції триптофана сусідніми білковими групами у результаті конформаційних змін молекули альбуміну.

Отже, НЧ Феруму, а також цитратів Феруму та Купруму, володіючи великою поверхневою енергією і спричиняючи конформаційні зміни альбуміну, можуть призвести до порушення функціональної активності цього білка у живих організмах.

Література:

1. Балабанов В. И. Нанотехнологии. Наука будущего / В. И. Балабанов. – М. : Эксмо, 2009. – 256 с.
2. Чекман І. С. Наночастинки: властивості та перспективи застосування / І. С. Чекман // Укр.біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 122–129.
3. Laurent S. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications / D. Forge, M. Port et al. // Chem. Rev. – 2008. – V. 108. – P. 2064–2110.
4. Трахтенберг І. М. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізико-хімічні та токсичні властивості / І. М. Трахтенберг, Н. М. Дмитруха // Укр. журнал з проблем медицини праці. – 2013. – № 4(37). – С. 62–74.
5. Dionysiou D. Environmental applications and implications of nanotechnology and nanomaterials / D. Dionysiou // J. Environmental Engineering. – 2004. – V. 130, № 7. – P. 723–724.
6. Каркищенко Н. Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов / Н. Н. Каркищенко // Биомедицина. – 2009. – № 1. – С. 5–27.
7. Патент на корисну модель № 29450 Україна, МПК В О1 J 13/00. Спосіб отримання колоїдних металевих наночастинок «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання колоїдних металевих наночастинок» / Косінов М. В., Каплуненко В. Г. ; опубл. 10.01.2008, бюл. № 1/2008.
8. Паркер С. Фотолюминесценция растворов / С. Паркер. – М. : Мир, 1972 – 510 с.
9. Владимиров Ю. А. О люминесценции ароматических мінокислот в молекуле белка / Ю. А. Владимиров // Докл. АН СССР. – 1961. – Т. 136, № 4. – С. 960–963.
10. Аюпджанов А. Г. Применение наночастиц оксида железа в качестве люоресцентних меток / А. Г. Аюпджанов, А. В. Бабич, И. В. Быков, В. Ю. Науменко, А. А. Миронова // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2011. – № 9. – С. 28–36.
11. Crane R. A. Nanoscale zero-valent iron: future prospects for an emerging water treatment technology / R. A. Crane // J. Hazard. Mater. – 2012. – V. 211-212. – P. 112–125.
12. Petrova G. P. Molecular clusters in water protein solutions in the presence of heavy metal ions / G. P. Petrova, Yu. M. Petrusevich, A. N. Evseevicheva // Gen. Physiol. Biophys. – 1998. – V. 17. – P. 97–104.