

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2013

С. Г. Скуридин¹, В. И. Саянов¹, В. И. Попенко¹, Э. В. Штыкова²,
Е. С. Лисицына³, В. А. Дубинская⁴, В. А. Быков⁴, Ю. М. Евдокимов¹

СТРУКТУРНЫЕ ЭФФЕКТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, В ЧАСТИЦАХ ХОЛЕСТЕРИЧЕСКИХ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ДИСПЕРСИЙ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова Российской академии наук, Москва, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия;

⁴ Научно-исследовательский и учебно-методический центр биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН, Москва, Россия

Наночастицы золота (Au) диаметром около 2 нм (но не 5 или 15 нм) способны внедряться в квазинематические слои частиц холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД), образованных из молекул двухцепочечных нуклеиновых кислот, относящихся к разным семействам (ДНК — В-форма; поли(И) × поли(Ц) — А-форма). Исследование свойств частиц ХЖКД, обработанных наночастицами Au, при помощи разных физико-химических методов показывает, что внедрение наночастиц Au в квазинематические слои, формируемые молекулами нуклеиновой кислоты в частицах дисперсии, приводит к 2 структурным эффектам, а именно вызывает перестройку пространственной холестерической структуры частиц дисперсий, сопровождаемую уменьшением амплитуды аномальной полосы в спектре кругового дихроизма, соответствующей исходной ХЖКД, и индуцирует образование кластеров Au внутри частиц ХЖКД, сопровождаемое появлением полосы поверхностного плазмонного резонанса в видимой области спектра поглощения. Не исключено, что данные структурные эффекты являются причиной генотоксичности наночастиц Au.

Ключевые слова: ДНК; жидкокристаллические дисперсии ДНК; наночастицы золота; круговой дихроизм; спектроскопия поглощения; малоугловое рассеяние; поверхностный плазмонный резонанс; структура лиотропных жидких кристаллов; токсичность наночастиц.

Поиск объективных методов оценки взаимодействия низкомолекулярных соединений с ДНК клетки является одной из актуальных задач медицинской химии. Среди таких методов значительное место занимают методы нанобиотехнологии, позволяющие эффективно выявлять “мишени” для потенциальных лекарственных препаратов на генетическом уровне клетки.

Одной из важных задач нанобиотехнологии является изучение действия наночастиц на функции клетки [1]. Несмотря на то, что возможность применения в медицине различных наноматериалов (наночастиц или квантовых точек) является весьма высокой, основополагающие взаимодействия и эффекты наноразмерных материалов в живых системах по большей части остаются недостаточно исследованными. Это, в свою очередь, связано с 2 обстоятельствами. Во-первых, существующее множество наноматериалов сильно различается по своим свойствам; во-вторых, адекватная система для исследования наноматериалов пока не

разработана. Например, было высказано предположение, согласно которому биологический эффект наночастиц золота (Au) на супрамолекулярные структуры двухцепочечной ДНК *in vitro* и *in vivo* аналогичен эффекту мутагенных молекул [2, 3]. Можно подчеркнуть, что взаимодействие металлических наночастиц с нативными одно- или двухцепочечными молекулами нуклеиновой кислоты является широко известным феноменом [4]. Хотя цитотоксичность наночастиц Au *in vitro* и *in vivo* исследовалась несколькими исследовательскими группами [5–8], на сегодняшний день обобщающий вывод еще не сделан. Это связано с тем, что действие наноматериалов на клеточном уровне изучалось в совершенно разных биологических тест-системах, вследствие чего оценка механизма (механизмов) данного процесса представляет собой сложную проблему [9, 10]. Следовательно, важной задачей является создание простых модельных систем для изучения эффектов наноматериалов в сопоставимых условиях. Несмотря на то, что условия *in vivo* отличают-

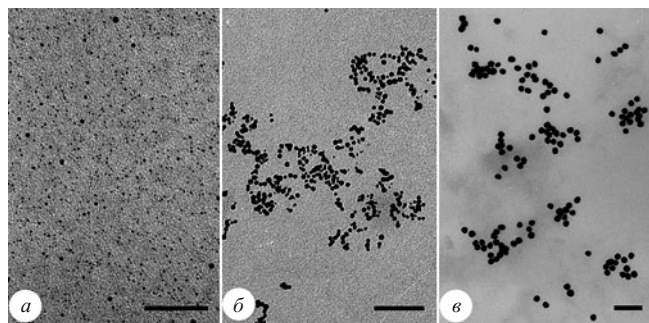


Рис. 1. Электронные микрофотографии наночастиц золота, использованных в работе: *a* — 2 нм; *б* — 5 нм; *в* — 15 нм. Отметка на рисунке соответствует 100 нм.

сы от условий *in vitro*, одной из таких модельных систем являются “холестерические жидкие кристаллы” и “холестерические жидкокристаллические дисперсии” (ХЖКД) двухцепочечной ДНК [11]. Термин “частица холестерической жидкокристаллической дисперсии” будет использоваться в дальнейшем в настоящей работе. Действительно, физико-химические свойства ХЖКД ДНК отражают некоторые особенности супрамолекулярной организации этих макромолекул в составе биологических объектов, таких как хромосомы протистов (например, хромосомы динофлагеллят (жгутиконосцев)) и ДНК-содержащие вирусы [12]. Следовательно, данная тест-система интересна не только с нанотехнологической, но и с биотехнологической точки зрения. Можно добавить, что, благодаря высокой локальной концентрации молекул ДНК и их упорядоченному расположению в частицах ХЖКД, низкомолекулярные химические и биологически активные соединения могут диффундировать внутрь частиц дисперсии и взаимодействовать с двухцепочечными молекулами ДНК с образованием разных типов комплексов [11]. Эти взаимодействия сопровождаются появлением оптических эффектов (специфичных для данных соединений) в спектрах кругового дихроизма (КД) [13, 14]. Следовательно, каждая частица ХЖКД является не только эффективным “поглотителем”, но и “сенсором” [14] для низкомолекулярных соединений, образующих прочные комплексы с двухцепочечными молекулами ДНК.

Особенности взаимодействия наночастиц Au с частицами ХЖКД ДНК до настоящего времени детально изучены не были. Цель настоящей работы состояла в изучении эффектов, вызываемых наночастицами Au в частицах ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот (ДНК и поли(И) × поли(Ц)), при помощи разных физико-химических методов.

