

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.3

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ УГЛЕРОДА ШУНГИТА: ДАННЫЕ ЭПР СПИН-ЗОНДА

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спин-зонда (СЗ) исследованы конформационные эффекты взаимодействия молекул сывороточного альбумина (СА) быка и человека с наночастицами углерода шунгита (ШУ) в водной дисперсии в диапазоне температур 17–72 °С. Получены температурные и кинетические зависимости параметров спектра ЭПР для растворов и дисперсий СА и ШУ, а также их смесей. Показано, что взаимодействие молекул СА с наночастицами ШУ оказывает существенное влияние на термоиндуцированные конформационные изменения белка, которые определяют способность SH группы Цис-34 СА переводить в диамагнитное состояние NO-группу доксилстеариновой жирной кислоты (ЖК), использованной в качестве СЗ. В присутствии ШУ температурные переходы, отражающие конформационные изменения СА в области локализации СЗ, становятся менее выраженными и сдвигаются в сторону более высоких температур. Это может быть связано с изменением окислительно-восстановительного баланса совокупности молекул СА в растворе или дисперсии, поскольку ШУ выступает как окислитель по отношению к СА. Поэтому ШУ также может рассматриваться как агент, способный влиять на степень окисления Цис-34 СА такими свободными радикалами, как СЗ. Наночастицы ШУ и СЗ конкурируют между собой в процессе окисления Цис-34. Кроме того, при рассматриваемых конформационных переходах облегчается перенос СЗ с СА на наночастицы, что препятствует восстановлению NO-группы СЗ SH-группами белка. Это дает основание рассматривать наночастицы ШУ как фактор регуляции окислительно-восстановительного баланса в системах с участием СА, включая физиологические среды.

Ключевые слова: водная нанодисперсия углерода; глобулярный белок; спин-меченая жирная кислота; предденатурационный диапазон температур.

**S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. CONFORMATIONAL EFFECTS OF
SERUM ALBUMINE INTERACTION WITH NANOPARTICLES OF CARBON
SHUNGITE: EPR SPIN PROBING DATA**

Conformational effects of interaction between bovine and human serum albumin (SA) molecules and nanoparticles of shungite carbon (ShC) in aqueous dispersion were stud-

ied in the temperature range 17–72 °C K using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin probes (SP). The temperature and kinetic dependences of EPR spectrum parameters for SA and ShC solutions and dispersions, as well as for their mixtures were obtained. The interaction of SA molecules with ShC nanoparticles has been shown to significantly affect the thermally induced protein conformational changes, which determine the ability of the Cys-34 SH group in SA to convert the NO group of the doxyl stearic fatty acid (FA) used as the probe to diamagnetic state. The temperature transitions reflecting the SA conformational changes in the region of SP localization become less pronounced and shift toward higher temperatures in the presence of ShC. This may be due to a change in the redox balance of the SA molecules pool in the solution or dispersion, since ShC acts as an oxidant to SA. Therefore, ShC can also be considered an agent capable of affecting the degree of oxidation of Cys-34 of SA by free radicals, such as SP. ShC nanoparticles and SP compete with each other during the oxidation of Cys-34. Furthermore, the transfer of SP from SA to nanoparticles is facilitated due to the conformational transitions, whereby the reduction of the probe NO group by the protein SH groups is impeded. ShC nanoparticles can therefore be regarded as a factor regulating the redox balance in systems involving SA, including physiological media.

Key words: aqueous carbon nanodispersion; globular protein; spin-labeled fatty acid; pre-denaturation temperature range.

Введение

Исследование эффектов и механизмов взаимодействия наночастиц с биомолекулами необходимо для разрешения как экологических вопросов, связанных с токсическим влиянием на живые организмы, так и биомедицинских задач регуляции связывания и транспорта лигандов белками, а также окислительно-восстановительного баланса в системах с участием белков. В последнее время все большее внимание уделяется графенам и оксидам графена как наиболее перспективным наноматериалам для биомедицинских целей благодаря их уникальным свойствам – двумерной структуре, большой поверхности, химической и механической стабильности, специфическим электронным свойствам и биосовместимости [Liu et al., 2013]. Это обеспечивает им потенциальную возможность осуществлять транспортную функцию по доставке белков, лекарственных препаратов, а также выступать в качестве биосенсоров, искусственных ферментов-пероксидаз [Ni et al., 2013; Sun et al., 2015]. Наряду с тем интересом, который графеновые структуры вызывают с точки зрения их физической, химической, кристаллической и фазовой природы, большое внимание в настоящее время сосредоточено на изучении биологических взаимодействий этих двумерных наноматериалов для новых разработок в области биомедицины и обеспечения охраны здоровья и безопасности человека в разных областях их применения [Wang et al., 2016].

Сывороточный альбумин (СА) является одним из наиболее распространенных модельных объектов при изучении молекулярных биологи-

ческих взаимодействий углеродных наночастиц, что определяется его доступностью и важнейшей физиологической ролью в функционировании различных тканей и сред организма животных и человека [Peters, 1996]. Наряду с поддержанием коллоидно-осмотического гомеостаза тканей, связыванием и транспортом физиологически значимых молекул и ионов СА имеет важную антиоксидантную функцию, обусловленную способностью тиоловой группы аминокислоты цистеина (Цис) взаимодействовать со свободными радикалами и активными формами кислорода [Turell, 2013]. Сывороточные альбумины человека (САЧ) и быка (САБ) содержат по 35 цистеинов, которые формируют 17 дисульфидных мостиков, оставляя свободным Цис-34. Он локализован в гидрофобной полости глубиной около 1 нм домена I [Stewart et al., 2005]. Связывание одной и двух жирных кислот (ЖК) существенно сказывается как на раскрытии полости Цис-34, так и на глобальном разворачивании структуры альбумина, что повышает подвижность атомных групп, формирующих полость Цис-34.

Структурно-динамическое состояние молекул альбумина характеризуется рядом обратимых конформационных переходов в области нефизиологических значений pH. Повышение температуры до 55 °C также вызывает постепенное и обратимое изменение конформации белка на уровне вторичной структуры. Наиболее значимые изменения, обусловленные плавлением одного из доменов белка, проявляются около 42–43 °C [Rezaei-Tavirani et al., 2006; Iosin et al., 2011]. Для области 58–65 °C характерно резкое начало денатурационных процессов [Borzova et al., 2016]. Связывание ЖК в физио-

логических условиях также вызывает локальные и глобальные изменения, проявляющиеся как на уровне относительного взаимного смещения трех доменов структуры СА, так и в изменениях меньшего масштаба в области SH-группы аминокислотного остатка Цис-34 [Turell et al., 2013]. Считается, что тиоловая группа Цис-34 способна находиться в двух микросостояниях: восстановленная форма – преимущественно в закрытой полости и окисленная – при раскрытии полости. Близлежащие аминокислотные остатки Гис-39 и Тир-84 также влияют на реактивность тиоловой группы [Turell et al., 2013]. Взаимодействие с ЖК, не находящимися в непосредственном контакте с Цис-34, также индуцирует конформационные изменения в его окружении, способствующие образованию дисульфида [Gryzunov et al., 2003]. Окисление альбумина и по другим аминокислотным остаткам влияет в некоторой степени на термостабильность белка, устойчивость к агрегации и морфологию агрегатов [Sancataldo et al., 2014].

