МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 577.3

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ГРАФЕНОВ НАНОЧАСТИЦ ШУНГИТОВОГО УГЛЕРОДА В ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ВОДЫ В ДИАПАЗОНЕ БОЛЬШИХ ВОЛНОВЫХ ЧИСЕЛ

© 2022 г. С.П. Рожков*, А.С. Горюнов*, В.А. Колодей**, Л.А. Пронькина**, Н.Н. Рожкова**

*Институт биологии КарНЦ РАН, Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, 185910, Россия **Институт геологии КарНЦ РАН, Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, 185910, Россия E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru Поступила в редакцию 05.05.2022 г. После доработки 09.06.2022 г. Принята к публикации 11.07.2022 г.

Методом комбинационного светорассеяния проведено исследование положения экстремумов, амплитуд и ширин основных спектральных линий диапазона волновых чисел 3200–3600 см⁻¹, обусловленных валентными ОН-колебаниями в сетке водородных связей воды при изменении концентрации бычьего сывороточного альбумина в диапазоне 0.01–10 мг/мл. Сравнивали вариации этих параметров для белка при наличии и в отсутствие жирных кислот, а также влияние наночастиц шунгитового углерода на эти вариации. Обнаружено, что стабильность системы водородных связей воды существенно нелинейно зависит от концентрации белка, причем в диапазоне концентраций 0.1–0.3 мг/мл белка стабилизация максимальна и убывает как с ростом, так и уменьшением концентрации. Дестабилизация системы водородных связей с ростом концентрации белка может быть связана с его конформацией и/или агрегацией. Изменения зависят как от лигандного состояния бычьего сывороточного альбумина (наличие жирных кислот), так и влияния наночастиц шунгитового углерода. В присутствии наночастиц шунгитового углерода сетка водородных связей поддерживается в более однородном, но разрыхленном состоянии во всем диапазоне концентраций белка как с жирными кислотами, так и без них. Полученные данные указывают на важную роль воды в механизмах взаимодействия между молекулами белка, а также между графенами наночастиц шунгитового углерода и поверхностью белка в области их центров связывания с жирными кислотами.

Ключевые слова: альбумин, жирная кислота, графены шунгитового углерода, комбинационное рассеяние света, водородные связи.

DOI: 10.31857/S000630292205060060, EDN: LJWEII

Графены и оксиды графена являются перспективным наноматериалом для биомедицинских целей благодаря их уникальным свойствам – двумерной структуре, большой поверхности, химической и механической стабильности, специфическим электронным свойствам и биосовместимости [1]. Это обеспечивает им потенциальную возможность осуществлять транспортную функцию по доставке биопрепаратов, а также выступать в качестве биосенсоров, искусственных ферментов-пероксидаз [2, 3], центров гетерогенной нуклеации при кристаллизации белков [4]. Вместе с тем общие закономерности взаимодействия между водой, наночастицами и биомакромолекулами еще не вполне поняты. Так до конца не выяснена роль конформации и лигандного состояния биополимера при формировании различных биоконьюгатов. Но главное, пока не установлена возможная роль воды, физико-химическое состояние которой может определять и регулировать баланс сил в таких системах. Поэтому основной целью работы является установление возможной роли сетки водородных связей воды в механизме взаимодействия в системе «вода-наночастицабиополимер» на примере дисперсии сывороточного альбумина быка в различном лигандном состоянии, а также в присутствии наночастиц шунгитового углерода.

Сокращения: ShC – графены шунгитового углерода, GO – оксид графена, БСА – бычий сывороточный альбумин, ЖК – жирные кислоты, КРС – комбинационное рассеяние света.