Экспериментальная часть

В работе использовали растворы коллоидного золота (гидрозоли), содержащие сферические наночастицы разного размера. Наночастицы Au были синтезированы по ранее описанным методикам [15–17]. Первый гидрозоль был получен по методике, описанной в

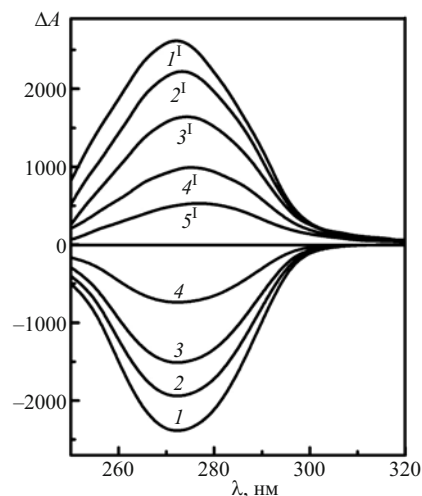


Рис. 2. Спектры КД ХЖКД ДНК (кривые 1–4) и ХЖКД поли(И) × поли(Ц) (кривые 1¹–5¹), обработанных наночастицами Au (2 нм): 1 – $C_{\text{нано-Au}} = 0$; 2 – $C_{\text{нано-Au}} = 0,07 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 3 – $C_{\text{нано-Au}} = 0,26 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 4 – $C_{\text{нано-Au}} = 0,82 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; $C_{\text{ДНК}} = 9$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 150$ мг/мл; 0,27 М NaCl + $1,78 \cdot 10^{-3}$ М Na⁺-фосфатный буфер. 1¹ – $C_{\text{нано-Au}} = 0$; 2¹ – $C_{\text{нано-Au}} = 0,16 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 3¹ – $C_{\text{нано-Au}} = 0,33 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 4¹ – $C_{\text{нано-Au}} = 0,66 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 5¹ – $C_{\text{нано-Au}} = 0,82 \cdot 10^{14}$ частиц/мл, $C_{\text{поли(И) × поли(Ц)}} = 9$ мкг/мл, $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг/мл; 0,27 М NaCl + $1,78 \cdot 10^{-3}$ М Na⁺-фосфатный буфер. $\Delta A = (A_L - A_R) \cdot 10^{-6}$ опт. ед.; $L = 1$ см; $T = 22$ °С. Во всех случаях спектры КД были зарегистрированы через 3 ч после обработки ХЖКД ДНК или ХЖКД поли(И) × поли(Ц) наночастицами Au.

работе [15], и содержал наночастицы Au со средним диаметром около 15 нм. Второй гидрозоль, содержащий наночастицы Au размером 5,5 нм, синтезирован по методике, описанной в работе [16]. Наконец, третий гидрозоль, содержащий квазиметаллические наночастицы Au размером 2–3 нм, синтезирован, как описано в работе [17]. Средний размер наночастиц Au в исходных растворах оценивали при помощи динамического светорассеяния и электронной микроскопии (рис. 1). Численная концентрация наночастиц Au в первом, втором и третьем гидрозолях составляла соответственно 10^{12} , 10^{13} и 10^{15} частиц/см³. Исходные растворы наночастиц Au хранили в холодильнике при 4 °С в светонепроницаемом контейнере и использовали через 2,5 мес после их синтеза.

Препарат двухцепочечной ДНК из тимуса телят (“Sigma”, США) использовали после дополнительной очистки и деполимеризации (молекулярная масса ДНК (0,3–0,7) · 10⁶ Да). Препарат синтетического двухцепочечного полирибонуклеотида поли(И) × поли(Ц) (“Sigma”, США; lot 023K4032) использовали без дополнительной очистки.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ; “Serva”, Германия; молекулярная масса ПЭГ 4000 Да) и цианиновый краситель “SYBR Green I” (SG; “Sigma”, США) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию SG в растворах определяли спектрофотометрически [18]. Исходный раствор SG хранили при 4 °С в светонепроницаемом контейнере.

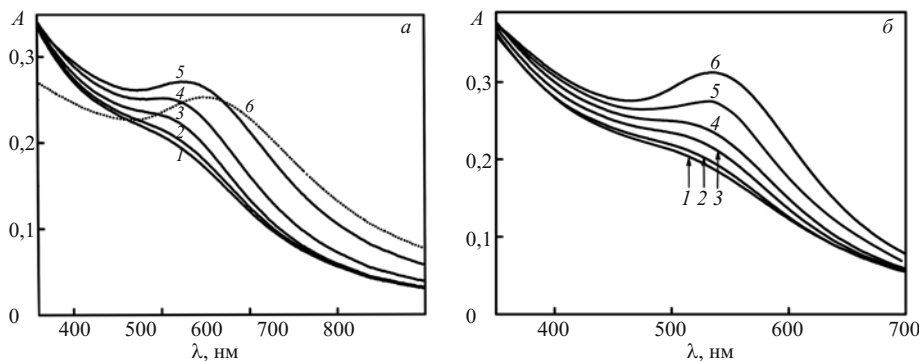


Рис. 3. Спектры поглощения ХЖКД ДНК (а) и ХЖКД поли(И) × поли(Ц) (б), зарегистрированные через разное время после обработки этих дисперсий наночастицами Au (2 нм): (а) 1 – 3; 2 – 12; 3 – 43; 4 – 109; 5 – 530; 6 – 1200 мин после добавления наночастиц Au; $C_{\text{ДНК}} = 9$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 150$ мг/мл; буфер как на рис. 1; $C_{\text{нано-Au}} = 0,82 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; (б) 1 – 3; 2 – 30; 3 – 50; 4 – 85, 5 – 115; 6 – 256 мин после добавления наночастиц Au; $C_{\text{поли(И) × поли(Ц)}} = 9$ мкг/мл, $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг/мл; буфер как на рис. 1; $C_{\text{нано-Au}} = 0,82 \cdot 10^{14}$ частиц/мл. Температура 22 °С.

Водно-солевые растворы ДНК, ПЭГ и NaCl готовили в 0,002 М Na⁺-фосфатном буфере (рН ~ 7,0) и затем фильтровали через мембранные фильтры (“Millipore”, США) с диаметром пор 0,8 мкм для удаления возможных механических примесей.

Метод формирования контрольных ХЖКД и холестерических жидкокристаллических фаз двухцепочечных нуклеиновых кислот в ПЭГ-содержащих водно-солевых растворах подробно описан в работе [11]. Данный метод использовали для приготовления жидкокристаллических дисперсий ДНК и поли(И) × поли(Ц), а также жидкокристаллических фаз ДНК, содержащих наночастицы Au.