По данным последних лет, различные наночастицы также оказывают заметное влияние как на окислительные свойства альбумина, так и на его конформацию. Показано, что альбумин адсорбируется на наночастицах практически любой природы, часто формируя белковую корону [Tsai et al., 2011; Chen, Wu, 2012; Roy, Das, 2014; Rajeshvari et al., 2014; Esfandfar et al., 2016]. При этом конформация белка может изменяться, что определяется свойствами поверхности наночастиц и окружающего растворителя [Chakraborty et al., 2011; Huang et al., 2014]. Наночастицы могут как провоцировать, так и ингибировать агрегацию белка [Zaman et al., 2014]. Конформационные переходы могут значительно смещаться по температурной шкале [Iosin et al., 2011]. Подобные эффекты могут способствовать патологическим процессам, связанным с конформационными заболеваниями [Zaman et al., 2014]. Они имеют самостоятельное значение для решения задач биомедицины и протеомики [Couto et al., 2017] либо используются для регуляции образования агрегатов при тепловой обработке белка в клинических целях или для создания биосовместимых покрытий. При этом потенциал применения наночастиц особенно возрастает, если целенаправленно модифицировать их поверхность биополимерами [Liu et al., 2010; Kavitha et al., 2014; Treuel et al., 2014].

В наших работах недавно было показано [Горюнов и др., 2016; Рожков, Горюнов, 2017], что наночастицы углерода, получаемые из природного сырья – шунгитов с использованием

методов зеленой химии [Rozhkova et al., 2016], также адсорбируют молекулы альбумина с образованием белковой короны и конкурируют с молекулами белка в их способности связывать и транспортировать жирные кислоты. Основным структурным элементом шунгитового углерода (ШУ) являются непланарные молекулы, которые, как показывают данные целого ряда экспериментальных методов [Шека, Рожкова, 2016], близки по свойствам к восстановленному оксиду графена (ВОГ) [Stankovich et al., 2007; Kim et al., 2011]. Наночастицы ШУ также образуют устойчивые водные дисперсии с концентрацией углерода до 0,1 мг/мл без дополнительной стабилизации ПАВ даже в физиологических средах и в условиях кипения воды [Rozhkova et al., 2016].

Гидрофобный спиновый зонд на основе стеариновой ЖК, образующий устойчивый конъюгат с сывороточным альбумином, успешно используется для регистрации локальных и глобальных конформационных изменений белка в различных условиях [Pavićević et al., 2014, 2017]. Так, при использовании спин-зонда в молярном отношении 1:1 были зафиксированы локальные термоиндуцированные конформационные изменения в диапазонах 15–23 и 38–45 °С в зависимости от деривата ЖК [Morrisett et al., 1974]. Также было обнаружено, что глобальное разворачивание структуры альбумина, вызванное связыванием ЖК, увеличивает гибкость микроокружения Цис-34 [Pavićević et al., 2017], что сопряжено с его способностью к окислению [Wetzel et al., 1980]. Связанные ЖК осуществляют перманентную миграцию между центрами связывания и доменами белка [Gurachevsky et al., 2007; Muravsky et al., 2009; Junk et al., 2011].

Таким образом, исследование структурно-динамического состояния СА методом спин-зонда на основе ЖК призвано ответить на вопрос о наличии конформационных эффектов взаимодействия СА с углеродными наночастицами из природного шунгитового горнорудного сырья, а также о возможных механизмах такого взаимодействия, значимых с биомедицинской и природоохранной точек зрения. С термоиндуцируемыми конформационными изменениями в СА, затрагивающими микроокружение свободной SH-группы цистеина, непосредственным образом связаны окислительно-восстановительные свойства альбумина. При этом связывание с ЖК оказывает существенное влияние как на конформацию белка, так и на окисление сульфгидрильных групп [Takabayashi et al., 1983], при котором нитроксильный радикал спин-зонда восста-

навливается (с потерей парамагнетизма) под влиянием взаимодействия с SH-группой белка [Wetzel et al., 1980], зависящим от конформационного состояния микроокружения SH-группы, ее доступности зонду и растворителю. Поэтому изучение термоиндуцированных конформационных изменений в системе «жирнокислотный спин-зонд – СА – наночастицы ШУ» позволяет ответить на поставленный вопрос.

Материалы и методы

Изучение конформационных переходов в молекуле СА и влияния на них взаимодействия СА с наночастицами углерода шунгита в водной дисперсии проводилось с применением гидрофобного спинового зонда на основе доксил-стеариновой ЖК (ДСК), который сорбировался молекулами СА. Использовались зонд 5-DOXIL-stearic acid (5DSA) (Sigma) и сывороточные альбумины быка (САБ, PAA Laboratories GmbH) и человека (САЧ, 5-я фракция, Sigma), а также дисперсии ШУ с концентрацией углерода 0,1 мг/мл, приготовленные согласно разработанной методике [Рожкова, 2011]. Радиус наночастиц ШУ в водной дисперсии, определенный по максимуму кривой распределения интенсивности динамического рассеяния света по размерам, составлял 51 нм, дзета-потенциал наночастиц – около –30 мВ. Измерения проводились с помощью анализатора Nanosizer NanoZS, Malvern.

Спектры ЭПР спин-зонда регистрировались на радиоспектрометре ЭПР Bruker EMX 6/1 с термостатируемой ячейкой резонатора ($\pm 0,2$ °C) при амплитуде модуляции 1Гс и СВЧ мощности 12,6 мВт, при которых не наблюдалось насыщения сигнала. Изменение температуры осуществлялось со скоростью 0,2 градуса в минуту.

Спин-зонд, изначально растворенный в хлороформе, осаждался, образуя в ходе испарения растворителя пленку, на которую затем наносились растворы альбумина и дисперсии наночастиц ШУ. При этом часть зонда из пленки связывалась с молекулами белка или наночастицами. Различные молярные соотношения зонд/белок были получены путем варьирования времени инкубации. При молярном отношении зонд/белок 1 : 1, pH водного раствора 7,4 и концентрации белка 33 мг/мл альбумин претерпевает конформационные изменения в диапазонах температур 15–23 и 38–45 °C [Morrisett et al., 1974].

Относительная интегральная интенсивность, полученная двойным интегрированием

спектров, составляла $0,4 \cdot 10^9$ отн. ед. при соотношении зонд/белок 1 : 1. Спектр ЭПР спин-зонда, связанного молекулами САБ, характеризовался наличием сильно уширенных А-компонент, которые обусловлены иммобилизацией зонда, находящегося в гидрофобных полостях белка. На фоне А-компонент наблюдались узкие В-компоненты от спин-зондов, осуществляющих диффузию в поверхностных областях белка на границе с водным растворителем (рис. 1). Доля таких зондов обычно не превышает 3 % для белка, не подвергавшегося денатурации. При необратимой денатурации и агрегации белка в результате отжига при 72 °C и охлаждения до 18 °C вклад В-компонент спектра ЭПР зонда 5DSA заметно увеличивается. Зонды на основе ДСК достаточно жестко связаны с белком за счет адсорбции в неполярной полости белка, в связи с чем такой параметр спектра, как величина тензора сверхтонкой структуры (СТС) $2A_{zz}$, может быть

