

# Взаимодействие наночастиц кремния с молекулами бычьего сывороточного альбумина в водных растворах

К.А.Аненкова, И.А.Сергеева, Г.П.Петрова, К.В.Федорова, Л.А.Осминкина, В.Ю.Тимошенко

*Методом фотонно-корреляционной спектроскопии определены коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  и гидродинамический радиус  $R$  частиц в водных растворах бычьего сывороточного альбумина, содержащих наночастицы кремния. Характер зависимостей этих параметров от концентрации белка указывает на отсутствие взаимодействия между исследуемыми частицами в выбранном диапазоне концентраций альбумина 0.2 – 1.0 мг/мл.*

**Ключевые слова:** бычий сывороточный альбумин, наночастицы кремния, фотонно-корреляционная спектроскопия, корреляционная функция, коэффициент трансляционной диффузии, гидродинамический радиус, водородный показатель pH.

## 1. Введение

В современной медицине активно ведутся работы по исследованию свойств наночастиц для дальнейшего их применения в диагностике и лечении распространенных заболеваний, в том числе онкологических. Среди веществ, которые могут быть использованы для этих целей, особое внимание уделяется кремнию.

В организме человека кремний отвечает за обеспечение защитных функций, процессов обмена веществ и детоксикации. В среднем в сутки с пищей и водой человек потребляет 3.5 мг кремния, а теряет около 9 мг. Самостоятельно восстановить дефицит кремния организм не может, поскольку окружающие нас природные соединения кремния в большинстве своем биологически неактивны и не способны участвовать в биохимических реакциях внутри клетки.

Создание биологически активных нанокомпозитных материалов на кремниевой основе дало толчок многочисленным исследованиям этого элемента с целью использования его для лечения и диагностики различных заболеваний. В частности, было установлено, что, благодаря своей биологической совместимости с живыми тканями и способности быстро выводиться из организма, наночастицы кремния могут использоваться в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака [1].

Фотосенсибилизаторы должны быть малотоксичными, обладать однородной и стабильной структурой, а главное, иметь высокую селективность накопления в опухолях и при этом быстро выводиться из организма. Именно поэтому очень важно исследовать взаимодействие наночастиц кремния с основными белками сыворотки крови, особенно с альбумином. Эти исследования

могут быть проведены методами рассеяния света. По различию в значениях параметров светорассеяния для систем вода + частицы кремния + белок и вода + кремний можно судить о наличии или отсутствии агрегатов – нанокластеров, которые могут образоваться в результате взаимодействия макромолекул альбумина и наночастиц кремния.

## 2. Метод динамического рассеяния света

Молекулярные движения макромолекул протеинов и их агрегатов под воздействием тепловой энергии определяют динамику флуктуаций интенсивности рассеянного света в исследуемых системах. Эти движения представляют собой комбинацию трансляционной и вращательной диффузий, характер которых зависит от эффективных размеров и формы рассеивающих макромолекул, а также от их межмолекулярного электростатического взаимодействия, обусловленного величиной и характером пространственного распределения зарядовых центров на поверхности молекулы [2–4].

Метод динамического рассеяния лазерного света (фотонно-корреляционная спектроскопия) позволяет измерить автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света. При дальнейшей обработке становится возможным получение искомого распределения размеров частиц или распределения коэффициентов трансляционной диффузии. Флуктуации интенсивности рассеянного света возникают из-за неоднородности электрической проницаемости среды. В жидкости они напрямую связаны с флуктуациями локальной концентрации частиц, обусловленными броуновским движением макромолекул.

