

УДК 577.3

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ШУНГИТОВЫМ НАНОУГЛЕРОДОМ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Особенности механизма биоактивности шунгитового наноклерода (ShC), как новой ультрадисперсной формы углерода, представляют большой интерес с точки зрения биомедицинских приложений наноматериала и охраны окружающей среды. Термодинамические эффекты взаимодействия ShC с сывороточным альбумином (СА) человека в водной нанодисперсии исследовались методом дифференциальной сканирующей калориметрии в аспекте молекулярной структуры и фракционного состава белка. Путем деконволюции кривой денатурации альбумина на основе гауссовых функций проанализированы характеристики (температуры, энтальпии) отдельных эндотермических переходов белка. Установлено, что основным эффектом взаимодействия СА и ShC в растворе является увеличение разницы температур индивидуальных переходов, причем общей тепловой дестабилизации белка не происходит, хотя имеет место частичная дестабилизация. Этот результат не может быть следствием изменения внутримолекулярных межмолекулярных взаимодействий в белковых макромолекулах при межмолекулярных взаимодействиях с ShC из-за доступности поверхности наночастиц лишь малой доле общего белка в нанодисперсии. Показано, что в основе наблюдаемых эффектов лежит влияние ShC на соотношение белковых фракций с разным содержанием жирных кислот (ЖК) через воздействие на часть ЖК в центрах связывания на белке и их переход на наночастицы. При этом, вероятно, имеет место конкуренция белка и наноклерода за ЖК, при которой определяющую роль может играть соотношение их концентраций в дисперсии. Значение такой конкуренции связано с ее возможным использованием для воздействия на транспортную функцию сывороточного альбумина по отношению к ЖК.

К л ю ч е в ы е с л о в а: белок; водная нанодисперсия углерода; дифференциальная сканирующая калориметрия; жирные кислоты.

**A. S. Goryunov, S. P. Rozhkov, G. A. Sukhanova, A. G. Borisova.
THERMODYNAMIC EFFECTS OF SERUM ALBUMIN INTERACTION WITH
SHUNGITE NANOCARBON**

The bioactivity features of shungite nanocarbon (ShC) as a new ultrafine carbon form are of particular interest from the point of view of both biomedical applications of the nanomaterial and environmental issues. Thermodynamic effects of human serum albumin (SA) interaction with ShC in water nanodispersion have been studied regarding the molecular structure and protein fraction content using differential scanning calorimetry. Deconvolution of the albumin denaturation curve on the basis of Gaussian functions was used to analyze the characteristics (temperature, enthalpy) of individual endothermic

transitions of the protein. The increase of the temperature difference of individual transitions was found to be the major SA-ShC interaction effect. No overall thermal destabilization of the protein was observed, although some partial destabilization did occur. This result cannot ensue from changes in intramolecular interdomain interactions in protein molecules at intermolecular interactions with ShC since only a small part of the total protein in nanodispersion has access to nanoparticle surface. The effects observed are shown to be related to the ShC influence on the ratio of the protein fractions with different fatty acids (FA) content by affecting some part of FA at their protein binding sites and their transition to nanoparticles. Protein and nanocarbon probably compete for FA in the process, and their concentration ratio in the dispersion is of decisive importance. The significance of this sort of competition consists in the possibility to influence the transport function of serum albumin with respect to FA.

Key words: protein; water carbon nanodispersion; differential scanning calorimetry; fatty acids.

Введение

Понимание фундаментальных взаимодействий новых ультрадисперсных форм углерода с биологическими молекулами, тканевыми структурами и целыми организмами является первоочередным с точки зрения как биомедицинских приложений, так и охраны окружающей среды [Wang et al., 2016]. В ряду наноматериалов, встречающихся в окружающей среде, преобладают углеродосодержащие. Один из ярких примеров – шунгитовый наноуглерод (ShC) [Rozhkova et al., 2016], который весьма специфичен, довольно широко распространен и активно внедряется в различные биоактивные продукты не всегда с достаточным обоснованием. Физико-химические механизмы биоактивности ShC малоизучены и малопонятны в особенности в том, что касается наноуглерода, высвобождаемого непосредственно из шунгитовой породы в результате взаимодействия с водой в различных процедурах получения водных дисперсий ShC. Биомолекулярные эффекты, будучи выясненными, смогут найти рациональное использование при поиске и применении новых функций углеродных наноматериалов и обеспечении биологической безопасности.