Спектры поглощения регистрировали при помощи спектрофотометра “Cary 100 Scan” (“Varian”, США), а спектры КД — при помощи портативного спектрометра кругового дихроизма “СКД-2” (Институт спектроскопии РАН, г. Троицк, Россия) [19].

Микрофотографии наночастиц Au получены при помощи электронного микроскопа “Jem-100CX” (“Jeol”, Япония).

Флуоресцентные “отображения” частиц ХЖКД двухцепочечной ДНК, обработанных наночастицами Au, получали при помощи конфокального микроскопа “Leica TCS SP5” (“Leica Microsystems”, Германия).

Осадки (~ 3 мг) жидкокристаллических фаз, полученные после низкоскоростного центрифугирования частиц ХЖКД ДНК, обработанных наночастицами Au, исследовали при помощи малоуглового рассеяния (МУР) рентгеновских лучей. Измерения проводили на дифрактометре “Амур-К” (Институт кристаллографии РАН) [20]. Технические подробности экспериментов описаны в работах [20, 21]. Анализ характеристических брегговских пиков на кривых рассеяния рентгеновских лучей на жидкокристаллических фазах ДНК проводили при помощи программы “PEAK” [22].

Результаты и их обсуждение

На рис. 2 сопоставлены спектры КД ХЖКД ДНК и ХЖКД поли(И) × поли(Ц), обработанных наночастицами Au (диаметр ~ 2 нм). Видно, что образование

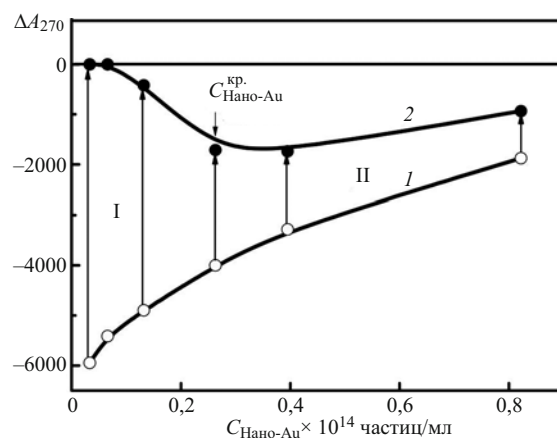


Рис. 4. Зависимость амплитуды аномальной полосы (ΔA_{270}) в спектрах КД растворов, содержащих частицы ХЖКД ДНК, от концентрации наночастиц Au (2 нм) до (кривая 1) и после их разбавления в 2 раза водой (кривая 2). 1 — $C_{\text{ДНК}} = 27$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 150$ мг/мл; буфер как на рис. 1; 2 — $C_{\text{ДНК}} = 13,5$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 75$ мг/мл; 0,135 М NaCl + $0,89 \cdot 10^{-3}$ М Na⁺-фосфатный буфер. $\Delta A_{270} \cdot 10^{-6}$ опт. ед.; $L = 1$ см; $T = 22$ °С. $C_{\text{кр.нано-Au}}$ — “критическая” концентрация наночастиц Au. Стрелками на рисунке показано изменение величины ΔA_{270} после разбавления водно-солевых растворов ПЭГ, содержащих частицы ХЖКД ДНК, обработанные наночастицами Au, в 2 раза дистиллированной водой.

ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот в водно-солевом растворе ПЭГ сопровождается появлением в спектрах КД интенсивных (аномальных) полос, расположенных в области поглощения азотистых оснований ($\lambda \sim 270$ нм; см. кривые 1 и 1'). В соответствии с теорией [11, 13], появление подобных (отрицательной или положительной) полос однозначно подтверждает макроскопическую спиральную закрутку квазинематических слоев молекул нуклеиновой кислоты в частицах дисперсии, образованных в результате фазового исключения этих макромолекул из ПЭГ-содержащих водно-солевых растворов. Отрицательный знак полосы в спектре КД доказывает левую спиральную закрутку правозакрученных молекул ДНК (В-форма, кривая 1), тогда как положительный знак соответствующей

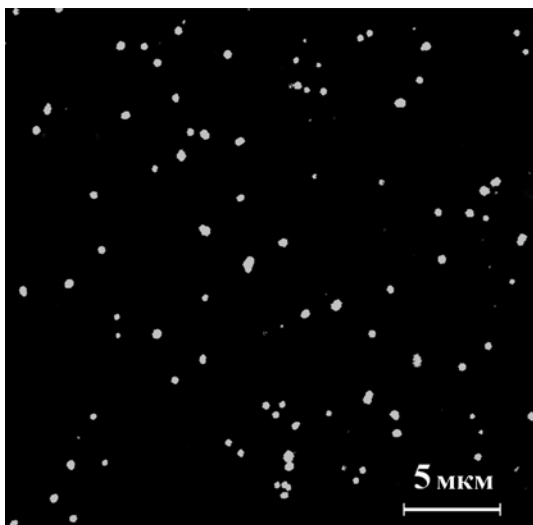


Рис. 5. Флуоресцентные “отображения” частиц ХЖКД ДНК, сформированных в ПЭГ-содержащем водно-солевом растворе и последовательно обработанных сначала наночастицами Au (2 нм), а затем красителем SYBR Green I. $C_{\text{ДНК}} = 9$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 150$ мг/мл; буфер как на рис. 1; $C_{\text{нано-Au}} = 0,82 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; $C_{\text{SG}} = 4,11 \cdot 10^{-6}$ М; $T = 22$ °С.

ет правой спиральной закрутке слоев из правозакрученных молекул поли(И) × поли(Ц) (А-форма, кривая 1¹) в образовавшихся частицах. Следовательно, аномальные полосы в спектре КД (рис. 2), расположенные в области поглощения азотистых оснований молекул нуклеиновой кислоты, являются прямым доказательством образования частиц, характеризующихся спирально закрученной, пространственной (холестерической) структурой [13].

В физико-химическом смысле ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот представляют собой системы, частицы которых изотропно распределены в водно-солевом растворе ПЭГ. Подобные частицы не существуют в отсутствие высокого осмотического давления (π) растворителя (например, в водно-солевом растворе, где значение $\log \pi$ составляет около 6) [11]. Заметим, что частицы ХЖКД низкомолекулярных двухцепочечных нуклеиновых кислот представляют собой по существу “микроскопические капли концентрированного раствора нуклеиновой кислоты” и, благодаря “жидкому” типу упаковки макромолекул в данных частицах, их нельзя “взять в руки” или “непосредственно увидеть” при помощи микроскопической техники. Оценки показали, что в случае молекул двухцепочечной ДНК каждая частица ХЖКД имеет средний диаметр около 500 нм, в состав частицы входят около 10^4 молекул ДНК, расстояние между которыми может меняться (в зависимости от осмотического давления растворителя) в пределах от 2,5 до 5,0 нм [11, 12].