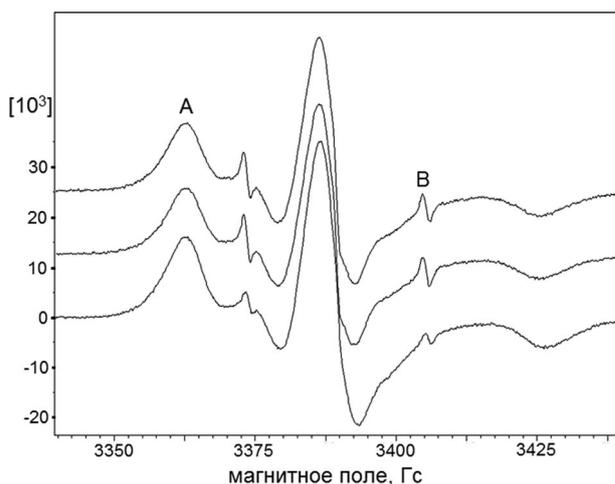


Рис. 1. Спектры ЭПР спин-зонда на основе доксил-стеариновой кислоты, связанной с молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА). Нижний спектр – БСА (17 мг/мл) при 17 °C. Этот спектр аналогичен спектру в присутствии 0,01 мг/мл наночастиц наноглерода шунгита (ШУ) в дисперсии. Средний спектр – БСА после прогрева при 72 °C в течение 3 мин и охлажденный до 18 °C. Верхний спектр – БСА после прогрева при 72 °C в течение 3 мин в присутствии наночастиц ШУ и охлажденный до 18 °C. Отношение зонд/белок равно 2

Fig. 1. EPR spectra of doxylstearic acid spin-probe associated with bovine serum albumin (BSA) molecules. Lower spectrum is for BSA, 17 mg/ml at 17 °C. The spectrum is analogous to the spectrum in presence of 0.01 mg/ml shungite nanocarbon (ShC) in the dispersion. Middle spectrum is for BSA after heating to 72 °C for 3 minutes and cooling to 18 °C. Upper spectrum is for BSA after heating to 72 °C for 3 minutes in presence of ShC nanoparticles and cooling to 18 °C. Ratio spin-probe/protein equals 2

даже использован для оценки времени корреляции вращательной диффузии молекулы белка и оценки индекса гидрофобности окружения нитроксильной группы зонда [Кузнецов, 1976]. При этом ЖК способны обмениваться центрами сорбции на белке [Gurachevsky et al., 2007], что также может вносить вклад в возникновение В-компоненты спектра.

При соотношении зонд/белок более 2 : 1 (интегральная интенсивность $> 0,9 \cdot 10^9$ отн. ед.) и концентрации белка более 50 мг/мл узких компонент в спектре не наблюдалось. Это обусловлено уширением, связанным с вкладом обменных взаимодействий зондов [Gurachevsky et al., 2007; Junk et al., 2011]. При этом основные параметры спектра ЭПР (величина $2A_{zz}$, определяемая как расстояние между крайними компонентами спектра в единицах напряженности поля, а также амплитуда и ширина центральной компоненты) монотонно изменялись с температурой и практически не зависели от присутствия или отсутствия ШУ. Поэтому для регистрации эффектов взаимодействия белка с наночастицами и сопряженных конформационных изменений белка подбирали наименьшую величину отношения зонд/белок/наночастица, обеспечивающую, с одной стороны, приемлемое отношение сигнал/шум в спектрах ЭПР, а с другой – минимальное влияние на конформационное состояние молекул альбумина [Pavićević et al., 2017].

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлена температурная зависимость изменения нормированных амплитуд А и В компонент спектра ЭПР спин-зонда, связанного с молекулами БСА, а также интегральной интенсивности этого спектра. Температурное поведение амплитуд А и В компонент отражает в первую очередь обычный термоактивационный процесс увеличения подвижности зонда. Вместе с тем поведение интенсивности А и В компонент не описывается законом Аррениуса (экспонентой). Кроме того, при температурах выше 320 К (47 °С) зависимость амплитуды А-компоненты вместе с интегральной интенсивностью спектра заметно отклоняется от линейности в сторону уменьшения, тогда как зависимость В-компоненты – в сторону увеличения. Это обусловлено тем, что В-компонента вносит незначительный вклад в интегральную

интенсивность и указывает на перераспределение А и В состояний в области 320 К (47 °С). Такое перераспределение вероятно связано с конформационным переходом в молекуле альбумина в данном температурном интервале, обычно наблюдаемом после 42 °С [Josin et al., 2011].

На рис. 3 показана температурная зависимость изменения нормированных интегральных интенсивностей спектров ЭПР спин-зонда 5DSA для трех разных систем: зонд на альбумине в водном растворе, зонд на альбумине в присутствии наночастиц ШУ и зонд на наночастицах ШУ. Обычно интенсивность центральной линии спектров ЭПР зондов (или меток)

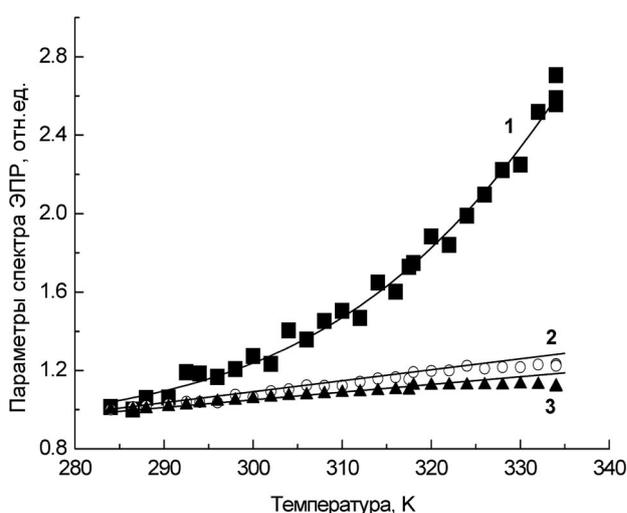


Рис. 2. Температурные зависимости параметров ЭПР спектра спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты, связанной с молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА): амплитуда В-компоненты спектра (1); амплитуда А-компоненты (2); интегральная интенсивность спектра (3). Концентрация белка – 20 мг/мл в дистиллированной воде. Кривая (1) аппроксимирована сигмоидой, начальные участки кривых (2) и (3) аппроксимированы прямыми, чтобы показать отклонение зависимостей от линейности при температурах выше 320 К (47 °С). На этом и последующих рисунках представлены значения спектральных характеристик, нормированные на исходные значения при минимальной температуре

Fig. 2. Temperature dependences of the EPR spectrum parameters of the doxylstearic acid spin probe associated with bovine serum albumin (BSA) molecules: amplitude of spectrum В-component (1); amplitude of spectrum А-component (2); integral intensity of the spectrum (3). Protein concentration is 20 mg/ml in distilled water. Curve (1) is approximated by sigmoid line; the initial parts of curves (2) and (3) are approximated by straight lines to show the deviation of the dependences from linearity at temperatures above 320 K (47 °C). This figure and the following ones show the values of the spectral characteristics normalized to the initial values at minimum temperatures

в водных растворах растет практически линейно с температурой вследствие уменьшения концентрации кислорода в растворе, который уширяет спектр ЭПР при пониженных температурах (до температур замерзания воды) и снижает его интенсивность. При этом ширина линии с уменьшением температуры растет. Однако интегральная интенсивность спектра, получаемая в результате двойного интегрирования, как и интенсивность центральной линии, растет линейно с повышением температуры. Так, кривая 3 на рис. 3 характеризует линейное увеличение интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда 5DSA, связанного с наночастицами ШУ, во всем исследованном температурном диапазоне. Значительный разброс данных при температурах 295–310 К обусловлен высоким отношением сигнал/шум для дисперсии ШУ, сорбционная емкость которой