Результаты исследований структуры белковых молекул при взаимодействии с наночастицами различной природы, в том числе углеродными, свидетельствуют, что изменения возможны на уровне как вторичной, так и третичной структуры белка [Brandes et al., 2006; Narayanan et al., 2007]. Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) позволяет делать выводы о структурном состоянии белковых макромолекул в составе комплекса с наноуглеродом на основе термодинамических данных о теплотемпературных дисперсий при изменении их температуры,

об энтальпии тепловой денатурации белка, о характеристических температурах последовательных стадий разворачивания макромолекул. Это один из прямых методов, в котором при исследовании дисперсии макромолекул и их комплексов доменная организация белка может проявиться непосредственно на термограмме [Privalov, 1982]. Мы исследовали термодинамические эффекты взаимодействия ShC с сывороточными альбуминами в водной нанодисперсии с учетом фракционного состава и структуры белка методом ДСК. Основной белок плазмы млекопитающих сывороточный альбумин (СА) в настоящее время представляет интерес с точки зрения разработки лекарственных препаратов, поскольку может быть использован для того, чтобы скрыть активный ингредиент внутри белковой матрицы во избежание его преждевременного распознавания защитными системами организма. За счет взаимодействия с наночастицами углерода также может быть повышен потенциал СА как носителя органических лигандов.

Материалы и методы

Использовались препараты коммерческого обезжиренного (5-я фракция) и обезжиренного сывороточного альбумина человека (САЧ) производства PAA Laboratories GmbH. Стабильные водные дисперсии наночастиц ShC (ShCNP) представляли собой приготовленные из шунгитового горнорудного сырья Шуньга I согласно методике Н. Н. Рожковой [2011] и охарактеризованные с помощью спектрофотометрии UV-Vis, рамановского рассеяния и динамического рассеяния света (ДРС) образцы нанодисперсии с концентрацией 0,08–0,18 г/л ShC и pH 7,2–7,4. Размер ShCNP определялся по максимуму кривой распределения интенсивности ДРС (Nanosizer NanoZS,

Таблица 1. Температура (°C) переходов плавления сывороточного альбумина человека в водном растворе и в водной дисперсии шунгитового наноуглерода

Состав раствора	№ перехода						
	Общий	1	2	3	3-1	3-2	2-1
САЧ	73,4 ± 2,7	62,1 ± 3,9	70,3 ± 2,1	76,3 ± 1,5	14,2	6,0	8,2
САЧ + ShC	76,2 ± 1,0	56,7 ± 2,9	68,7 ± 3,9	76,9 ± 1,5	20,2	8,2	12,0

Примечание. САЧ – обезжиренный сывороточный альбумин человека, ShC – шунгитовый наноуглерод. 3-1, 3-2, 2-1 – разницы температур (°C) переходов попарно, исключая общий. Указаны стандартные ошибки (n = 12).

Malvern) по размерам при 51 нм и полуширине 21 нм. Термодинамические свойства САЧ изучались с помощью микрокалориметра NanoDSC (TA-Instruments) в водных нанодисперсиях ShC путем регистрации термограмм (зависимостей избыточного теплотогощения растворов СА от температуры). Использование малых концентраций белка – 0,5 г/л – обеспечивало наивысшие возможные соотношения ShC/СА и, соответственно, максимальный эффект взаимодействия ShC и САЧ. Анализ данных ДСК методом деконволюции термограмм проводился с помощью пакета программ обработки микрокалориметрических данных TA Instruments NanoAnalyze™ Software.