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что при обработке ХЖКД ДНК и ХЖКД поли(И) × поли(Ц) наночастицами Au амплитуды аномальных полос в спектрах КД в обоих случаях уменьшаются. Чем выше концентрация наночастиц Au в растворе,

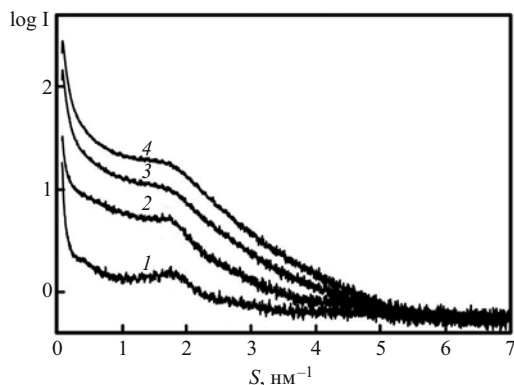


Рис. 6. Кривые малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на холестерической жидкокристаллической фазе ДНК (кривая 1, контроль), и фазах ДНК, содержащих разную концентрацию наночастиц Au (кривые 2–4). Условия формирования ХЖКД ДНК: $C_{\text{ДНК}} = 27$ мкг/мл, $C_{\text{ПЭГ}} = 150$ мг/мл, буфер как на рис. 1; 1 – $C_{\text{нано-Au}} = 0$; 2 – $C_{\text{нано-Au}} = 0,07 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 3 – $C_{\text{нано-Au}} = 0,33 \cdot 10^{14}$ частиц/мл; 4 – $C_{\text{нано-Au}} = 0,66 \cdot 10^{14}$ частиц/мл. Фазы ДНК для анализа получали при помощи низкоскоростного центрифугирования (центрифуга К-23, Германия; 4000 об/мин, 40 мин; 4 °С) частиц ХЖКД ДНК.

тем сильнее уменьшение аномальной полосы в спектрах КД ХЖКД разных типов нуклеиновых кислот. Рис. 2 нуждается в нескольких комментариях. Во-первых, амплитуда аномальной полосы в спектре КД зависит, как известно [11, 13], от угла спиральной закрутки квазинематических слоев молекул нуклеиновой кислоты в составе холестерической структуры частиц дисперсии. Во-вторых, теория [23] предсказывает, что изменение эффективности взаимодействия между молекулами двухцепочечной нуклеиновой кислоты в квазинематических слоях должно сопровождаться изменениями параметров пространственной спиральной структуры частиц ХЖКД и значений амплитуды аномальной полосы в спектрах КД. Следовательно, уменьшение амплитуд аномальных полос в спектрах КД (рис. 2, кривые 2–4 и 2¹–5¹) связано с изменением степени спиральной закрутки квазинематических слоев в структуре частиц ХЖКД, образованных как из двухцепочечных молекул ДНК, относящихся к В-семейству, так и из двухцепочечных молекул поли(И) × поли(Ц), принадлежащих А-семейству. Наблюдаемый оптический эффект связан только с одним процессом, а именно с внедрением наночастиц Au в частицы ХЖКД. В-третьих, агрегация отдельных наночастиц Au в растворе не может вызывать изменение амплитуды аномальной полосы в спектрах КД ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот, расположенной в области поглощения азотистых оснований.

Эффективность уменьшения амплитуд аномальных полос для ХЖКД, образованных из молекул ДНК или поли(И) × поли(Ц), зависит от размера наночастиц Au и времени обработки ХЖКД наночастицами Au. Например, если диаметр наночастиц Au составляет 2 нм, амплитуда аномальной полосы уменьшается на 75 % после 3 ч обработки, то в случае наночастиц Au, диаметр которых составляет 15 нм, амплитуда этой поло-

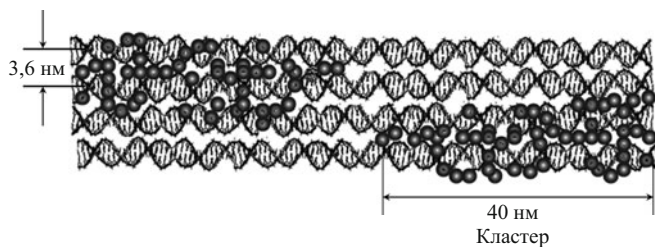


Рис. 7. Гипотетическая модель расположения кластеров Au между двухцепочечными молекулами ДНК, образующими квазинематический слой в структуре частицы ХЖКД.

сы за то же время уменьшается только на 20 % [21]. Этот факт позволяет предположить, что внедрение наночастиц Au в частицы ХЖКД определяется расстоянием между двухцепочечными молекулами нуклеиновой кислоты, упакованными в квазинематические слои при данной концентрации ПЭГ ($C_{\text{ПЭГ}} = 150 \text{ мг/мл}$) [11]. Наночастицы Au размером около 2 нм способны диффундировать между молекулами двухцепочечной нуклеиновой кислоты, поскольку размер этих наночастиц достаточно близок по значению к расстоянию между соседними молекулами нуклеиновой кислоты при данных условиях (концентрация ПЭГ и т.д.) [21]. Однако наночастицы Au с размерами 5 и 15 нм слишком велики по сравнению с расстоянием между соседними молекулами нуклеиновой кислоты в квазинематических слоях. Следовательно, такие наночастицы не могут диффундировать внутрь частиц ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот.

Объясняя результаты, показанные на рис. 2, можно принять во внимание следующее.

Первые эксперименты [24, 25] показали, что наночастицы Au могут концентрироваться вблизи линейных молекул ДНК, образуя при этом плоские супрамолекулярные структуры, состоящие из повторяющихся линейных молекул ДНК и наночастиц Au. Этот результат свидетельствует о том, что линейные, жесткие, двухцепочечные молекулы ДНК при взаимодействии с наночастицами Au образуют плоские суперструктуры типа (...-Au-ДНК-Au-ДНК-Au-ДНК-Au-...), несмотря на анизотропные свойства, присущие этой макромолекуле [4, 26 – 29].