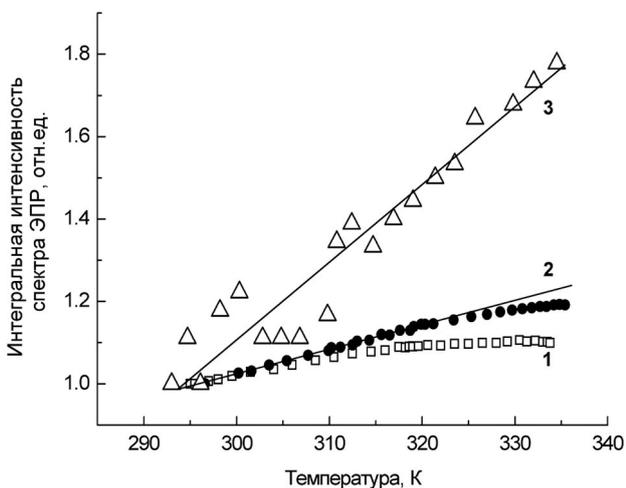


Рис. 3. Температурные зависимости интегральной интенсивности спектров ЭПР спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты (5DSA): (1) спин-зонд, связанный с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ); (2) то же в присутствии наночастиц углерода шунгита (ШУ); (3) спин-зонд, связанный с наночастицами ШУ. Концентрация наночастиц ШУ в дисперсии – 0,01 мг/мл; концентрация белка в водном растворе 25 мг/мл. Кривая 3 и начальные участки кривых 1 и 2 аппроксимированы прямыми, чтобы показать отклонение зависимостей от линейности при температурах выше 315 К (42 °С)

Fig. 3. Temperature dependences of the integral intensity of the EPR spectrum of doxylstearic acid spin probe (5DSA): (1) spin probe associated with human serum albumin (HSA) molecules; (2) the same in presence of shungite carbon (ShC) nanoparticles; (3) spin probe associated with ShC nanoparticles. Concentration of ShC nanoparticles in dispersion is 0.01 mg/ml; protein concentration in dispersion 25 mg/ml. Curve 3 and the initial parts of curves 1 and 2 are approximated by straight lines to show the deviation of the dependences from linearity at temperatures above 315 K (42 °C)

при концентрации ШУ 0,1 мг/мл значительно ниже, чем дисперсии альбумина при концентрации 25 мг/мл. Кривые 1 и 2 на рис. 3, отражающие поведение интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда, связанного с белком, отклоняются от линейности в сторону уменьшения при температурах выше 315 К (42 °С) как при отсутствии, так и в присутствии ШУ. Отклонения обусловлены уменьшением числа спин-зондов в парамагнитном состоянии вследствие восстановления доксильной NO-группы зонда и превращения в диамагнитный гидроксилламин. Это происходит в результате взаимодействия NO-группы зонда с SH-группой Цис-34 альбумина [Wetzel et al., 1980]. Однако в присутствии ШУ отклонение выражено в значительно меньшей степени, чем при его отсутствии.

На рис. 4 представлены данные о влиянии наночастиц ШУ на температурные зависимости интегральной интенсивности спектров ЭПР 5DSA, связанных с альбумином человека в солевом растворе при концентрациях белка, отличающихся в два раза, и различных pH. Здесь вновь имеет место отклонение зависимостей от линейного термоактивационного роста интегральной интенсивности, связанного с повышением подвижности зонда, в сторону меньших значений. Оно начинается для концентрации СА 25 мг/мл (рис. 4, а) от температур 313–315 К (40–42 °С) и особенно заметно при температурах выше 325 К (52 °С). При температуре около 42 °С и физиологическом pH в СА имеет место конформационный переход, сопряженный с частичным раскрытием полости, где находится Цис-34 [Rezaei-Tavirani et al., 2006; Iosin et al., 2011]. Для концентрации 50 мг/мл (рис. 4, б), более близкой к физиологическим значениям, характерным для сыворотки крови, отклонение происходит на 7–10 градусов ниже – в диапазоне 308–320 К (35–47 °С), куда входят и физиологические температуры. Изломы на зависимостях для 50 мг/мл, определяемые путем линейной аппроксимации отдельных участков кривых, соответствуют термоиндуцированным конформационным переходам СА. И в этом случае отклонение, вероятно, связано со снижением числа спин-зондов в парамагнитном состоянии вследствие восстановления доксильной NO-группы зонда до диамагнитного гидроксилламина при взаимодействии с SH-группой Цис-34 альбумина. Так может проявляться повышение доступности Цис-34 для нитроксильной группы 5DSA при раскрытии полости Цис-34 в ходе конформационного перехода. При этом NO-группа зонда начинает восстанавливаться до

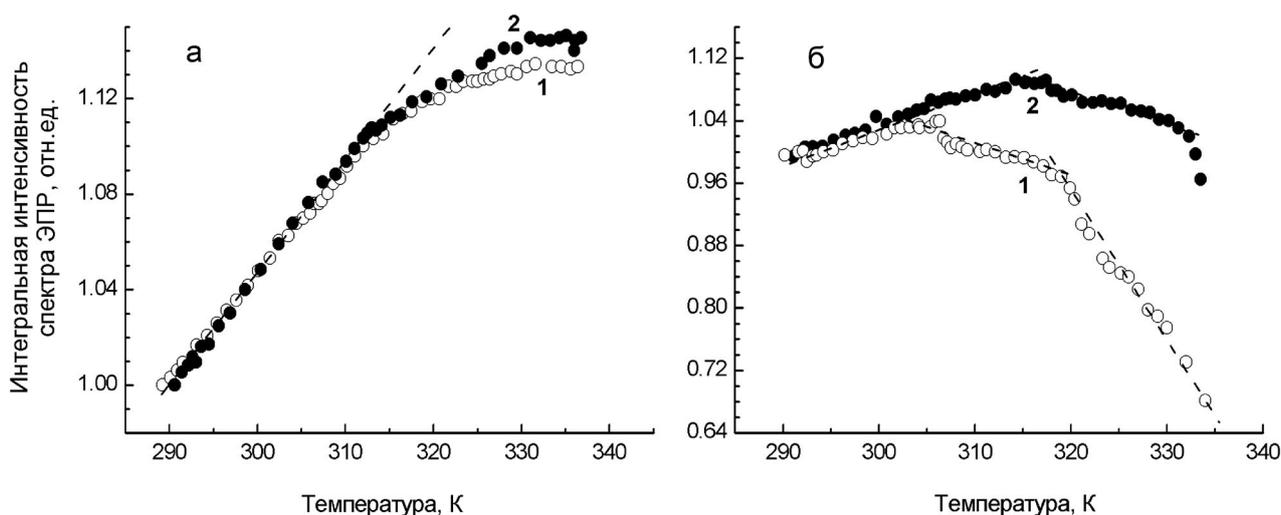


Рис. 4. Температурные зависимости интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты (5DSA), связанной с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ), при отсутствии (1) и в присутствии наночастиц углерода шунгита (ШУ) в растворе белка: а) концентрация белка в водном растворе 25 мг/мл, 0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,4, отношение зонд/белок 2,5; б) концентрация белка 50 мг/мл, 0,1 М NaCl, pH 6, отношение зонд/белок 1. Концентрация наночастиц ШУ в водной дисперсии – 0,01 мг/мл. Участки кривых аппроксимированы прямыми, чтобы показать отклонение зависимостей от линейности и термоиндуцированные переходы

Fig. 4. Temperature dependences of the integral intensity of the EPR spectrum of doxylstearic acid spin probe (5DSA) associated with human serum albumin (HSA) molecules in absence (1) and in presence (2) of shungite carbon (ShC) nanoparticles in protein solution: a) protein concentration in water solution 25 mg/ml, 0.01 M PBS, 0.15 M NaCl, pH 7.4, ratio spin-probe/protein equals 2.5; b) protein concentration 50 mg/ml, 0.1 M NaCl, pH 6; ratio spin-probe/protein equals 1. Concentration of ShC nanoparticles in dispersion is 0.01 mg/ml. The segments of curves are approximated by straight lines to show the deviation of the dependences from linearity and thermoinduced transitions

гидроксиламина либо при ее диффузии между центрами посадки [Muravsky et al., 2009], либо, что более вероятно, при взаимодействии 5DSA и Цис-34, находящихся на разных молекулах белка. Образование белковой короны вокруг наночастиц ШУ может приводить к тому, что конформационный переход происходит в диапазоне 5–7 градусов [Tsai et al., 2011].