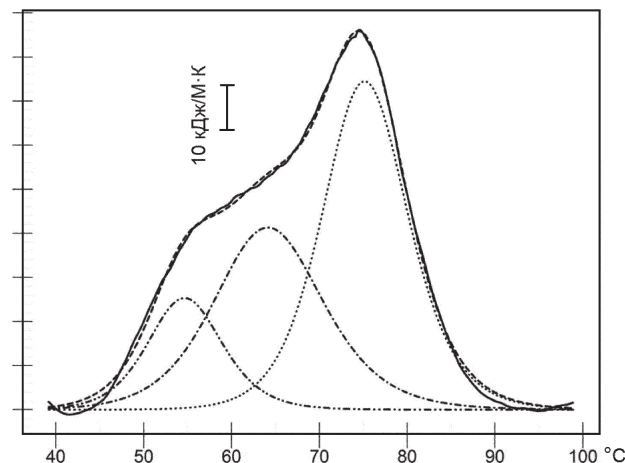
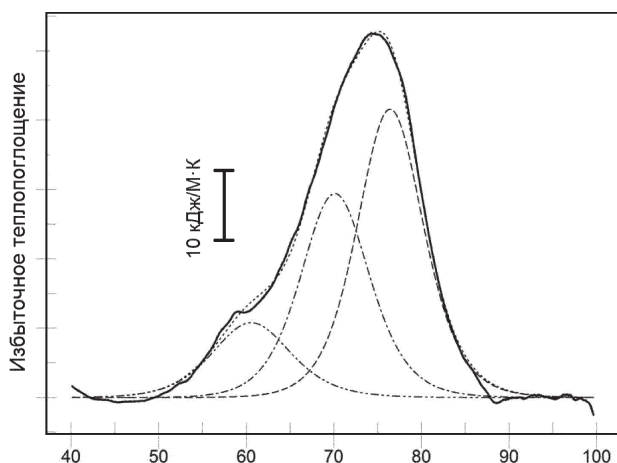
Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты и обсуждение

Кривая денатурации СА может быть представлена в виде комбинации трех гауссовых составляющих, которые соответствуют трем независимым эндотермическим переходам,

отвечающим плавлению трех доменов молекулы СА [Тиктопуло и др., 1985]. При этом предполагается, что каждый переход соответствует двухстадийной модели, т. е. происходит между двумя состояниями – нативным и денатурированным – по типу «все или ничего». Деконволюция на основе гауссовых функций позволяет разделить весь эндотермический переход молекул СА на такие отдельные переходы, отвечающие денатурационному превращению разных частей структуры (термодинамических доменов).

На рисунке представлены термограммы обезжиренного САЧ в водном растворе при концентрации 0,5 г/л и при внесении в раствор нанодисперсии ShC в концентрации 0,08 г/л, а также соответствующие кривые деконволюции. Они показывают, что полученные термограммы удовлетворительно описываются функцией, составленной минимум из трех гауссовых слагаемых. Эти температурные зависимости избыточного теплотогощения в целом подобны как по соотношению трех переходов, так и по их характеристикам, однако степень разрешения переходов в присутствии ShC заметно повышается при исследованных концентрациях СА. Проявляется это как гораздо более выраженное низкотемпературное плечо



Термограммы коммерческого обезжиренного сывороточного альбумина человека (САЧ) (0,5 г/л; pH 5,5) (сплошные кривые), гауссовы составляющие термограмм (симметричные пунктирные и штрих-пунктирные кривые), их сумма (асимметричные пунктирные кривые). Слева – раствор САЧ, справа – САЧ в водной нанодисперсии шунгитового углерода. Вертикальными отрезками показан масштаб оси избыточного теплотогощения для каждой из термограмм

Таблица 2. Энтальпия (кДж/М) переходов плавления сывороточного альбумина человека в водном растворе и в водной дисперсии шунгитового нанougлерода

Состав раствора	№ перехода						
	Общий	1	2	3	3-1	3-2	2-1
САЧ	994,1 ± 135,4	267,9 ± 59,9	328,5 ± 54,3	397,8 ± 54,1	129,9	69,3	60,6
САЧ + ShC	946,5 ± 128,5	254,0 ± 54,8	288,1 ± 84,1	404,5 ± 84,0	150,5	116,4	34,1

Примечание. САЧ – обезжиренный сывороточный альбумин человека, ShC – шунгитовый нанougлерод. 3-1, 3-2, 2-1 – разницы энтальпий (кДж/М) переходов попарно, исключая общий. Указаны стандартные ошибки (n = 12).

термограммы. При этом существенно изменяются: а) разница температур 1-го и 2-го слагаемых (переходов), с одной стороны, и 3-го перехода – с другой; б) соотношение энтальпий переходов в пользу 1-го и 2-го переходов. Аналогичный эффект был предварительно обнаружен нами ранее для больших концентраций САЧ – 5, 10 и 17 г/л [Rozhkov, Goryunov, 2013].