Следовательно, с одной стороны, наночастицы Au способствуют организации двухцепочечных молекул ДНК в плоские суперструктуры, в которых соседние молекулы ДНК не только плотно упакованы, но и расположены параллельно друг другу. С другой стороны, хорошо известно, что молекулы двухцепочечной ДНК, благодаря анизотропным свойствам этих молекул [11], образуют спирально закрученные квазинематические слои в частицах ХЖКД.

Наличие этих фактов позволяет сделать вывод, согласно которому внедрение наночастиц Au в квазинематические слои двухцепочечной нуклеиновой кислоты приводит к их раскручиванию, т.е. к их нематизации. Это означает, что внедрение наночастиц Au между квазинематическими слоями в частицах ХЖКД и их упорядочение вблизи поверхности двухцепочеч-

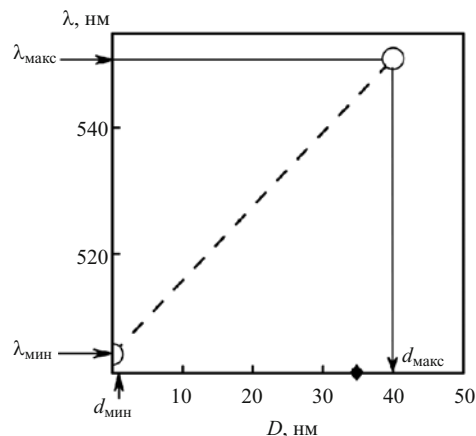


Рис. 8. Зависимость положения максимума полосы поверхностного плазмонного резонанса от размера кластеров, образуемых наночастицами Au в структуре частиц ХЖКД ДНК. D — размер кластеров Au (нм); Точка на оси абсцисс (\blacklozenge) соответствует максимальному размеру кластеров, образуемых наночастицами Au в структуре частиц ХЖКД поли(И) \times поли(Ц).

ных молекул нуклеиновой кислоты тем или иным способом “трансформируется” в изменение энергии взаимодействия между соседними молекулами нуклеиновой кислоты в квазинематических слоях. Следовательно, наночастицы Au могут индуцировать переход от холестерической структуры частиц жидкокристаллической дисперсии двухцепочечной нуклеиновой кислоты, обладающей аномальной оптической активностью, к нематической структуре, у которой аномальная оптическая активность отсутствует. (Для реализации данного процесса различия во вторичной структуре двухцепочечных молекул нуклеиновой кислоты не являются важными.)

Таким образом, изменения в спектрах КД (рис. 2) показывают, что наночастицы Au внедряются в структуру частиц ХЖКД. Наблюдаемые изменения в спектрах КД зависят только от присутствия наночастиц Au внутри квазинематических слоев частиц ХЖКД.

На рис. 3 приведены спектры поглощения ХЖКД ДНК (рис. 3, а) и ХЖКД поли(И) \times поли(Ц) (рис. 3, б), зарегистрированные через разное время после обработки этих дисперсий наночастицами Au. Видно, что в спектрах поглощения наблюдаются ярко выраженные изменения. Во-первых, обработка дисперсий наночастицами Au сопровождается появлением поглощения при $\lambda \sim 505 \text{ нм}$ (полоса поверхностного плазмонного резонанса (ППР)) [30 – 32]. Наличие ППР обуславливает бледно-фиолетовый цвет растворов, содержащих ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот, обработанных наночастицами Au. Полоса ППР отсутствует в исходном растворе ДНК или поли(И) \times поли(Ц) и лишь слабо проявляется при $\lambda \sim 505 \text{ нм}$ в спектре поглощения коллоидного раствора, содержащего наночастицы Au размером около 2 нм. Следовательно, внедрение и иммобилизация наночастиц Au в частицах ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот сопровождается сближением наночастиц Au. Во-вторых, интенсивность полосы ППР по-

степенно увеличивается, а ее максимум смещается со временем от $\lambda \sim 505$ нм до $\lambda \sim 550$ нм.

Сравнение полосы ППР, характерной для ПЭГ-содержащих водно-солевых растворов, к которым добавлены наночастицы Au размером 5 нм, с аналогичным раствором, содержащим частицы ХЖКД ДНК, не выявило изменений амплитуды полосы ППР. Отсутствие изменений в полосе ППР было зарегистрировано также в случае частиц ХЖКД ДНК, обработанных наночастицами Au размером 15 нм (данные не показаны). Эти результаты еще раз свидетельствуют о том, что “крупные” наночастицы Au не внедряются в структуру квазинематических слоев частиц ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот.

Через 20 ч после добавления наночастиц Au к ХЖКД ДНК можно зарегистрировать образование темно-фиолетового осадка в исследуемом растворе. Интенсивное перемешивание раствора, содержащего осадок, позволяет восстановить его оптические свойства и измерить спектр поглощения. Кривая *б* на рис. 3, *а* показывает присутствие полосы ППР, расположенной при $\lambda \sim 545 - 550$ нм в спектре поглощения раствора после его интенсивного перемешивания. Близкая форма и положение полос ППР (рис. 3, *а*, кривые *б* и *5*) свидетельствуют о том, что темно-фиолетовый осадок состоит из отдельных частиц ХЖКД ДНК, содержащих в своем составе наночастицы Au.

Таким образом, наблюдаемые изменения в спектре поглощения вызваны процессами, которые имеют место, главным образом, внутри частиц ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот, обработанных наночастицами Au.

Уменьшение амплитуд аномальных полос в спектрах КД и увеличение интенсивности полос ППР в спектрах поглощения ХЖКД ДНК и ХЖКД поли(И) × поли(Ц), обработанных наночастицами Au, свидетельствуют о протекании 2 различных процессов, а именно о быстром процессе внедрения наночастиц Au в квазинематические слои частиц ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот, и относительно более медленном процессе их сближения внутри частиц этих дисперсий. Эти 2 независимых процесса начинаются одновременно, но различаются по скоростям.

Известно [11], что ХЖКД ДНК существует только при высоком осмотическом давлении растворителя, обусловленном высокой концентрацией ПЭГ. Разбавление раствора ПЭГ, содержащего частицы ХЖКД ДНК, водой до концентрации ПЭГ ниже “критической” приводит к разрушению этих частиц и образованию изотропного раствора ДНК. Этот процесс сопровождается резким уменьшением амплитуды аномальной полосы в спектре КД. Однако если структура частиц ХЖКД ДНК стабилизирована в результате взаимодействия с наночастицами Au и в силу этого может существовать даже при низком осмотическом давлении растворителя, то разбавление раствора ПЭГ, содержащего частицы ХЖКД ДНК, обработанные наночастицами Au, не должно сопровождаться разруше-

нием частиц дисперсии и, как следствие этого, исчезновением аномальной полосы в спектре КД.

