ДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВОДНЫХ НАНОДИСПЕРСИЙ ШУНГИТОВОГО УГЛЕРОДА В ОТНОШЕНИИ БЕЛКОВ И КЛЕТОК КРОВИ

Горюнов А.С., Рожков С.П., Борисова А.Г., Суханова Г.А.

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия, borisova@krc.karelia.ru

Перспективы применения углеродных наноматериалов в биомедицине и биотехнологии полностью определяются результатами предварительных исследований бионаносопряжения – биофизико-химических взаимодействий биосистемы и наноматериала. Одной из существенных проблем при выяснении характера и механизмов взаимодействия наночастиц с биомолекулами все еще остается воспроизводимость характеристик нанодисперсий и их стабильность. Для изучения механизмов биологической активности наноуглерода из шунгитового горнорудного сырья были получены водные нанодисперсии шунгитового углерода (ШУ), очищенные от примесей, проведена стерилизация и стабилизация дисперсий [1], что в дальнейшем позволило изучать структурно-динамические, термодинамические, гидродинамические и окислительно-восстановительные эффекты ШУ в отношении белков и мембран клеток крови для выяснения мембранотропного и неспецифического механизмов биологического действия ШУ в сравнении с дисперсиями других видов наноуглерода: фуллеренов (aqu/nC60) и наноалмазов.

ШУ образует глобулы размером до 10 нм. Они сформированы изогнутыми графеновыми слоями, которые являются основным структурным элементом ШУ и имеют размер 0,5-0,7 нм и толщину 2-5 нм (5-14 слоев) по данным рентгеновской дифракции и дифракции электронов. Глобулы объединяются в агрегаты - кластеры размером до 100 нм. Благодаря непланарности структуры графены обладают дипольным моментом, который определяет взаимодействие ШУ с водой и во многом обеспечивает устойчивость водных дисперсий.

Исследования проводились методами ЭПР спин-метки и спин-зонда (Bruker EMX), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (Nano DSC TA-Instr.), динамического светорассеяния (Zetasizer Nano), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (T-Scan).

Изучение эффектов нанодисперсий углерода в отношении процессов восстановления и окисления стабильного спинового зонда в присутствии двухвалентного железа показало, что в дисперсиях наноуглерода

происходит быстрое восстановление стабильного спинового зонда до гидроксиламина с потерей парамагнетизма. Однако немедленно вслед за тем начинается окисление гидроксиламина, наиболее вероятно, растворенным в гидратной оболочке кислородом. Парамагнетизм спин-зонда восстанавливается, причем скорость исходной потери и последующего восстановления парамагнетизма спин-зонда тем выше, чем больше концентрация наночастиц и железа. В отсутствие наноуглерода восстановление парамагнетизма не наблюдается, равно как и при недостатке в дисперсии кислорода. Аналогичные явления обнаружены и в суспензиях мембран теней эритроцитов. Отличие заключается в том, что начальная скорость потери парамагнетизма в этом случае настолько велика, что регистрируется только его восстановление (окисление гидроксиламина).

Изучение автоокисления гемоглобина (Hb) в водных дисперсиях наноуглерода показало, что присутствие в белковом растворе гидратированных нанокластеров C_{60} и ШУ, в отличие от наноалмазов, приводит к окислению Hb в реакционной среде концентрационно-зависимым образом уже в процессе их внесения в раствор. Даже при физиологических pH и выше, когда автоокисление идет крайне медленно, присутствие aqu/nC_{60} и ШУ способно значительно ускорить реакцию окисления гемового железа Hb, что указывает на прооксидантную активность этих нанодисперсий.

Размер комплексов белка (сывороточного альбумина, СА) с наночастицами ШУ кратно превышает размер наночастиц в водной дисперсии без белка, а молекулы белка практически полностью связываются с наночастицами вплоть до значительных концентраций белка, превышающих 10 г/л. Согласно расчету, в таком случае на поверхности наночастицы образуется многослойная белковая корона, то есть происходит эффективная адсорбция белка в объеме с наночастицами ШУ в качестве центров объемной адсорбции. При существенном превышении концентрации 10 г/л в распределении частиц по размерам проявляются несвязанные молекулы белка, что позволяет оценивать размеры короны и адсорбционную емкость дисперсии наноуглерода.

Данные гель-фильтрации и ультрацентрифугирования нанодисперсий комплексов указывают, что в физиологических условиях, когда устойчивость дисперсии наноуглерода (без белка) минимальна, нанодисперсия ШУ с СА обладает высокой коллоидной и седиментационной устойчивостью. Комплексы характеризуются значительно более высокой хроматографической подвижностью, по сравнению с собственно белком. Напротив, шунгитовый наноуглерод в водной дисперсии вообще не проходит через колонку, вероятно, вследствие связывания с гелем.

По данным ДСК о плавлении СА в нанодисперсии ШУ, в составе биокомплекса ШУ-СА компактность структуры белка значительно понижена. Анализ термограмм ДСК свидетельствует об изменении внутримолекулярных междоменных взаимодействий в белковых макромолекулах под влиянием межмолекулярных взаимодействий с наночастицами углерода: при этом происходит перераспределение молекулярных контактов между структурными доменами молекул альбумина и частичное объединения доменов. Характер изменения формы термограмм свидетельствует о том, что взаимодействие наночастиц с белком осуществляется в основном за счет центров связывания белком жирных кислот. Это подтверждается данными ЭПР спинового зонда на основе жирной кислоты, которые показывают, что при взаимодействии СА с ШУ в нанодисперсии и при денатурации белка мочевиной наблюдаются аналогичные изменения в структуре СА. Однако термодинамические характеристики структуры Hb в нанодисперсии ШУ остаются без изменений.

Данные ЭПР спин-метки показали, что наноуглерод влияет на стабильность белков актин-спектринового цитоскелета эритроцита, повышая их термоустойчивость. Данные ДСК также говорят о повышении термоустойчивости белков цитоскелета эритроцитов в нанодисперсии ШУ углерода, тогда как мембранные белки остаются без изменений.

Исследование термо- и осморезистентности эритроцитов в нанодисперсиях ШУ свидетельствует о снижении гемолитической устойчивости клеток как основном эффекте. По данным СЭМ, хотя морфология эритроцитов в нанодисперсиях ШУ не претерпевала существенных изменений, агрегация клеток, значительно усиливалась. Скопления клеток имели вид гроздьев, но не физиологических агрегатов. Отмывание наноуглерода приводило к дезагрегация [2]. Можно предположить, что механизм воздействия состоит во влиянии на агрегацию поверхностных белков эритроцитов, что ведет к агрегации и самих клеток. Степень модификации состояния эритроцитов в нанодисперсии ШУ зависит от концентрации ШУ и температуры инкубации.

Литература

1. Rozhkova N.N., Gribanov A.V., Khodorkovskii M.A. Water mediated modification of structure and physical chemical properties of nanocarbons // Diamond and Related Materials – 2007. – Vol. 16. – P. 2104 – 2108.

2. Горюнов А.С., Борисова А.Г., Рожков С.П., Суханова Г.А., Рожкова Н.Н. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода // Труды Карельского НЦ РАН. Экспериментальная биология. 2009. - № 3. - С. 30 - 37.