Базовые элементы шунгитового углерода (ShC) относятся к числу графенов [5, 6]. Они представляют собой молекулы, близкие по свойствам к восстановленному оксиду графена. Предполагается, что такие элементы в докембрийский период истории Земли агрегировали в наночастицы и в составе гидротермальных флюидов образовывали залежи шунгитовых пород [7, 8]. В настоящее время разработаны технологии разделения этих пород на составляющие и получены устойчивые водные дисперсии углеродных наночастиц [9]. Исследование эффектов и понимание механизмов взаимодействий таких природных графеновых наночастиц с биологическими молекулами представляют собой приоритетную цель в биомедицинском направлении при решении задач регуляции связывания и транспорта лигандов белками, окислительно-восстановительного баланса в системах с участием белков, структурно-динамического состояния как самих макромолекул белка, так и фазовых свойств их дисперсий [10, 11]. При этом наночастицы ShC в гораздо большей степени удовлетворяют требованию стандартизации физико-химических свойств углеродных наноматериалов при создании водно-дисперсных систем, чем получаемые разными способами искусственные углеродные наноматериалы, даже после специальной очистки и функционализации последних [12].

Сывороточный альбумин является одним из наиболее распространенных модельных объектов при изучении молекулярных биологических эффектов углеродных наночастиц, что определяется его коммерческой доступностью и важнейшей физиологической ролью в функционировании различных тканей и сред организма животных и человека. Ранее уже исследовалось [13] влияние химического состава раствора на адсорбцию сывороточного альбумина человека на оксиде графена (GO). Была установлена ключевая роль электростатики в контроле взаимодействий «сывороточный альбумин человека – оксид графена». При этом физическое состояние адсорбционных белковых слоев было сопряжено с конформационным состоянием белка. В работе [14] получена информация о влиянии концентрации бычьего сывороточного альбумина (БСА) на коллоидную стабильность дисперсии GO в экологически значимых условиях. Стабильность была максимальной в диапазоне промежуточных концентраций белка и обусловливалась разной степенью его адсорбции. Низкая концентрация БСА снижала стабильность GO в основном за счет электростатического связывания положительно заряженных лизиновых групп БСА и отрицательно заряженных групп GO, а также эффекта сжатия двойного слоя. С увеличением концентрации БСА рост адсорбции БСА на GO приводил к сильному стерическому отталкиванию, которое в конечном итоге преобладало и стабилизировало дисперсию GO.

Исследование биоконъюгатов наночастиц ShC с альбумином и его агрегатами проводилось нами ранее методами гель-фильтрационной хроматографии, дифференциальной сканирующей калориметрии, электронного парамагнитного резонанса спиновых меток и спиновых зондов, динамического рассеяния света [15]. Основным эффектом взаимодействия сывороточного альбумина и наночастиц ShC в дисперсии является увеличение разницы температур индивидуальных переходов термодинамических структурных доменов белка. При этом наблюдаются различия в характере взаимодействий структурных доменов сывороточного альбумина с поверхностью наночастиц ShC. Получены убедительные экспериментальные доказательства, что взаимодействие наночастиц ShC с макромолекулами альбумина наблюдается в основном в области их центров связывания жирных кислот (ЖК) [16]. Данные, полученные методом электронного парамагнитного резонанса спинового зонда для модифицированных спин-мечеными ЖК макромолекул сывороточного альбумина и методом дифференциальной сканирующей калориметрии по теплотам плавления макромолекул в дисперсиях при разном содержании наночастиц ShC, указывают на различия в конформационном состоянии белка, зависящие как от концентрации белка, так и наночастиц. При этом анализ распределения молекул белка и их агрегатов по размерам методом динамического рассеяния света показал существенное повышение однородности распределения под влиянием наночастиц ShC, которое мы объясняли ролью ShC в перераспределении ЖК между фракциями белка. Было высказано предположение, что формирование био-нано-границы между БСА и наночастицами ShC способствует большей однородности границы связывания ЖК, уменьшению фракций белка и активных центров на поверхности белка, ответственных за супрамолекулярную гетерогенность белка в растворе. В случае наночастиц ShC это объясняется переходом лигандов (ЖК) с молекул сывороточного альбумина на наночастицы графеноподбного углерода с соответствующим изменением соотношения фракций сывороточного альбумина с различным содержанием лигандов.