На рис. 4 приведены данные, характеризующие оптические свойства растворов ХЖКД ДНК, обработанной разными концентрациями наночастиц Au (размер около 2 нм), до (кривая *1*) и после их разбавления в два раза водой (кривая *2*). Видно, что в области низких концентраций наночастиц Au в растворе, содержащем ХЖКД ДНК (область I; $C_{\text{нано-Au}} < 0,26 \cdot 10^{14}$ частиц/мл), процесс его разбавления сопровождается разрушением частиц ХЖКД, образованием изотропного раствора ДНК и, как следствие этого, исчезновением аномальной полосы в спектре КД. При концентрациях наночастиц Au, превышающих “критическую” (область II; $C_{\text{нано-Au}} > 0,26 \cdot 10^{14}$ частиц/мл), разбавление раствора, содержащего ХЖКД ДНК, приводит к уменьшению амплитуды аномальной полосы в спектре КД только в 2 раза. Это означает, что в области II (с учетом концентрации ДНК) молекулярный круговой дихроизм ($\Delta\epsilon = \Delta A / (C_{\text{ДНК}} \cdot L)$) [11] системы до и после разбавления остается практически неизменным. Полученный результат однозначно показывает, что при концентрации наночастиц Au, превышающей “критическую”, их взаимодействие с молекулами ДНК в частицах ХЖКД приводит к образованию “сшивок”, наличие которых обеспечивает условия, необходимые для перехода этих частиц из “жидкого” в “твердое” состояние. (Можно добавить, что разбавление раствора, содержащего частицы ХЖКД ДНК, обработанной крупными наночастицами Au (размер 5 нм и 15 нм), сопровождается всегда разрушением частиц дисперсии и образованием изотропного раствора ДНК. Этот результат еще раз свидетельствует о том, что “крупные” наночастицы Au не проникают внутрь частиц ХЖКД ДНК.)

Таким образом, взаимодействие наночастиц Au (2 нм) с молекулами ДНК в составе частиц ХЖКД приводит к образованию пространственно зафиксированной структуры частиц ХЖКД. Устойчивость данной структуры определяется количеством и свойствами “сшивок”, а не свойствами ПЭГ-содержащего раствора. Поэтому новая структура частиц ХЖКД ДНК может существовать даже в условиях низкого осмотического давления раствора.

В пользу существования в растворе частиц ХЖКД ДНК, обработанных наночастицами Au, в виде независимых объектов свидетельствуют результаты, полученные при помощи конфокального микроскопа. Частицы ХЖКД ДНК, сформированные в ПЭГ-содержащем растворе ($C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг/мл), были последовательно обработаны сначала наночастицами Au, а затем флуоресцентным красителем SG. Флуоресцентные “отображения” полученных объектов приведены на рис. 5. Данные, представленные на рис. 5, показывают, что частицы ХЖКД ДНК, обработанные наночастицами Au, существуют в растворе в виде отдельных изолированных объектов. Средний “диаметр” этих объектов аналогичен среднему диаметру, характерному для исходных частиц ХЖКД ДНК, обра-

ботанных SG. Это означает, что вторичная структура двухцепочечных молекул ДНК при взаимодействии с наночастицами Au не нарушается. Данные, полученные при помощи конфокального микроскопа, свидетельствуют о том, что появление полосы ППР в спектре поглощения связано с объединением наночастиц Au внутри частиц ХЖКД ДНК, приводящим к образованию кластеров Au между соседними молекулами ДНК в квазинематических слоях.

Таким образом, частицы ХЖКД ДНК, обработанные наночастицами Au, существуют в растворе в виде независимых объектов. Присутствие на рис. 5 “отображений” отдельных частиц показывает, что при обработке частиц ХЖКД ДНК наночастицами Au “жидкий” характер упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии исчезает, и они приобретают “твердую” пространственную структуру. Кроме того, стандартные размеры “жестких” частиц ХЖКД, содержащих в своем составе наночастицы Au, свидетельствуют против агрегации наночастиц Au вне частиц ХЖКД.

Принимая во внимание полученные результаты, представляло интерес использовать метод малоуглового рассеяния (МУР) рентгеновских лучей [33 – 36] для исследования фаз ДНК, полученных в результате низкоскоростного центрифугирования частиц ХЖКД ДНК, содержащих наночастицы Au.

На рис. 6 представлены кривые МУР на фазах ДНК, содержащих разное число наночастиц Au (кривые 2 и 4). В качестве контроля использовали кривую рассеяния 1, полученную на холестерической жидкокристаллической фазе ДНК.

Во-первых, видно, что на кривых рассеяния образцов, содержащих наночастицы Au, присутствуют диффузные Бреговские максимумы. Сопоставление кривых 2 – 4 с кривой 1 показывает, что межплоскостные расстояния (d) в образцах, содержащих наночастицы Au, не увеличиваются по сравнению с контрольным образцом. Это означает, что расстояние между соседними квазинематическими слоями не меняется в процессе внедрения наночастиц Au в структуру частиц ХЖКД ДНК. Следовательно, локальная концентрация ДНК в частицах дисперсии остается постоянной, и структурный переход, вследствие изменения ее концентрации, невозможен.

Во-вторых, видно, что чем выше содержание наночастиц Au в исследуемом образце, тем меньше амплитуда Бреговских пиков за счет их сглаживания и уширения, что свидетельствует об уменьшении упорядоченности фазы ДНК. Принимая во внимание постоянство концентрации ДНК в фазах, этот результат показывает, что нарушение степени упорядоченности молекул ДНК в квазинематических слоях увеличивается. Этот результат вполне соответствует приведенным на рис. 2 данным спектроскопии кругового дихроизма, свидетельствующим об уменьшении упорядоченности молекул ДНК в квазинематических слоях по мере увеличения концентрации наночастиц Au. Поэтому можно еще раз повторить, что внедрение наночастиц Au в структуру квазинематических слоев

создает условия для коллинеарного (параллельного) расположения двухцепочечных молекул ДНК, т.е. процесс внедрения наночастиц Au приводит к раскручиванию соседних слоев.

Наконец, образцы, содержащие наночастицы Au, сильно рассеивают в области самых малых углов, т.е. в области центрального рассеяния, что свидетельствует о присутствии в них достаточно крупных полидисперсных рассеивающих объектов, а именно кластеров, состоящих из наночастиц Au.