Данные также свидетельствуют о выраженной зависимости термоиндуцированных конформационных переходов, сопряженных с окислением Цис-34, от условий эксперимента (концентрация белка, зонда, состава растворителя). Так, степень снижения интегральной интенсивности, отражающей степень восстановления зонда с ростом температуры, значительно увеличивается при повышении концентрации белка в два раза (рис. 4, б). Это согласуется с предложенным объяснением эффекта окислением Цис-34: больше белка – значит, больше Цис-34, значит, больше восстановленного спин-зонда.

Так же, как и по данным рис. 3, отклонение от линейности на рис. 4 выражено в меньшей степени в присутствии наночастиц ШУ в белковом растворе. Этот эффект также существенно более выражен при большей концентрации

белка (рис. 4, б). Под влиянием взаимодействия с наночастицами ШУ переходы СА сдвигаются при концентрации СА 50 мг/мл вверх по шкале температур на 7–10 градусов. Предотвращение сопряженных с ними процессов потери парамагнетизма спин-зондов в присутствии наночастиц ШУ проявляется в этих условиях особенно ярко.

На рис. 5 показано изменение со временем в течение 60 минут числа парамагнитных центров в растворе САЧ при отсутствии и в присутствии наночастиц ШУ при температуре 62 °С. Данные указывают, что в присутствии ШУ скорость уменьшения числа парамагнитных центров значительно ниже, чем в растворе белка без ШУ. Это согласуется с данными рис. 3 и 4.

Ранее нами было показано, что наночастицы углерода, в том числе ШУ, способны вызывать концентрационно-зависимое окисление гемоглобина в растворе [Горюнов, Борисова, 2014]. Это позволяет считать, что и в данном случае наночастицы ШУ могут выступать по отношению к Цис-34 в качестве окислителя наряду со спин-зондом, что приводит к снижению степени восстановления спин-зонда в присутствии ШУ. Из выраженной зависимости эффектов окисления Цис-34 и восстановления зонда

Влияние наночастиц углерода шунгита (ШУ) на параметры спектра ЭПР спин-зонда (доксилстеариновой кислоты), связанного с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ), при периодическом отжиге водных дисперсий

Effect of shungite carbon (ShC) nanoparticles on the parameters of the EPR spectrum of the spin probe (doxyl stearic acid), associated with human serum albumin (HSA) molecules, during periodic annealing of aqueous dispersions

Условия отжига Annealing conditions		18 °C	72 °C (180 с) и охлаждение до 18 °C 72 °C (180 s) and cooling to 18 °C			61 °C (180 с) и 120 час по охлаждению до 18 °C 61 °C (180 s) and 120 hrs after cooling to 18 °C
			сразу immed	12 час 12 hrs	96 час 96 hrs	
I, 10 ⁹ Отн. ед. Arb. units	САЧ HSA	0,96	0,79	0,78	0,78	0,96
	САЧ+ШУ HSA+ ShC	0,96	0,83	-	0,78	0,96
A/B	САЧ HSA	7,7	2,3	2,7	6,2	1,4
	САЧ+ШУ HSA+ ShC	7,7	2,4	-	5,1	1,4

Примечание. I – относительная интегральная интенсивность спектра ЭПР (ст. погрешн. $\pm 2 \cdot 10^7$); A/B – отношение амплитуд (интенсивностей) A и B компонент спектра (ст. погрешность 0,1).

Note. I is the relative integral intensity of the EPR spectrum; A/B – ratio of the amplitudes (intensities) of A and B spectrum components.

в присутствии наночастиц ШУ от концентрации белка можно сделать еще два важных вывода. Во-первых, способность спин-зонда и наночастиц ШУ окислять Цис-34 сравнима при данном соотношении белок/спин-зонд/ШУ. Во-вторых, количество центров на наночастицах ШУ при концентрации 0,01 мг/мл, способных восстанавливаться за счет окисления Цис-34, имеет тот же порядок величины, что и концентрация спин-зонда в нашем эксперименте (примерно 0,001 М), поскольку эти центры реагируют своим восстановлением на повышение концентрации белка в два раза в той же степени, что и спин-зонды (рис. 4). Кроме того, эти результаты дают основания считать, что именно изменение окислительно-восстановительного баланса совокупности молекул СА в растворе или дисперсии приводит к смещению конформационных переходов в СА по температурной шкале, как об этом упоминалось выше.

Поскольку наблюдаемые эффекты связаны с предденатурационными конформационными изменениями СА, необходимо рассмотреть, как сказывается на восстановлении спин-зонда 5DSA более глубокая денатурация белка. В таблице приведены данные по изменению числа парамагнитных центров и отношения интенсивностей A и B компонент спектра ЭПР спин-зонда 5DSA, связанного с молекулами СА, полученные в процессах периодического отжига растворов альбумина путем нагрева и последующего охлаждения при отношении зонд/белок более 2:1.

Из данных таблицы и рис. 5 следует, что после первого отжига число спин-зондов в парамагнитном состоянии уменьшается; в присут-

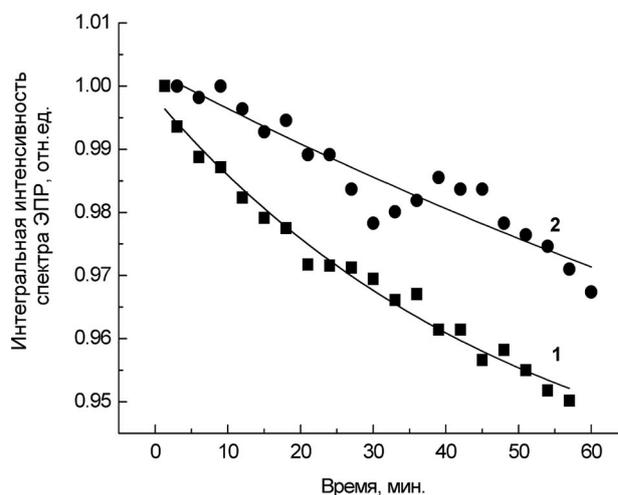


Рис. 5. Кинетика интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты (5DSA), связанной с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ), для (1) раствора САЧ, (2) раствора САЧ с наночастицами углерода шунгита (ШУ). Концентрация наночастиц ШУ в дисперсии – 0,01 мг/мл; концентрация белка 25 мг/мл. 0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,4. Температура 335 К (62 °C). Отношение зонд/белок 2

Fig. 5. Kinetics of the integral intensity of the EPR spectrum of doxylstearic acid spin probe (5DSA) associated with human serum albumin (HSA) molecules for (1) HSA solution, (2) HSA solution with nanoparticles of shungite carbon (ShC). Concentration of ShC in dispersion is 0.01 mg/ml, protein concentration 25 mg/ml. 0.01 M PBS, pH 7.4. Temperature is 335 K (62 °C). Ratio spin-probe/protein equals 2

ствии же ШУ это снижение заметно меньше (0,79 и 0,83 соответственно). Возможно, это связано с ограничением подвижности 5DSA

при образовании белковой короны и, соответственно, взаимодействия NO-группы зонда с SH-группами белка. При последующем варьировании температуры заметных изменений числа парамагнитных зондов не происходит, в том числе и в присутствии ШУ. Очевидно, доминирующим явлением в этом случае становится агрегация белка. При этом растет вклад В-компоненты в присутствии ШУ после 4-дневной экспозиции при 18 °С (А/В = 6,2 против А/В = 5,1). Это может быть связано с переходом части молекул 5DSA с белка на наночастицы углерода, поскольку влияние наночастиц ШУ на температуру конформационных переходов может отражаться и на степени сродства 5DSA к белку. Такой переход способен предотвращать восстановление NO-групп зонда до гидросиламина SH-группами Цис-34.