При интерпретации всех полученных результатов явно или неявно подразумевалась важная роль воды в реализации обнаруживаемых эффектов. В то же время данные об изменении состояния системы водородных связей в дисперсии, сопровождающих изменения взаимодействия между компонентами дисперсии, отсутствовали. Поэтому конкретной задачей настоящей работы было исследование изменений конфигурации сетки водородных связей в дисперсии БСА в

сравнении с гибридной дисперсией БСА-ShC в условиях различия лигандного состояния белка при взаимодействии с жирными кислотами. Для этого предполагалось использовать метод комбинационного рассеяния света (КРС) в частотной области спектра $3000-3650 \text{ см}^{-1}$, который характеризует состояние системы водородных связей воды [17]. Изменения концентрации белка в широком диапазоне от 0.01 до 10 мг/мл позволяют охватить относительно большой диапазон молярного соотношения графен/белок (около 2000–0.1).

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Стабильные водные дисперсии наночастиц ShC были получены по оригинальной методике [9]. Об их графеновой природе существуют экспериментальные и теоретические свидетельства [18]. Раствор БСА в дистиллированной воде с концентрацией от 0.02 до 20 мг/мл добавляли в дисперсию наночастиц ShC в дистиллированной воде (исходная концентрация наночастиц 0.07 и 0.14 мг/мл) в соотношении 1:1, тщательно перемешивали и выдерживали не менее трех часов до съемки. Полученные смеси были однородны по цвету и сохраняли устойчивость во времени. Использовали коммерческие препараты альбумина фирмы Sigma (США) - как обезжиренный (БСАобезжир), так и нативный, фракция V (БСА5фр), содержащая ЖК. Эта фракция содержит не более 1.5 моль ЖК на моль белка [19]. В ряде случаев применяли пальмитиновую кислоту для насыщения образцов сывороточного альбумина жирными кислотами.

Взаимодействие наночастиц ShC с белковыми молекулами регистрировали по спектрам КРС с использованием рамановского спектрометра Nicolet Almega XR (Thermo Scientific, CIIIA), оснащенного лазером с длиной волны излучения 532 нм, со спектральным разрешением выше 1 см⁻¹; мощность возбуждающего лазера на данной длине волны составляла 15 мВт. Спектры регистрировали с 30-минутным накоплением. Дисперсии помещали в кварцевую кювету, которую устанавливали в отделении для макрообразцов перпендикулярно оси лазерного пучка. Температура образца равнялась 22°С и под действием лазера не менялась. Спектр КРС получали путем возбуждения образца (дисперсии наночастиц) при 532 нм с последующими измерениями частоты и интенсивности рассеянного света. Наряду с регистрацией изменения интенсивности полос ID, IG и сдвига частот G-полосы оценивали изменения положения, интенсивности и ширины пиков КРС в области спектра 3000-3650 см⁻¹, которые характеризуют состояние системы водородных связей воды [17, 20]. Спектральные дан-

БИОФИЗИКА том 67 № 6 2022

ные комбинационного рассеяния, такие как положение пика, площадь полосы и ширина полосы (т.е. полная ширина на полувысоте), были определены с использованием программного обеспечения OMNIC. Полосы в спектрах аппроксимированы гауссовыми функциями. Асимметрию линий учитывали в результате аппроксимации спектров тремя гауссовыми функциями. Анализировали пики, полученные по вертикальным линиям положения максимумов гауссианов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования свойств дисперсий наночастиц ShC и их конденсатов показали, что они обладают многоуровневой структурной организацией в воде, возникающей в результате последовательных взаимодействий исходных структурных элементов [18]. Графеновые фрагменты размерами до 1 нм (около 0.4-0.7 нм), обладающие свойствами восстановленного оксида графена, являются минимальным базовым элементом ShC. В полярных растворителях они образуют стопки в пять-шесть слоев с суммарным дипольным моментом 6.5 Д и представляют собой первый уровень структурной организации. Последующие уровни организации представлены глобулярными кластерами этих стопок и агрегатами. Водные дисперсии наночастиц ShC обладают широким спектром свойств, которые, с одной стороны, указывают на их прямую связь со свойствами углерода шунгитовых пород, а с другой стороны, подобны свойствам, характерным для водных дисперсий таких квантовых точек, как наночастицы золота и серебра, CdS и CdSe, а также синтетических графеновых квантовых точек [21]. Дипольный момент и полярные группы по дефектным краям могут придавать поверхности наночастиц ShC гидрофильные свойства, способствовать устойчивости кластеров из наночастиц в водной дисперсии и их способности к интеркаляции воды внутри структур [22].