В простейшем случае монодисперсного раствора, содержащего не взаимодействующие сферические частицы одного размера, можно показать, что спектр мощности фототока описывается лоренцевым распределением [3] с полушириной  $\Gamma$ , а нормированная автокорреляционная функция интенсивности – экспонентой с временем релаксации  $\tau_{rel} = 1/\Gamma$ :

$$g^{(2)}(t) \approx \exp(-\Gamma t) + 1.$$

К.А.Аненкова, И.А.Сергеева, Г.П. Петрова, К.В.Федорова, Л.А.Осминкина, В.Ю.Тимошенко. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: ksushik\_1989@mail.ru, ksensanna@gmail.com, sergeeva@physics.msu.ru

Коэффициент  $\Gamma$  связан с физическими параметрами среды и условиями эксперимента следующим образом:

$$\Gamma = D_t q^2, \quad q = k_i - k_s = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (1)$$

где  $D_t$  – коэффициент трансляционной диффузии частиц;  $k_i$  и  $k_s$  – волновые векторы падающего и рассеянного излучения соответственно;  $n$  – показатель преломления среды;  $\lambda$  – длина волны рассеянного излучения;  $\theta$  – угол рассеяния;  $T$  – абсолютная температура среды;  $k$  – постоянная Больцмана;  $\eta$  – вязкость раствора;  $R$  – гидродинамический радиус частицы.

В случае полидисперсных растворов, когда размеры частиц различаются, спектр фототока представляет собой непрерывное множество (интеграл) лоренцевых кривых с разными полуширинами. Следовательно, для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную спектральную задачу в виде интегрального уравнения с лоренцевым ядром:

$$g^{(2)}(t) = [g^{(1)}(t)]^2 + 1 + \xi(t), \quad (2)$$

$$g^{(1)}(t) = \int_0^\infty P(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma. \quad (3)$$

Здесь  $g^{(1)}(t)$  – нормированная автокорреляционная функция сигнала;  $P(\Gamma)$  – распределение скоростей затухания (обратного времени релаксации);  $\xi(t)$  – ошибка, связанная не с погрешностью измерения фототока или шумами регистрирующего тракта, а со стохастической природой самого сигнала [3]. Если пренебречь влиянием постоянного экспериментального шума  $\xi(t)$ , уравнение (2), известное как соотношение Зигерта, позволяет вычислить  $g^{(1)}(t)$  через функцию  $g^{(2)}(t)$ , «накапливаемую» коррелятором за время эксперимента.

Интегральное уравнение (3) формирует основной принцип обработки данных в методе фотонно-корреляционной спектроскопии. Это уравнение относительно  $P(\Gamma)$  – интегральное уравнение Фредгольма первого рода, известное в математике как некорректно поставленная задача, т. е. задача, не имеющая алгоритма нахождения точного решения. В этой связи разрабатываются различные приближенные методы решения, многие из которых дают весьма хорошие результаты.

В настоящей работе обработка результатов выполнялась с помощью программного обеспечения DYNALS, в котором поиск приближенного решения уравнения (3) осуществляется по методу регуляризации А.Н.Тихонова для интегральных уравнений.

### 3. Подготовка экспериментальных образцов

Наночастицы для экспериментальных образцов изготавливались путем измельчения порошков кристаллического и пористого кремния в планетарной мельнице Pulverisette 7 (FRITSCHE, Германия) в течение 30 мин в соответствии с методикой работы [1]. Использовались наночастицы nc-cSi, полученные из порошка измельченных пластин кристаллического кремния (c-Si), и наночастицы nc-pSi, изготовленные из отслоенных пленок пористого кремния, сформированных стандартным методом электрохимического травления пластин c-Si p-типа про-

водимости с ориентацией поверхности (100) и удельным сопротивлением 25 мОм·см в растворе HF (50 %): C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (плотность тока травления 60 мА/см<sup>2</sup>).

В работе исследовались водные растворы наночастиц nc-pSi и nc-cSi; их начальные концентрации составляли 1 и 20 г/л соответственно. Для выделения наночастиц необходимого размера использовались частицы из верхних фракций коллоидных растворов, которые затем подвергались обработке в ультразвуковой ванне с частотой 3 кГц в течение четырех минут с последующей фильтрацией (диаметр ячейки фильтра 450 нм). Итоговые концентрации наночастиц –  $2 \times 10^{-4}$  мг/мл (nc-cSi) и  $2 \times 10^{-7}$  мг/мл (nc-pSi).