Часто температурные зависимости параметров спектров ЭПР зондов, связанных с белком, имеют отклонения от линейности [Morissett et al., 1974] либо аномалии [Кузнецов, 1976; Рожков, Кяйвяряйнен, 1985]. Они могут быть обусловлены влиянием по крайней мере трех основных обстоятельств: 1) конформационными изменениями в области локализации зонда; 2) образованием олигомеров в результате поперечных сшивок молекул белка в процессе окисления SH-групп, 3) фазовым переходом типа жидкость-жидкость, сопряженным с развитием флуктуаций концентрации и образованием белковых кластеров [Рожков, 1988; San Biagio et al., 1999]. Относительные вклады этих процессов зачастую тесно взаимосвязаны и сопряжены как с изменением белок-белкового взаимодействия, так и с образованием агрегатов. Мы ограничили задачу данной работы рассмотрением тех аспектов эксперимента, которые имеют непосредственное отношение к термоиндуцированным конформационным переходам белка и влиянию на них наночастиц ШУ. Также сделан акцент на том, какое проявление конформационные переходы СА могут получить в условиях взаимодействия с наночастицами ШУ, как они могут дополнительно высветить воздействие НЧ ШУ на СА.

Заключение

Представленные результаты показывают, что ШУ способен оказывать заметное влияние на конформационные переходы СА, связанные с частичным разворачиванием структуры белка и изменением экспонированности аминокислотного остатка Цис-34 домена I, что продемонстрировано для двух типов СА – человека и быка. Это проявляется, с одной стороны,

в снижении выраженности соответствующих температурных переходов на зависимостях параметров спектра ЭПР, а с другой, в повышении температуры переходов на 5–10 °С. При этом ШУ выступает как окислитель по отношению к СА и может рассматриваться как агент, способный влиять на степень окисления Цис-34 СА свободными радикалами, как показано в настоящей работе для радикала 5DSA. Наночастицы ШУ и спин-зонды ДСК конкурируют между собой в процессе окисления Цис-34. Это дает основания для использования ШУ для регуляции окислительно-восстановительного баланса совокупности молекул СА в той или иной системе, включая физиологические среды, и требует дополнительных исследований. Обмен белком между короной ШУ и раствором обуславливает обратимый перенос ЖК между альбуминами и ШУ, чему также способствует частичное разворачивание конформации СА с ростом температуры. Сорбция молекул белка наночастицами ШУ может быть фактором окисления СА и влиять на температуру его конформационных изменений, в свою очередь сказывающихся на окислении.

Таким образом, данные по взаимодействию наночастиц ШУ с сывороточными альбуминами подтверждают, что при взаимодействии растворимого белка с наноструктурами углерода возникает целый ряд физиологически потенциально значимых эффектов: от окислительно-восстановительных до конформационных. Среди них – влияние на связывание и обмен лигандов, что представляет интерес как с биомедицинской, так и с природоохранной точки зрения. Сывороточный альбумин, участвуя в транспорте жирных кислот в плазме крови, отличается неполным и переменным насыщением центров их связывания на белке. Изучение взаимодействия СА с таким малоизученным с точки зрения биологических взаимодействий, но все более широко применяемым в различных технологиях наноматериалом, как водная нанодисперсия углерода шунгита, необходимо для выяснения возможностей его использования в целях воздействия на перенос ЖК и окислительно-восстановительные свойства. Одной из наиболее информативных и непосредственных возможностей такого исследования является применение метода ЭПР гидрофобного спин-зонда.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0044).

Литература

- Горюнов А. С., Борисова А. Г. Возможный механизм автоокисления гемоглобина в водных дисперсиях углеродных наноматериалов // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 71–77.
- Горюнов А. С., Рожков С. П., Суханова Г. А., Борисова А. Г. Термодинамические эффекты взаимодействия сывороточного альбумина с шунгитовым наноглеродом // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 11. С. 33–38. doi: 10.17076/eb428
- Кузнецов А. Н. Метод спинового зонда (основы и применение). М.: Наука, 1976. 209 с.
- Рожкова Н. Н. Наноглерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Структурно-динамические эффекты взаимодействия белка и других биологически значимых молекул с шунгитовым наноглеродом // Труды КарНЦ РАН. 2017. № 5. С. 33–44. doi: 10.17076/eb450
- Рожков С. П., Кяйвярайнен А. И. Изучение гибкости молекул сывороточного альбумина методом спиновой метки // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 772–776.
- Рожков С. П. Спинодаль в концентрированных водно-солевых растворах молекул сывороточного альбумина // Журн. физ. химии. 1988. Т. 62, № 7. С. 1925–1928.
- Шека Е. Ф., Рожкова Н. Н. Шунгит – природный источник наноразмерного восстановленного оксида графена // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 2. С. 89–104. doi: 10.17076/geo264
- Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Kleymenov S. Yu., Poliansky N. B., Muranov K. O., Stein-Margolina V. A., Shubin V. V., Markov D. I., Kurganov B. I. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, iss. 4. P. e0153495. doi: 10.1371/journal.pone.0153495
- Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., Ansari Z. A., Singh S. P., Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin // Langmuir. 2011. Vol. 27, no. 12. P. 7722–7731. doi: 10.1021/la200787t
- Chen Z., Wu D. Spectroscopic studies on the interaction between ZnSe nanoparticles with bovine serum albumin // J. Luminescence. 2012. Vol. 132, no. 11. P. 2968–2974. doi: 10.1016/j.jlumin.2012.06.028
- Couto C., Vitorino R., Daniel-da-Silva A. L. Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications // Crit. Rev. Biotechnol. 2017. Vol. 37, no. 2. P. 238–250. doi: 10.3109/07388551.2016.1141392
- Esfandfar P., Falahati M., Saboury A. Spectroscopic studies of interaction between CuO nanoparticles and bovine serum albumin // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. Vol. 34, no. 9. P. 1962–1968. doi: 10.1080/07391102.2015.1096213
- Gryzunov Y. A., Arroyo A., Vigne J. L., Zhao Q., Tyurin V. A., Hubel C. A., Gandley R. E., Vladimirov Yu A., Taylor R. N., Kagan V. E. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants // Arch. Biochem. Biophys. 2003. Vol. 413, no. 1. P. 53–66. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00091-2
- Gurachevsky A., Shimanovitch E., Gurachevskaya T., Muravsky V. Intra-albumin migration of bound fatty acid probed by spin label ESR // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Vol. 360, no. 4. P. 852–856. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.140
- Huang R., Carney R. P., Ikuma K., Stellacci F., Lau B. L. T. Effects of surface compositional and structural heterogeneity on nanoparticle-protein interactions: different protein configurations // ACS Nano. 2014. Vol. 8, no. 6. P. 5402–5412. doi: 10.1021/nn501203k
- Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2011. Vol. 217. P. 395–401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012
- Junk M. J. N., Spiess H. W., Hinderberger D. DEER in biological multispin-systems: A case study on the fatty acid binding to human serum albumin // J. Magn. Reson. 2011. Vol. 210, no. 2. P. 210–217. doi: 10.1016/j.jmr.2011.03.003
- Kavitha T., Kang I. -K., Park S. -Y. Poly (acrylic acid) – Grafted Graphene Oxide as an Intracellular Protein Carrier // Langmuir. 2014. Vol. 30, no. 1. P. 402–409. doi: 10.1021/la404337d
- Kim J. E., Han T. H., Lee S. H., Kim J. Y., Ahn C. W., Yun J. E., Kim S. O. Graphene Oxide Liquid crystals // Angew. Chem. Int. Ed. 2011. Vol. 50, no. 13. P. 3043–3047. doi: 10.1002/anie.201004692
- Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications // Acta Biomater. 2013. Vol. 9. P. 9243–9257. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.016
- Liu J., Fu S., Yuan B., Li Y., Deng Z. Toward a Universal “Adhesive nanosheet” for the assembly of multiple nanoparticles based on a protein-induced reduction/decoration of graphene oxide // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, no. 21. P. 7279–7281. doi: 10.1021/ja100938r
- Morrisett J. D., Pownall H. J., Gotto A. M. jr. Bovine Serum Albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 260, no. 7. P. 2487–249
- Muravsky V., Gurachevskaya T., Berezenko S., Schnurr K., Gurachevsky A. Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2009. Vol. 74, no. 1. P. 42–47. doi: 10.1016/j.saa.2009.05.003
- Ni Y., Zhanga F., Kokot S. Graphene oxide as a nanocarrier for loading and delivery of medicinal drugs and as a biosensor for detection of serum albumin // Anal. Chim. Acta. 2013. Vol. 769. P. 40–48. doi: 10.1016/j.aca.2013.01.038
- Pavičević A., Luo J., Popović-Bijelić A., Mojović M. Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin // Eur. Biophys. J. 2017. Vol. 46, no. 8. P. 773–787. doi: 10.1007/s00249-017-1257-z
- Pavičević A. A., Popović-Bijelić A. D., Mojović M. D., Šušnjar S. V., Bačić G. G. Binding of Doxyl Stearic Spin Labels to Human Serum Albumin: An EPR