Спектроскопия КРС ранее использовалась как один из методов, позволяющих охарактеризовать структурную однородность и структурные уровни наночастиц ShC в водной дисперсии и при конденсации дисперсии наночастиц ShC в диапазоне $200-4000 \text{ сm}^{-1}$ [12]. Взаимодействие наночастиц углерода с белковыми молекулами можно было бы регистрировать в спектрах КРС по изменению интенсивности обычных для углерода полос ID, IG в области 1300–1600 см⁻¹ и сдвигу частот G-полосы [23]. Но в спектре КРС белка в растворе наблюдается широкий пик при 1573 см⁻¹ с плечом 1635 см⁻¹, характерный для α -спирали белка, который сам по себе располагается в области частот D- и G-пиков углерода (рис. 1, спектр *I*; рис. 2а, спектр *I*). При этом суммарный спектр БСА-ShC



Рис. 1. Сравнение спектров КРС в дисперсиях БСА (1), БСА_{обезжир} + дисперсия наночастиц ShC (2) и БСА_{5фр} + дисперсия наночастиц ShC (3).

в области G полосы характеризуется одним максимумом, который смещается в сторону меньших частот (1612, 1605 см⁻¹) по сравнению с G-пиком в дисперсии наночастиц графеноподобного ShC (рис. 2a, спектр *I*), но в сторону больших частот по сравнению с положением максимума пика в растворе белка. Положение максимума пика чувствительно к лигандному состоянию БСА, определяемому взаимодействием с жирными кислотами (рис. 2), однако закономерности этого взаимодействия остаются неясными. Значительный сдвиг полосы свидетельствует о различном взаимодействии наночастицы ShC с БСА_{5фр} и ShC с БСА_{обезжир}. Так, изменения частот 1622, 1605, 1612, 1635 см⁻¹в ряду ShC, БСА_{обезжир}-ShC, БСА_{5фр}-ShC могут быть сопряжены с интеркаляцией воды в графеновые слои наночастиц [8].

Более информативным относительно опосредованного растворителем взаимодействия между молекулами белка и ShC, которое зависит от лигандного состояния БСА-ЖК, оказывается анализ спектров КРС в высокочастотной области спектра 3000–3650 см⁻¹. Совокупность пиков в этой области характеризуют состояние водородных связей молекул воды (рис. 3).

Несмотря на то что деконволюция спектра воды в этой области позволяет выделить пять характеристических частот, наиболее интенсивными являются две частоты 3230 и 3440 см⁻¹ которым соответствуют 90% состояния воды [17, 20] (рис. 3). Первая характеризует симметричную моду валентных ОН-колебаний в сетке связей молекул воды в состоянии «два донора–два акцептора» (DDAA-OH), а вторая – ассиметричную моду воды в состоянии «донор–акцептор» (DA-OH). Отношение интенсивностей (I) пиков $d = I(3440 \text{ см}^{-1})/I(3230 \text{ см}^{-1})$



Рис. 2. (а) — Сравнение спектров КРС дисперсий наночастиц ShC (*1*), БСА_{обезжир} + дисперсия наночастиц ShC (*2*) и БСА_{5фр} + дисперсия наночастиц ShC (*3*). (б) — Сравнение спектров КРС конденсатов: БСА_{обезжир} + дисперсия наночастиц ShC (*1*), дисперсия наночастиц ShC (*2*).

позволяет оценить изменение ориентационной упорядоченности молекул воды, поскольку увеличение этого отношения коррелирует с уменьшением межмолекулярного сопряжения ОН-осцилляторов и уменьшением ограничения подвижности молекул воды.

Вместе с тем под влиянием растворенных веществ или изменения температуры значения частот могут изменяться [20]. Так, в присутствии гидратированных тканей биологического происхождения и биомакромолекул положения пиков смещаются в область 3450 и 3250 см⁻¹ [24, 25]. В наших образцах также наблюдались сдвиги максимумов интенсивности (DA-OH) и (DDAA-OH) (табл. 1).