Результаты обработки термограмм, представленных на рисунке и аналогичных им, показаны в таблице 1. Видно, что в присутствии ShC разница температур увеличивается во всех трех парах переходов. Это означает, что в результате взаимодействия с ShC кооперативность общего перехода заметно снижается, о чем свидетельствует количественный показатель – разница температур индивидуальных переходов термодинамических доменов. Увеличение разницы температур, как следует из таблицы 1, происходит в первую очередь за счет снижения температуры 1-го перехода и в меньшей степени – 2-го, тогда как 3-й переход совершенно не смещается. В этой связи повышение температуры общего пика не отражает общей стабилизации белка, а является результатом формального применения процедуры автоматического определения максимума термограммы.

В таблице 2 представлены рассчитанные из тех же термограмм значения энтальпии переходов плавления обезжиренного САЧ. Здесь также наблюдается некоторая тенденция к увеличению разницы энтальпий 3-го и остальных переходов, хотя различия между раствором при отсутствии и в присутствии ShC не столь очевидны и с учетом погрешности измерений даже во многих случаях незначимы.

Введение ShC в раствор обезжиренного коммерческого САЧ не вызывает при концентрации белка 0,5 г/л никаких изменений в процессе плавления (термоиндуцированного денатурационного перехода): термограммы имеют максимум и основной, доминантный пик в области 60 °С и плечо в области 80 °С в соответствии с известными данными [Степуро и др., 1991].

Таким образом, основным эффектом взаимодействия САЧ и ShC в растворе является

увеличение разницы температур индивидуальных переходов. При этом увеличения температуры третьего, самого большого, перехода, как и достоверного повышения температуры общего перехода, не наблюдается. Это говорит о том, что общей тепловой дестабилизации белка при взаимодействии с нанougлеродом не происходит, но имеет место частичная дестабилизация: температура двух переходов из трех снижается по отношению к третьему.

Этот результат может быть расценен как следствие изменения внутримолекулярных межмолекулярных взаимодействий в белковых макромолекулах под влиянием межмолекулярных взаимодействий с ShCNP. Однако следует учесть соотношение поверхностей контакта белка и наночастиц углерода. Так, исходя из размеров ShCNP 51 нм, полученных методом ДРС, известных размеров молекул САЧ и предположения об однослойной адсорбции, даже при сравнимых концентрациях белка и наночастиц оказывается, что поверхность наночастицы доступна лишь малой доле (менее процента) всего белка в дисперсии. И тем меньшая доля белка может входить в контакт, оказываясь под влиянием взаимодействия с наночастицами при больших – 10–15 г/л – концентрациях СА, при которых эффект также заметен [Rozhkov, Goryunov, 2013]. Все это не позволяет ожидать, что даже большие изменения в структуре столь малой доли белка при таком контакте приведут к наблюдаемым значительным изменениям формы термограмм. К тому же существенных изменений в процессе термоиндуцированного денатурационного перехода обезжиренного СА в присутствии ShC не отмечается.

Другая возможность – это изменение соотношения фракций белка, различающихся по количеству и/или типу связанных жирных кислот (ЖК). Действительно, в состоянии, далеком от насыщения жирными кислотами центров их связывания на белке, как в коммерческом обезжиренном или полученном из плазмы крови доноров СА (0,5–2,0 молей ЖК на 1 моль СА), имеет место раздвоение пика теплопоглощения белка, причем при снижении насыщения соотношение интенсивностей пиков существенно изменяется в пользу

низкотемпературного пика [Степуро и др., 1991]. Именно такого рода изменения формы термограмм в нанодисперсии ShC можно видеть на рисунке. Это позволяет допустить, что повышение разрешенности пиков в присутствии ShC связано с изменением соотношения фракций белка с разным насыщением в сторону менее насыщенных жирными кислотами фракций и, вероятно, с переносом части ЖК с СА на ShCNP. Быстрый обмен, который имеет место между белковой «коронай» наночастицы и белком в растворе [Gossmann et al., 2015], обеспечивает при этом участие в переносе значительной или большей доли белка в нанодисперсии ShC. Это и делает изменения формы термограмм существенными.

Приведенные результаты позволяют заключить, что наблюдаемые эффекты связаны с влиянием ShC на соотношение фракций через воздействие на часть ЖК в центрах их связывания на белке. При этом, вероятно, имеет место конкуренция САБ и ShC за ЖК, при которой определяющее значение может иметь соотношение их концентраций в дисперсии.