Study // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, no. 37. P. 10898–10905. doi: 10.1021/jp5068928

Peters T. All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 432 p. doi: 10.1002/food.19970410631

Rajeshwari A., Pakrashi S., Madhumita S. D. et al. Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with Al₂O₃ nanoparticles // *J. Luminescence*. 2014. Vol. 145. P. 859–865. doi: 10.1016/j.jlumin.2013.08.073

Rezaei-Tavirani M., Moghaddamnia S. H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Vol. 39, no. 5. P. 530–536. doi: 10.5483/BMBRep.2006.39.5.530

Roy S., Das T. K. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Vol. 14, no. 7. P. 4899–4905. doi: 10.1166/jnn.2014.9508

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

San Biagio P. L., Martorana V., Emanuele A., Vaiana S. M., Bulone D., Palma M. U. Interacting processes in protein coagulation // *Proteins*. 1999. Vol. 37, no. 1. P. 116–120. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991001)37:1<116::AIDPROT11

Sancataldo G., Vetri V., Fodera` V., Di Cara G., Militello V., Leone M. Oxidation Enhances Human Serum Albumin Thermal Stability and Changes the Routes of Amyloid Fibril Formation // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 1. P. e84552. doi: 10.1371/journal.pone.0084552

Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D., Kohlhhaas K. A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu Y., Nguyen S. T., Ruoff R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide // *Carbon*. 2007. Vol. 45, no. 7. P. 1558–1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034

Stewart A. J., Blindauer C. A., Berezenko S., Sleep D., Tooth D., Sadler P. J. Role of Tyr84 in control-

ling the reactivity of Cys34 of human albumin // *FEBS J*. 2005. Vol. 272. P. 353–362. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x

Sun H., Zhao A., Gao N., Li K., Ren J. S., Qu X. G. Deciphering a Nanocarbon-Based Artificial Peroxidase: Chemical Identification of the Catalytically Active and Substrate-Binding Sites on Graphene Quantum Dots // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Vol. 54. P. 7176–7180. doi: 10.1002/anie.201500626

Takabayashi K., Imada T., Saito Y., Inada Y. Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin // *Eur. J. Biochem.* 1983. Vol. 136, no. 2. P. 291–295. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07740.x

Treuel L., Brandholt S., Maffre P., Wiegeler S., Shang L., Nienhaus G. U. Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle-Cell Interactions // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, no. 1. P. 503–513. doi: 10.1021/nn405019v

Tsai D. H., Del Rio F. W., Keene A. M., Tyner K. M., MacCuspie R. I., Cho T. J., Zachariah M. R., Hackley V. A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, no. 6. P. 2464–2477. doi: 10.1021/la104124d

Turell L., Radic R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 65. P. 244–253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050

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

Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Bohm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature Behaviour of Human Serum Albumin // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104, no. 2. P. 469–478. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x

Zaman M., Ahmad E., Qadeer A., Rabbani G., Khan R. H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation International // *Int. J. Nanomedicine*. 2014. Vol. 9. P. 899–912. doi: 10.2147/IJN.S54171

Поступила в редакцию 24.04.2018

References

Goryunov A. S., Borisova A. G. Vozmozhnyi mekhanizm avtookisleniya gemoglobina v vodnykh dispersiyakh uglerodnykh nanomaterialov [Probable mechanism of haemoglobin autoxidation in water dispersions of carbon based nanomaterials]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2014. No. 5. P. 71–77.

Goryunov A. S., Rozhkov S. P., Sukhanova G. A., Borisova A. G. Termodinamicheskie efekty vzaimodeistviya syvorotochnogo al'bmina s shungitovym nanouglerodom [Thermodynamic effects of serum albumin interaction with shungite nanocarbon]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 11. P. 33–38. doi: 10.17076/eb428

Kuznetsov A. N. Metod spinovogo zonda (osnovy i primeneniye) [Method of spin probe (bases and application)]. Moscow: Nauka, 1976. 209 p.