На диаграмме (рис. 4) приведены усредненные значения отношения d с учетом ширины пиков l на половине высоты: $d = I_1 l_1/I_2 l_2$, полученные в разных сериях экспериментов: для воды, для дис-



Рис. 3. Сравнение спектров КРС дисперсий БСА+ShC при разных отношениях концентраций компонентов и различном лигандном состоянии белка: $1 - \text{БCA}_{5\text{фp}}$, 1 м г / м л; $2 - \text{БCA}_{\text{обезжир}}$, 0.025 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $3 - \text{БCA}_{5\text{фp}}$, 0.025 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $4 - \text{БCA}_{\text{обезжир}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{БCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{БCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{БCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $5 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $0 - \text{BCA}_{5\text{фp}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/мл ShC; $0 - \text{BCA}_{5\text{\phip}}$, 0.05 мг/мл + 0.07 мг/м ShC; $0 - \text{BCA}_{5\text{\phip}}$, 0.05 мг/м + 0.07 мг/м ShC; $0 - \text{BCA}_{5\text{\phip}}$, 0.05 мг/м + 0.07 мг/м ShC; $0 - \text{BCA}_{5\text{\phip}}$, $0 - \text{BCA}_{5\text{BC}}$, $0 - \text{BCA}_{5\text{BC}}$,

персий ShC в концентрации 0.07-0.14 мг/мл, для дисперсий ShC (0.14 мг/мл) в присутствии разных концентраций ЖК, для БСА_{5фр} (5 мг/мл) и БСА_{5фр} (5 мг/мл) в присутствии от 1 до 10 молекул пальмитиновой ЖК на молекулу белка, для гибридных наночастиц ShC с нативным БСА_{5фр} и обезжиренным БСА_{обезжир} при разных концентрациях белка, ЖК и ShC. Если в качестве отношения брать только амплитуды спектров или только полную площадь спектров, получаемую в процессе деконволюции сигналов, то абсолютная величина отношения при этом изменяется, но полученные тенденции к изменению сохраняются во всех случаях.

В терминах ограничения подвижности молекул воды на основе данных рис. 4 можно сделать вывод, что в дисперсиях ShC (значение *d* мало) подвижность молекул воды заметно уменьшается (водородные связи укрепляются). Взаимодействие ShC с ЖК стимулирует слабый рост по-



Рис. 4. Диаграмма, характеризующая диапазоны изменений усредненной по ряду измерений величины отношения интенсивности пиков d = (DA-OH)/(DDAA-OH) спектров КРС в диапазоне 3200–3600 см–1 по разным образцам дисперсий ShC в концентрациях 0.07– 0.14 мг/мл) (*I*); ShC (0.14 мг/мл) в присутствии ЖК пальмитиновой кислоты в отношении 1–10 моль ЖК на моль ShC (*2*); БСА_{5фр} (5 мг/мл) (*3*) и БСА в присутствии пальмитиновой кислоты в отношении (1–10) ЖК на молекулу БСА (*4*); дисперсий БСА в присутствии наночастиц ShC в концентрации 0.07 мг/мл (*5*–7): (БСА_{5фр} 0.1 мг/мл+ShC) (5); БСА_{5фр} 0.05 мг/мл + ShC (*6*); БСА_{обезжир} 0.025 мг/мл + ShC (*7*).

движности воды, возможно, вследствие ее высвобождения из областей связывания с ЖК. При этом нет заметной зависимости от концентрации пальмитиновой кислоты. При умеренных концентрациях молекул белка (5 мг/мл) их взаимодействие с ЖК не влияет на состояние молекул воды, поскольку взаимодействие в основном происходит в неполярных полостях белка и при этом высвобождается мало воды. При добавлении в эту систему 0.14 мг/мл ShC подвижность молекул воды увеличивается (величина *d* pacter), возможно, вследствие взаимодействия ShC с поверхностью белка с высвобождением связанной воды. При большом молярном отношении ShC/белок ~ 1000 (два последних столбца на рис. 4) подвижность молекул воды уменьшается

	БСА _{5фр}	БСА _{обезжир}	БСА _{5фр} -ShC	БСА _{обезжир} -ShC
DDAA-OH	3235 ± 3	3226 ± 2	3231 ± 1	3230 ± 3
DA-OH	3445 ± 4	3434 ± 3	3445 ± 2	3440 ± 4

Таблица 1. Положение пиков спектров КРС дисперсий БСА в диапазоне 3200–3600 см⁻¹

Примечание. Лигандное состояние дисперсий БСА: с ЖК (БСА_{5фр}) и без ЖК (БСА_{обезжир}), а также в присутствии наночастиц шунгитового углерода (ShC). Положение пиков спектров усреднено для концентраций белка от 0.01 до 10 мг/мл; концентрация наночастиц шунгитового углерода (ShC) – 0.07 мг/мл.