Предположение о возможном линейном расположении наночастиц Au в кластерах и результаты расчетов размера этих образований, выполненных при помощи программы GNOM [37], позволили предложить гипотетическую модель, отражающую расположение наночастиц Au между двухцепочечными молекулами ДНК в квазинематических слоях (рис. 7).

Согласно предлагаемой модели наночастицы Au образуют линейные кластеры длиной ~ 40 нм, расположенные между молекулами ДНК. Формирование кластеров Au между двухцепочечными молекулами ДНК приводит к нарушению взаимной ориентации соседних квазинематических слоев. В этих условиях спиральная закрутка слоев в структуре частиц ХЖКД уменьшается. Таким образом, результаты МУР свидетельствуют в пользу высказанного выше соображения, согласно которому уменьшение аномальной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК, обработанной наночастицами Au, отражает изменение спирального расположения соседних квазинематических слоев, вызванное образованием кластеров Au между ними [38]. В результате этого процесса пространственная структура частиц ХЖКД теряет свою спиральную закрутку, и происходит переход типа “спирально закрученная структура \rightarrow структура без закрутки”. Кроме того, наши расчеты указывают на то, что наночастицы Au могут образовывать поперечные “сшивки”, связывая соседние молекулы двухцепочечной ДНК [29]. Не исключено, что такие “сшивки” могут вносить дополнительный вклад в стабилизацию “жесткой” структуры частиц ХЖКД ДНК.

Следует отметить принципиальное значение приведенных выше результатов, характеризующих МУР рентгеновых лучей на фазах ДНК, содержащих разное число наночастиц Au. Эти результаты свидетельствуют о формировании в структуре частиц ХЖКД ДНК кластеров Au с максимальным размером 40 нм. При этом полоса ППР в спектре поглощения ХЖКД ДНК, обработанной наночастицами Au, имеет максимум при $\lambda = 550$ нм (рис. 3, а, кривая 5). Сочетание этих данных позволяет построить зависимость, которая связывает положение максимума полосы ППР с размером линейных кластеров Au (рис. 8), т.е. она имеет прямое отношение к кластерам Au, формируемым при взаимодействии наночастиц Au с частицами ХЖКД разных типов нуклеиновых кислот. Видно (рис. 8), что в случае ХЖКД ДНК реальный размер образующегося кластера достигает 40 нм, а в случае ХЖКД поли(И) \times поли(Ц) — 35 нм.

Таким образом, в нашем случае смещение положения полосы ППР (рис. 3) связано не с увеличением истинного размера индивидуальных наночастиц Au, а с размером линейных кластеров Au, образующихся в структуре частиц ХЖКД. Вопрос об оценке числа наночастиц Au в кластере на основании результатов оптических измерений остается открытым, поскольку положение максимума полосы ППР зависит от числа и расстояния между наночастицами Au в кластере, диэлектрической постоянной среды и других параметров [39].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что взаимодействие наночастиц Au с частицами ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот приводит к 2 структурным эффектам, а именно вызывает перестройку пространственной холестерической структуры и индуцирует образование кластеров Au.

В заключение можно добавить, что исследования реакции клеток в ответ на введение наночастиц Au проводятся в настоящее время во многих научных центрах и лабораториях (см., например, [1, 3, 7, 38]). Однако до сих пор информация об эффектах, вызываемых наночастицами Au после их проникновения в клеточное ядро, крайне ограничена.

Высокая эффективность взаимодействия наночастиц Au с частицами ХЖКД двухцепочечных нуклеиновых кислот позволяет высказать предположение, согласно которому частицы ХЖКД, образуемые двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот, можно рассматривать в качестве “молекулярных губок”, легко “поглощающих” наночастицы фиксированного размера, которые тем или иным способом взаимодействуют с молекулами этого биополимера. В случае наночастиц Au такое взаимодействие сопровождается заметным изменением пространственной структуры частиц дисперсии. Поэтому результаты настоящей работы можно рассматривать как указание в пользу утверждения, согласно которому нарушение взаимной ориентации соседних квазинематических слоев, образуемых двухцепочечной молекулой ДНК в пространственной структуре хромосомы, вызванное фиксацией наночастиц Au между фрагментами этой макромолекулы, может являться одной из причин генотоксичности наночастиц Au [2, 3].

В заключение, нам хочется обратить внимание на одно важное обстоятельство.

Как было показано в работе, действие наночастиц Au малого размера на частицы ХЖКД, образованной в результате фазового исключения двухцепочечных молекул ДНК из водно-солевого полимерсодержащего раствора, сопровождается легко детектируемым изменением спектра КД.

При этом представляет интерес сочетание 2 практически значимых фактов. Во-первых, частицы ХЖКД ДНК рассматриваются в литературе в качестве модельной системы, отражающей свойства молекул ДНК, упакованных в хромосомах простейших организмов или специализированных клетках высших организмов (в частности, клетках спермиев). Во-вторых, в настоящее время существует практическая возмож-

ность измерять спектр КД, как с помощью импортных приборов, так и приборов отечественного производства (Институт спектроскопии РАН РФ).

Сочетание этих фактов открывает широкую возможность для применения оптического эффекта, обнаруженного в настоящей статье, не только для установления тонких деталей механизмов действия наночастиц другого происхождения, а также различных генотоксикантов, цитостатиков и т.д., на двухцепочечные молекулы ДНК, но и для селекции подобных низкомолекулярных соединений или биополимеров по эффективности нарушения структуры как молекул ДНК, так и структуры частиц ХЖКД ДНК. Такая информация может оказаться весьма полезной при создании новых лекарственных препаратов, “мишенью” которых является генетический материал клетки.

Авторы выражают глубокую благодарность В. М. Рудому и О. В. Дементьевой (Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН) за предоставление высококачественных препаратов наночастиц золота.