Rozhkova N. N. Nanouglerod shungitov [The nanocarbon of shungites]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2011. 100 p.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Strukturno-dinamicheskie efekty vzaimodeistviya belka i drugikh biologicheskikh znachimykh molekul s shungitovym nanouglerodom [Structural dynamic effects of protein and other biologically significant molecules' interaction with shungite nanocarbon]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2017. No. 5. P. 33–44. doi: 10.17076/eb450

- Rozhkov S. P., Kaivarainen A. Izuchenie gibkosti molekuly syvorotochnogo albumina metodom spinovoi metki [Study of the flexibility of serum albumin molecules by the spin label method]. *Biofizika* [Biophysics]. 1985. Vol. 30, no. 5. P. 772–776.
- Rozhkov S. P. Spinodal' v kontsentrirovannykh vodno-solevykh rastvorakh molekuly syvorotochnogo al'bumina [Spinodal in concentrated aqueous-salt solutions of serum albumin molecules]. *Zhurn. fiz. khimii* [J. Physical Chem.]. 1988. Vol. 62, no. 7. P. 1925–1928.
- Sheka E. F., Rozhkova N. N. Shungit – prirodnyi istochnik nanorazmernogo vosstanovlennogo oksida grafena [Shungite is the nature source of nanosize reduced graphene oxide]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 2. P. 89–104. doi: 10.17076/geo264
- Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Kleymentov S. Yu., Poliansky N. B., Muranov K. O., Stein-Margolina V. A., Shubin V. V., Markov D. I., Kurganov B. I. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, iss. 4. P. e0153495. doi:10.1371/journal.pone.0153495
- Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., Ansari Z. A., Singh S. P., Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*. 2011. Vol. 27, no. 12. P. 7722–7731. doi: 10.1021/la200787t
- Chen Z., Wu D. Spectroscopic studies on the interaction between ZnSe nanoparticles with bovine serum albumin. *J. Luminescence*. 2012. Vol. 132, no. 11. P. 2968–2974. doi: 10.1016/j.jlumin.2012.06.028
- Couto C., Vitorino R., Daniel-da-Silva A. L. Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. Vol. 37, no. 2. P. 238–250. doi: 10.3109/07388551.2016.1141392
- Esfandfar P., Falahati M., Saboury A. Spectroscopic studies of interaction between CuO nanoparticles and bovine serum albumin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016. Vol. 34, no. 9. P. 1962–1968. doi: 10.1080/07391102.2015.1096213
- Gryzunov Yu. A., Arroyo A., Vigne J. L., Zhao Q., Tyurin V. A., Hubel C. A., Gandle R. E., Vladimirov Yu. A., Taylor R. N., Kagan V. E. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. Vol. 413, no. 1. P. 53–66. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00091-2
- Gurachevsky A., Shimanovitch E., Gurachevskaya T., Muravsky V. Intra-albumin migration of bound fatty acid probed by spin label ESR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 360, no. 4. P. 852–856. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.140
- Huang R., Carney R. P., Ikuma K., Stellacci F., Lau B. L. T. Effects of surface compositional and structural heterogeneity on nanoparticle-protein interactions: different protein configurations. *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, no. 6. P. 5402–5412. doi: 10.1021/nn501203k
- Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2011. Vol. 217. P. 395–401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012
- Junk M. J. N., Spiess H. W., Hinderberger D. DEER in biological multispin-systems: A case study on the fatty acid binding to human serum albumin. *J. Magn. Reson.* 2011. Vol. 210, no. 2. P. 210–217. doi: 10.1016/j.jmr.2011.03.003
- Kavitha T., Kang I.-K., Park S.-Y. Poly (acrylic acid) – Grafted Graphene Oxide as an Intracellular Protein Carrier. *Langmuir*. 2014. Vol. 30, no. 1. P. 402–409. doi: 10.1021/la404337d
- Kim J. E., Han T. H., Lee S. H., Kim J. Y., Ahn C. W., Yun J. E., Kim S. O. Graphene Oxide Liquid crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. Vol. 50, no. 13. P. 3043–3047. doi: 10.1002/anie.201004692
- Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* 2013. Vol. 9. P. 9243–9257. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.016
- Liu J., Fu S., Yuan B., Li Y., Deng Z. Toward a Universal «Adhesive Nanosheet» for the Assembly of Multiple Nanoparticles Based on a Protein-Induced Reduction/Decoration of Graphene Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132, no. 21. P. 7279–7281. doi: 10.1021/ja100938r
- Morrisett J. D., Pownall H. J., Gotto A. M. jr. Bovine Serum Albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids. *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 260, no. 7. P. 2487–2494.
- Muravsky V., Gurachevskaya T., Berezenko S., Schnurr K., Gurachevsky A. Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2009. Vol. 74, no. 1. P. 42–47. doi: 10.1016/j.saa.2009.05.003
- Ni Y., Zhanga F., Kokot S. Graphene oxide as a nanocarrier for loading and delivery of medicinal drugs and as a biosensor for detection of serum albumin. *Anal. Chim. Acta*. 2013. Vol. 769. P. 40–48. doi: 10.1016/j.aca.2013.01.038
- Pavičević A., Luo J., Popović-Bijelić A., Mojović M. Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin. *Eur. Biophys. J.* 2017. Vol. 46, no. 8. P. 773–787. doi: 10.1007/s00249-017-1257-z
- Pavičević A. A., Popović-Bijelić A. D., Mojović M. D., Šušnjar S. V., Bačić G. G. Binding of Doxyl Stearic Spin Labels to Human Serum Albumin: An EPR Study. *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, no. 37. P. 10898–10905. doi: 10.1021/jp5068928
- Peters T. All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 432 p. doi: 10.1002/food.19970410631
- Rajeshwari A., Pakrashi S., Madhumita S. D. et al. Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with Al₂O₃ nanoparticles. *J. Luminescence*. 2014. Vol. 145. P. 859–865. doi: 10.1016/j.jlumin.2013.08.073
- Rezaei-Tavirani M., Moghaddamnia S. H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Vol. 39, no. 5. P. 530–536. doi: 10.5483/BMBRep.2006.39.5.530
- Roy S., Das T. K. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanopar-

ticles and bovine serum albumin. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Vol. 14, no. 7. P. 4899–4905. doi: 10.1166/jnn.2014.9508

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon. *Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamond.* Vol. I. 2016. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

San Biagio P. L., Martorana V., Emanuele A., Vaiana S. M., Bulone D., Palma M. U. Interacting processes in protein coagulation. *Proteins.* 1999. Vol. 37, no. 1. P. 116–120. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991001)37:1<116::AIDPROT11

Sancataldo G., Vetri V., Fodera V., Di Cara G., Militello V., Leone M. Oxidation Enhances Human Serum Albumin Thermal Stability and Changes the Routes of Amyloid Fibril Formation. *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, no. 1. P. e84552. doi:10.1371/journal.pone.0084552

Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D., Kohlhass K. A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu Y., Nguyen S. T., Ruoff R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon.* 2007. Vol. 45, no. 7. P. 1558–1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034

Stewart A. J., Blindauer C. A., Berezenko S., Sleep D., Tooth D., Sadler P. J. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J.* 2005. Vol. 272. P. 353–362. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x

Sun H., Zhao A., Gao N., Li K., Ren J. S., Qu X. G. Deciphering a Nanocarbon-Based Artificial Peroxidase: Chemical Identification of the Catalytically Active and Substrate-Binding Sites on Graphene Quantum Dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Vol. 54. P. 7176–7180. doi: 10.1002/anie.201500626

Takabayashi K., Imada T., Saito Y., Inada Y. Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 1983. Vol. 136, no. 2. P. 291–295. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07740.x

Treuel L., Brandholt S., Maffre P., Wiegele S., Shang L., Nienhaus G. U. Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle-Cell Interactions. *ACS Nano.* 2014. Vol. 8, no. 1. P. 503–513. doi: 10.1021/nn405019v

Tsai D. H., Del Rio F. W., Keene A. M., Tyner K. M., MacCuspie R. I., Cho T. J., Zachariah M. R., Hackley V. A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir.* 2011. Vol. 27, no. 6. P. 2464–2477. doi: 10.1021/la104124d

Turell L., Radic R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 65. P. 244–253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050

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

Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Bohm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature Behaviour of Human Serum Albumin. *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104, no. 2. P. 469–478. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x

Zaman M., Ahmad E., Qadeer A., Rabbani G., Khan R. H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation International. *Int. J. Nanomedicine.* 2014. Vol. 9. P. 899–912. doi: 10.2147/IJN.S54171

Received April 24, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф. -м. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 765264

CONTRIBUTORS:

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

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