(величина *d* мала) и в основном, видимо, определяется ее взаимодействием с ShC (табл. 1).

На рис. 5 показаны величины отношения интенсивностей пиков спектров КРС d = (DA-OH)/(DDAA-OH) в зависимости от концентрации белка в диапазоне 0.01-10 мг/мл. Обращают на себя внимание их относительно резкие и систематические изменения в диапазоне концентраций 0.1-0.3 мг/мл белка и возвращение к исходному состоянию с дальнейшим увеличением концентрации белка. Изменения зависят как от лигандного состояния БСА (наличие ЖК), так и влияния ShC. Так, в присутствии ShC скачок меньше, а в системе БСА+ЖК+ShC отклонения во всем диапазоне концентраций белка практически отсутствуют. При этом уменьшение отношения (DA-OH)/(DDAA-OH) указывает на упрочнение водородных связей, а увеличение - на их ослабление. Подобные скачки отношения интенсивности пиков в системе «вода-этанол» в зависимости от концентрации последнего связывались с упрочнением связей в системе в связи с образованием водных клатратов вокруг неполярных групп спирта [26]. В нашем случае первоначальное упрочнение связей с ростом концентрации белка может быть связано с влиянием неполярных групп белка на систему связей воды, которое затем уменьшается вследствие стабилизации нативной конформации, агрегации и/или олигомеризации молекул белка через взаимодействие и экранирование неполярных групп. Как известно, сывороточные альбумины склонны к олигомеризации, в которой может участвовать до 20% белка [27]. Если белки не содержат лиганды, взаимодействующие с ними по неполярным полостям, то стабилизация наблюдается при меньших концентрациях белка как на рис. 5 (образец 2). В присутствии ShC, графены которого также взаимодействуют с белком по неполярным полостям, стабилизация сетки водородных связей воды не наблюдается, что особенно заметно в системе БСА_{5фр}+ ShC.

В табл. 1 приведены усредненные положения пиков спектров КРС в диапазоне $3200-3600 \text{ см}^{-1}$, соответствующих валентным ОН-колебаниям в сетке водородных связей воды (DDAA-OH) и (DA-OH). Их изменения в зависимости от лигандного состояния белка и взаимодействия с ShC могут свидетельствовать об индуцированном изменении сетки водородных связей воды во всей системе. При этом сдвиг в низкочастотную область указывает на «замораживание» колебаний, как это наблюдается при понижении температуры [20]. Более низкие значения волновых чисел в образцах обезжиренного БСА могут указывать на более прочную сетку водородных связей в такой системе, возможно, из-за большей доступности



Рис. 5. Изменение отношения интенсивностей пиков спектров КРС в диапазоне 3200–3600 см–1 (DA-OH)/(DDAA-OH) дисперсий БСА при концентрации белка от 0.01 до 10 мг/мл в различном лигандном состоянии: БСА_{5фр} (1) и БСА_{обезжир} (2), а также это изменение в присутствии наночастиц шунгитового углерода в концентрации 0.07 мг/мл.: БСА_{обезжир}-ShC (3), БСА_{5фр}-ShC (4). Относительная ошибка определения отношения не превышала 10%.

неполярных областей белка для воды и формирования там гидратации полуклатратного типа.

Таким образом, резкое изменение отношения интенсивностей (DA-OH)/(DDAA-OH) на рис. 5 в определенном диапазоне концентраций белка может быть интерпретировано как немонотонный характер изменения состояния всей системы водородных связей воды в дисперсии, сопряженного с состоянием конформации или ассоциации белковых макромолекул. Это явление напоминает микрорасслаивание неэлектролита на пространственной сетке водородных связей воды, при котором упругость сетки выталкивает молекулы неэлектролита к ее дефектам [28]. В местах дефектов молекулы неэлектролита объединяются так, чтобы их гидрофобные части имели наименьший контакт с водой. С дальнейшим ростом концентрации неэлектролита существующая сетка Н-связей разрушается и вместе с этим прекращается процесс расслаивания.