После фильтрации в водные растворы кремния добавлялся бычий сывороточный альбумин (БСА), концентрация которого менялась от 0.2 до 1 мг/мл с шагом 0.2 мг/мл.

### 4. Экспериментальные результаты

Для исследования водных растворов кремния, белка и белка с кремнием использовался фотонно-корреляционный спектрометр Photocor Complex (Photocor Instruments, Inc., США). Были получены концентрационные зависимости коэффициентов трансляционной диффузии  $D_t$  для растворов альбумина с добавлением кремния, а также чистых растворов альбумина и кремния при значениях pH 4.9 и 7.0 (рис.1 и 2). Уровень pH 4.9 соответствует изоэлектрической точке для белка альбумина, а pH 7.0 –

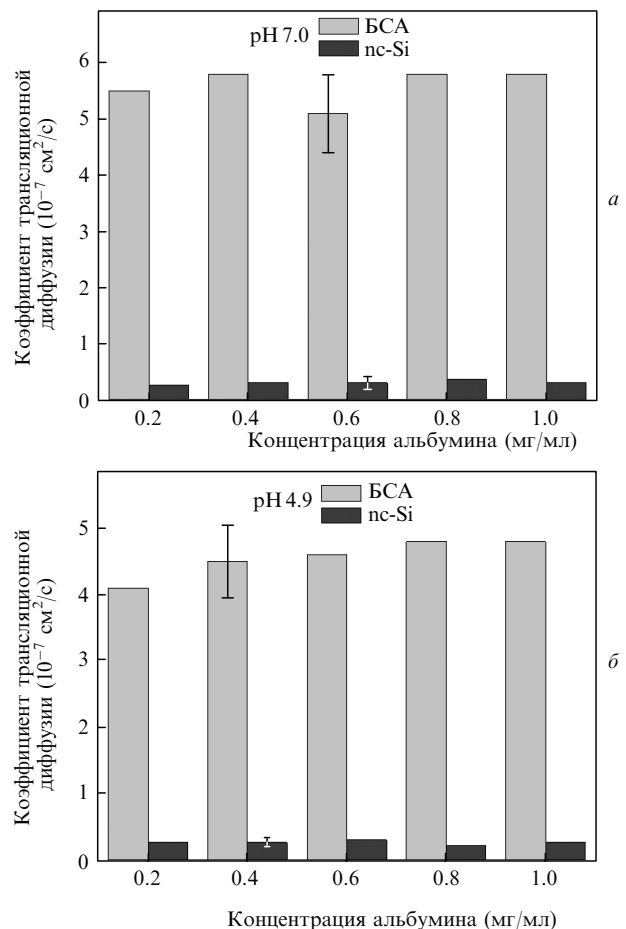


Рис.1. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии от концентрации альбумина для раствора, содержащего nc-cSi, при pH 7.0 (а) и pH 4.9 (б).