Очевидно, здесь проявляется эффект перехода ЖК с белка на углеродную матрицу, который используется в процедуре очистки СА от ЖК с помощью активированного угля. Однако соотношение концентраций белка и углерода в данном случае совершенно иное: преобладает белок, а не углерод, как при очистке. Это делает такой эффект значимым с точки зрения его влияния на связывание органических лигандов (ЖК), а значит, и с физиологической точки зрения, если иметь в виду, например, транспортную функцию СА по отношению к ЖК.

Для детального выяснения механизма перехода ЖК с белка на ShC требуется исследование влияния нанougлерода, введенного в белковый раствор, на распределение СА по фракциям, различающимся по количеству и/или типу связанных ЖК.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0010).

References

Rozhkova N. N. Nanouglerod shungitov [Shungite nanocarbon]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2011. 100 p.
Stepuro I. I., Lapshina E. A., Chaykovskaya N. A. Issledovanie teplovy denaturatsii syvorotochnogo albumina cheloveka v vodno-spirovoyh i vodno-solevyh rastvorah v prisutstvii organicheskikh ligandov [Study of heat

Литература

Rozhkova N. N. Нанougлерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.

Stepuro I. I., Lapshina E. A., Chaykovskaya N. A. Исследование тепловой денатурации сывороточного альбумина человека в водно-спиртовых и водно-солевых растворах в присутствии органических лигандов // Молекулярная биология. 1991. Т. 25. С. 337–347.

Tiktopulo E. I., Privalov P. L., Borisenko S. N., Troitskiy G. V. Микрокалориметрическое исследование доменной структуры альбумина // Мол. биология. 1985. Т. 19, № 4. С. 1072–1078.

Brandes N., Welzel P. B., Werner C., Kroh L. W. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis // J. Colloid Interface Sci. 2006. Vol. 299, no. 1. P. 56–69. doi: 10.1016/j.jcis.2006.01.065

Gossmann R., Fahrländer E., Hummel M. et al. Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015. Vol. 93. P. 80–87. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.021

Narayanan S. S., Sarkar R., Pal S. K. Structural and Functional Characterization of Enzyme-Quantum Dot Conjugates: Covalent Attachment of CdS Nanocrystal to α -Chymotrypsin // J. Phys. Chem. C. 2007. Vol. 111, no. 31. P. 11539–11543. doi: 10.1021/jp072636j

Privalov P. L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system // Adv. Prot. Chem. 1982. Vol. 35. P. 1–104. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60468-4

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components // Rus. J. Gen. Chem. 2013. Vol. 83, no. 13. P. 2585–2595. doi: 10.1134/S1070363213130021

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon // Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds / Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. Vol. 1. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

Wang Z., Zhu W., Qiu Y. et al. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials // Chem. Soc. Rev. 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Поступила в редакцию 20.07.2016

domennoj struktury albumina [Microcalorimetric study of the domain structure of serum albumin]. *Molekulyarnaya biologiya [Molecular Biology]*. 1985. Vol. 19, no. 4. P. 1072–1078.

Brandes N., Welzel P. B., Werner C., Kroh L. W. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis. *J. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 299, no. 1. P. 56–69. doi: 10.1016/j.jcis.2006.01.065

Gossmann R., Fahrlander E., Hummel M., Mulaca D., Brockmeyer J., Langer K. Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015. Vol. 93. P. 80–87. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.021

Narayanan S. S., Sarkar R., Pal S. K. Structural and Functional Characterization of Enzyme-Quantum Dot Conjugates: Covalent Attachment of CdS Nanocrystal to α -Chymotrypsin. *J. Phys. Chem.* 2007. C. Vol. 111, no. 31. P. 11539–11543. doi: 10.1021/jp072636j

Privalov P. L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Prot. Chem.* 1982. Vol. 35. P. 1–104. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60468-4

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components. *Rus. J. Gen. Chem.* 2013. Vol. 83, no. 13. P. 2585–2595. doi: 10.1134/S1070363213130021

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon. Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds. Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. Vol. I. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

Wang Z., Zhu W., Qiu Y., Yi X., von dem Bussche A., Kane A., Gao H., Koski K., Hurt R. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Received July 20, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 765264

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru

Суханова Галина Антоновна

главный физик
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru

Борисова Александра Григорьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: borisova@krc.karelia.ru

CONTRIBUTORS:

Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 765264

Rozhkov, Sergey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Sukhanova, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru

Borisova, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: borisova@krc.karelia.ru