Работа выполнена при финансовой поддержке из средств ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы” в рамках государственного контракта № 14.527.12.0012 от 13 октября 2011 г.; шифр заявки “2011-2.7-527-012-001”, а также Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-00118-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Kang, M. A. Mackey, and M. A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**(5), 1517 – 1519 (2010).
2. V. Wiwanitkit, A. Sereemasapun, and R. Rojanathanes, *Fertil. Steril.*, **91**(1), e7 – e8 (2009).
3. С. Т. Захидов, Т. Л. Маршак, Е. А. Малонина и др., *Биол. мембраны*, **27**(4), 349 – 353 (2010).
4. Y. P. Liu, W. Meyer-Zaika, S. Franzka, et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**(25), 2853 – 2857 (2003).
5. M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, et al., *Small*, **1**(8–9), 841 – 844 (2005).
6. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, et al., *Small*, **3**(11), 1941 – 1949 (2007).
7. E. Boisselier and D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.*, **38**(6), 1759 – 1782 (2009).
8. X. D. Zhang, M. L. Guo, H. Y. Wu, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **4**(9), 165 – 173 (2009).
9. Y. Jin, M. Wu and X. Zhao, *Technical Proceedings of the 2005 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Anaheim, California, U.S.A.* (2005), vol. 1, pp. 274 – 277.
10. J. Ai, E. Biazar, M. Jafarpour, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **6**(5), 1117 – 1127 (2011).
11. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. V. Semenov and S. G. Skuridin, in: *DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanostructures*, Yu. M. Yevdokimov (ed.), CRC Press Taylor & Francis group, Boca Raton, London, New York (2011), pp. 43 – 48.
12. F. Livolant and A. Leforestier, *Prog. Polym. Sci.*, **21**(6), 1115 – 1164 (1996).
13. Y. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. G. Skuridin, et al., in: *The CD Spectra of Double-stranded DNA Liquid-Crystalline Dispersions*, Nova Science Publishers, New York (2011), pp. 3 – 97.

14. Y. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, and B. A. Chernuha, *Adv. Biosens.*, **3**, 143 – 164 (1995).
15. J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **11**, 55 – 75 (1951).
16. K. R. Brown, D. G. Walter, and M. J. Natan, *Chem. Mater.*, **12**(2), 306 – 313 (2000).
17. D. G. Duff, A. Baiker, and P. P. Edwards, *Langmuir*, **9**(9), 2301 – 2309 (1993).
18. H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, *Nucl. Acids Res.*, **32**(12), e103 (2004).
19. О. Н. Компанец, *Успехи физ. наук*, **174**(6), 686 – 690 (2004).
20. E. V. Shtykova, V. V. Volkov, V. I. Salyanov, et al., *Eur. Biophys. J.*, **39**(9), 1313 – 1322 (2010).
21. С. Г. Скуридин, В. А. Дубинская, Е. В. Штыкова и др., *Биол. мембраны*, **28**(3), 191 – 198 (2011).
22. P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Sokolova, et al., *J. Appl. Cryst.*, **36**(5), 1277 – 1282 (2003).
23. V. A. Belyakov, V. P. Orlov, S. V. Semenov, et al., *Liquid Cryst.*, **20**(6), 777 – 784 (1996).
24. C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic and J. J. Storhoff, *Nature*, **382**(6592), 607 – 609 (1996).
25. A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, et al., *Nature*, **382**(6592) 609 – 611 (1996).
26. A. Kumar, M. Pattarkine, M. Bhadbhade, et al., *Adv. Mater.*, **13**(5), 341 – 344 (2001).
27. M. Sastrya, A. Kumar, S. Datar and C. V. Dharmadhikari, *Appl. Phys. Lett.*, **78**(19), 2943 – 2945 (2001).
28. M. G. Warner and J. E. Hutchison, *Nature Mater.*, **2**(4), 272 – 277 (2003).
29. Л. В. Жеренкова, П. В. Комаров и П. Г. Халатур, *Коллоид. ж.*, **69**(6), 753 – 765 (2007).
30. S. Link and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **103**(40), 8410 – 8426 (1999).
31. S. L. Westcott, S. J. Oldenburg, T. R. Le, and N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.*, **300**(5 – 6), 651 – 655 (1999).
32. S. Link and M. A. El-Sayed, *Int. Rev. Phys. Chem.*, **19**(3), 409 – 453 (2000).
33. A. Guinier and G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-rays*, John Wiley and Sons, New York (1995), Chap. 3.
34. O. Glatter and O. Kratky, *Small-Angle x-ray Scattering*, Academic Press, London (1982), pp. 18 – 51.
35. L. A. Feigin and D. I. Svergun, *Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York (1987), pp. 3 – 58.
36. H. D. Mertens and D. I. Svergun, *J. Struct. Biol.*, **172**(1), 128 – 141 (2010).
37. D. I. Svergun, A. V. Semenyuk and L. A. Feigin, *Acta Cryst.*, **A44**, 244 – 250 (1988).
38. A. Rocha, Y. Zhou, S. Kundu, et al., *J. Nanobiotechnol.*, **9**(5), (2011).
39. Л. Дыкман, В. Богатырев, С. Щеголев и Н. Хлебцов, *Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение*, Наука, Москва (2008), сс. 70 – 78.

Поступила 16.05.12

STRUCTURAL EFFECTS INDUCED BY GOLD NANOPARTICLES IN THE PARTICLES OF CHOLESTERIC LIQUID-CRYSTALLINE DISPERSIONS OF DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS

S. G. Skuridin¹, V. I. Salyanov¹, V. I. Popenko¹, E. V. Shtykova², E. S. Lisitsyna³, V. A. Dubinskaya⁴, V. A. Bykov⁴, and Yu. M. Evdokimov¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia

² Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333, Russia

³ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia

⁴ Scientific-Research and Education-Methodological Center of Biomedical Technologies, State Research Institute of Medicinal and Aromatic Herbs (VILAR), Moscow, 123056, Russia

Gold (Au) nanoparticles (sized about 2 nm, but not 5 or 15 nm) are capable of effectively incorporating into quasi-nematic layers of particles of cholesteric liquid-crystalline (LC) dispersion formed by double-stranded nucleic acid molecules of various families (B-form DNA, A-form poly(I) – poly(C)). This Au-particle-size-dependent process is accompanied by a decrease in the amplitudes of abnormal bands in the circular dichroism (CD) spectra specific to initial cholesteric LC dispersions and simultaneously by the appearance of a plasmon resonance band in the visible absorption spectrum. The study of properties of particles of cholesteric LC dispersion treated with Au nanoparticles by various physicochemical methods has demonstrated that incorporation of Au nanoparticles into quasi-nematic layers of these particles results in two effects: (i) facilitated reorganization of the spatial cholesteric structure of particles in LC dispersions, and (ii) induced formation of Au clusters in the content of particles. It is not excluded that these effects account for genotoxicity of Au nanoparticles.

Keywords: DNA; liquid-crystalline dispersions of DNA; gold nanoparticles; circular dichroism; optical absorption spectroscopy; small-angle X-ray scattering; surface plasmon resonance; structure of lyotropic liquid crystals; toxicity of nanoparticles