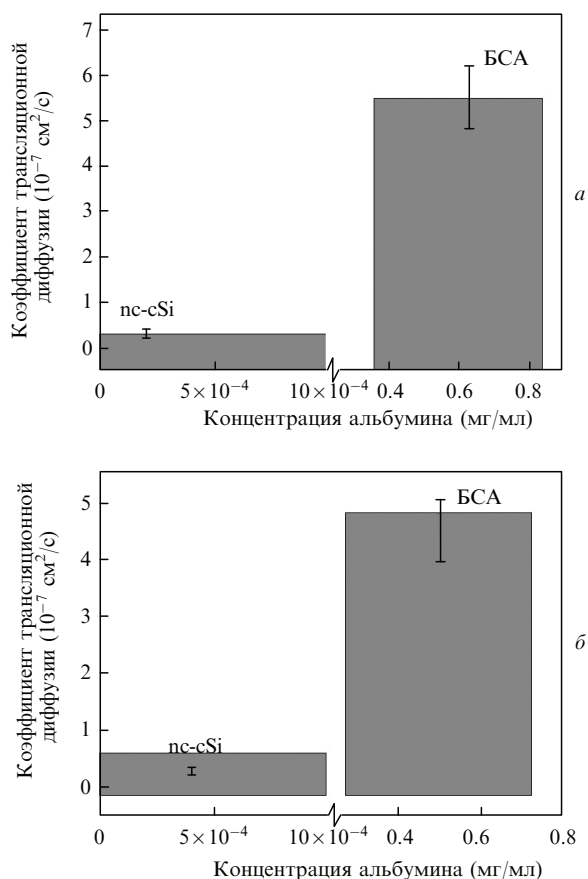


Рис.2. Коэффициенты трансляционной диффузии для чистых растворов БСА и nc-cSi при pH 7.0 (а) и pH 4.9 (б).

нейтральной среде. Сравнение полученных результатов показывает, что наличие кремния в растворах с альбумином не изменяет подвижности рассеивающих частиц в пределах ошибки эксперимента.

При понижении pH наблюдается уменьшение подвижности (коэффициента диффузии) молекул альбумина от  $5.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  в нейтральной среде до  $4.36 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  в изоэлектрической точке, что соответствует результатам, приведенным в [2]. Наночастицы кремния не чувствительны к изменению водородного показателя, и это согласуется с данными, указывающими на стабильность растворов кремниевых частиц в кислых и нейтральных средах [1].

Как видно из полученных результатов, два компонента раствора – частицы nc-cSi и БСА – в растворе существуют отдельно друг от друга, из чего можно сделать вывод, что взаимодействия наночастиц кремния и молекул БСА не наблюдается. Аналогичные результаты были получены и при изучении взаимодействия БСА с наночастицами nc-pSi. Здесь, как и для nc-cSi, не наблюдалось образования кремний-белковых агломератов. Это указывает на то, что исследуемые виды кремниевых частиц при заданных значениях pH не взаимодействуют с альбумином, а следовательно, не влияют на его свойства и являются для него безопасными.

## 5. Заключение

Методом динамического рассеяния света исследованы параметры растворов наночастиц кремния при различных значениях pH и концентрациях белка альбумина. В полученных спектрах наблюдаются две составляющие размеров частиц, одна из которых соответствует размерам макромолекулы альбумина, другая – исследуемым наночастицам. Какого-либо компонента, указывающего на возникновение агрегатов кремния с белком, в изученных растворах не обнаружено. На этом основании можно сделать вывод об отсутствии взаимодействия между молекулами альбумина и наночастицами кремния в рассматриваемом диапазоне концентраций. Для связывания nc-cSi или nc-pSi и альбумина необходимо, по видимому, модифицировать поверхность кремниевых наночастиц с помощью каких-либо аминокислот [5] с целью изменения поверхностного заряда.

Обнаруженный факт отсутствия взаимодействия кремниевых наночастиц с макромолекулами белка является интересным и может быть весьма полезным в биомедицинских исследованиях.

1. Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А., Осминкина Л.А., Воронцов А.С., Рябчиков Ю.В., Белогорохов И.А., Ковалев Д., Кашкаров П.К. *Письма в ЖЭТФ*, **83** (9), 492 (2006).
2. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. *Биомедицинская радиоэлектроника*, № 3, 41 (2000).
3. Камминс Г., Пайк Э. *Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов* (М.: Книжный дом Университет, 2002).
4. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И. *Квантовая электроника*, **32** (10), 897 (2002).
5. Tasciotti E., Liu X., Bhavane R., Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Ming-Cheng Cheng M., Decuzzi P., Tour J.M., Robertson F., Ferrari M. *Nature Nanotechnol.*, **3**, 151 (2008).