Немонотонный характер температурных изменений конформации белков в предденатурационной области температур также наблюдали в их растворах методом ИК спектроскопии на полосе поглощения Амид I [29]. Было установлено, что по мере роста температуры в растворе БСА сначала система водородных связей воды разрыхляется, достигает некоторого предела, а затем начинает перестраиваться и связи восстанавливаются. Таких скачков наблюдается два, при 25 и 43°С. Это может быть сопряжено с изменением конформации белка и сопровождаться изменением

взаимодействия между молекулами белков и их разделением на фракции. Не исключено, что фракции белка могут возникать из-за неравномерного распределения ЖК по центрам сорбции. В этом случае в присутствии ShC происходит модификация центров, способствующая более однородному распределению ЖК по центрам связывания. Это ведет к уменьшению числа различных фракций белка, ответственных за гетерогенность белка в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование изменений конфигурации сетки водородных связей воды в гибридной дисперсии БСА-ShC в сравнении с дисперсией БСА в условиях изменения лигандного состояния белка при взаимодействии с жирными кислотами показало, что конформационное состояние альбумина определяет состояние водородных связей воды. Конформация альбумина зависит от его концентрации, способности к адсорбции жирных кислот и взаимодействию с наночастицами ShC, которое происходит в первую очередь по центрам связывания ЖК. Обезжиренный белок в большей степени стабилизирует сетку водородных связей воды вследствие большей доступности неполярных участков для воды, но, вероятно, из-за этого имеет большую склонность к агрегации из-за уменьшения растворимости. С ростом концентрации белка вследствие агрегации или стабилизации нативного состояния экспонирование гидрофобных областей уменьшается, и сетка связей воды разрыхляется. Под влиянием наночастиц ShC происходит перераспределение ЖК по центрам сорбции и ведет к повышению однородности распределения активных центров на поверхности белка. При этом сетка водородных связей изначально поддерживается в более рыхлом и однородном состоянии при вариациях концентрации компонент. Это сопряжено с минимизацией фракционности белка и гетерогенности его супрамолекулярной организации в дисперсии. Проведенные исследования подтверждают обнаруженную ранее многофункциональность наночастиц ShC в дисперсии, выполняющих функции гомогенизаторов и модификаторов белков, а также возможных регуляторов транспорта и взаимодействия жирных кислот с белками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные данные получены на оборудовании ЦКП ФИЦ КарНЦ РАН

БИОФИЗИКА том 67 № 6 2022

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного заказа (проекты № FMEN-2022-0006 и № АААА-А18-118020690131-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. J. Liu, L. Cui, and D. Losic, Acta Biomater., 9, 9243 (2013).
- Y. Ni, F. Zhanga, and S. Kokot, Anal. Chim. Acta, 769, 40 (2013).
- H. Sun, A. Zhao, N. Gao, et al., Angew Chem. Int. Ed., 54 (24), 7176 (2015).
- 4. B. S. Gully, J. Zou, G. Cadby, et al., Nanoscale, 4, 5321 (2012).
- 5. N. N. Rozhkova, A. V. Gribanov, and M. A. Khodorkovskii, Diamond and related materials. **16**, 2104 (2007).
- 6. E. F. Sheka and N. A. Popova, Phys. Chem. Chem. Phys., **15**, 13304 (2013).
- 7. E. F. Sheka, N. N. Rozhkova, K. Holderna-Natkaniec, and I. Natkaniec, Nanosystems: Physics, chemistry, mathematics, **5** (5), 659 (2014).
- 8. E. F. Sheka and N. N. Rozhkova, Int. J. Smart Nano Mat., № 5, 1 (2014).
- 9. Н. Н. Рожкова и С. С. Рожков, Патент РФ № 2448899 (2012).
- 10. S. P. Rozhkov and A. S. Goryunov, Russ. J. Gen. Chem. **83** (13), 2585 (2013).
- 11. С. П. Рожков и А. С. Горюнов, Труды КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология, №12, 38 (2018).
- N. N. Rozhkova, Russ. J. Gen. Chem. 83 (13), 2676 (2013).
- X. Liu, C. Yan, and K. L. Chen, Environ. Sci. Technol., 53 (15), 8631 (2019).
- 14. B. Sun, Y. Zhang, W. Chen, et al., Environ. Sci. Technol., **52** (13), 7212 (2018).
- С. П. Рожков, А. С. Горюнов, Труды КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология, № 5, 33 (2017).
- A. Goryunov, S. Rozhkov, and N. Rozhkova, Eur. Biophys. J., 49, 85 (2020).
- L. E. Masson, C. M. O'Brien, I. J. Pence, et al., Analyst, 143, 6049 (2018).
- N. N. Rozhkova, S. P. Rozhkov, and A. S. Goryunov, In *Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene*, Ed. by K. D. Slatter (CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2016), Vol. 1, pp. 151–174.
- 19. A. Michnik, K. Michalik, and Z. Drzazga, J. Thermal Anal. Calorim., **80**, 399 (2005).

- S. M. Baschenko and L. S. Marchenko, Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics, 14 (1), 77 (2011).
- Б. С. Разбирин, Н. Н. Рожкова, Е. Ф. Шека и др., Журн. эксперим. и теорет. физики, 145 (5), 838 (2014).
- 22. Y. Xu, T. Watermann, H.-H. Limbach, et al., Phys. Chem. Chem. Phys., **16**, 9327 (2014).
- 23. A. C. Ferrari and J. Robertson, Phil. Trans. R. Soc., **362**, 2477 (2004).

- 24. Y. Maeda and H. Kitano, Spectrochim. Acta. Part A, **51**, 2433 (1995).
- 25. M. Unal and O. Akkus, J. Biomed. Opt., **23** (1), 015008 (2018).
- 26. S. Burikov, S. Dolenko, T. Dolenko, et al., Mol. Physics, **108** (6), 739 (2010).
- G. D. Fullerton, K. M. Kanal, and I. L. Cameron, Cell Biol. Intern., 30, 86 (2006).
- И. А. Чабан, М. Н. Родникова и В. В. Жакова, Биофизика, 41 (2), 293 (1996).
- 29. А. П. Жуковский, Н. В. Ровнов и А. И. Халоимов, Биофизика, **29**, 586 (1984).

Interaction between Serum Albumin Molecules, Fatty Acids and Graphenes of Shungite Carbon Nanoparticles in Aqueous Dispersion Based on Raman Spectroscopic Analysis of Water in the High Wavenumber Region

S.P. Rozhkov *, A.S. Goryunov*, V.A. Kolodey**, L.A. Pron'kina**, and N.N. Rozhkova**

*Institute of Biology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya ul. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

**Institute of Geology, Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya ul. 11, Petrozavodsk, 185910 Russia

The Raman spectroscopy method was used to analyze the positions of extrema, amplitudes, and widths of the main Raman spectral lines in the wavenumber range $3200-3600 \text{ cm}^{-1}$ attributed to the hydrogen bonded complex upon addition of bovine serum albumin with a concentration of 0.01-0.10 mg/ml. The values obtained for these parameters in the presence and absence of fatty acids within the said protein concentration range were compared and the effects of shungite carbon nanoparticles on these variations were studied. The stability of the hydrogen bonded complex in water is found to depend significantly nonlinearly on the protein concentration: the stability was maximum in the protein concentration. The destabilization of water hydrogen bonds with increase and decrease of the protein concentration. The destabilization of water hydrogen bonds with increasing protein concentration may be associated with its conformation and/or aggregation. Changes depend both on a ligand state of bovine serum albumin (presence of fatty acids) and on the effects of shungite carbon. In the presence of nanoparticles of shungite carbon, the hydrogen bonded complex is maintained in a more uniform but loosened state over the entire range of protein concentrations, with and without fatty acids. The data obtained indicate that water plays an important role in the mechanisms of interaction between protein molecules, as well as between shungite carbon graphenes and the protein surface in the fatty acid binding sites.

Keywords: albumin, fatty acid, schungite carbon graphenes, Raman scattering, hydrogen bonds