

ВЗАЄМОДІЯ ДНК З НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА

Г.М. ГЛИБИЦЬКИЙ,¹ В.В. ДЖЕЛАЛІ,² М.О. СЕМЕНОВ,¹
О.Д. РОШАЛЬ,³ Д.М. ГЛИБИЦЬКИЙ,¹ О.Ю. ВОЛЯНСЬКИЙ,²
Г.Г. ЗЕГРЯ⁴

¹Інститут радіофізики і електроніки ім. А.Я. Усікова НАН України
(Вул. акад. Проскури, 12, Харків 61085, Україна; e-mail: *glibit@ukr.net*)

²Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України
(Вул. Пушкінська, 14/16, Харків 61057, Україна)

³Науково-дослідний інститут хімії,
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна)

⁴Фізико-технічний інститут ім. А.Ф. Іоффе РАН
(Вул. Політехнічна, 26, Санкт-Петербург 194021, Росія)

УДК 573.3
© 2012

Проведено дослідження дегідратаційної самоорганізації ДНК з іонами Na^+ , Ag^+ і наночастинками срібла. Показано, що характер формування дендритних текстур (розмір площі, що займає на поверхні плівки) визначається конформаційним станом ДНК.

1. Вступ

У даний час все більше знаходять застосування матеріали з добавками наночастинок срібла (НС). З цією метою наночастинки срібла додають до перев'язувальних матеріалів для використання в медичних цілях, використовують у хірургії в ролі антибактеріального засобу [1]. НС використовуються при конструюванні нанокомпозитних молекулярних сенсорів, що ґрунтуються на зв'язуванні НС з ДНК на молекулярному рівні [2, 3]. У зв'язку з розширенням використання НС з'явилися публікації, присвячені дослідженням його токсичності та впливу на генетичний матеріал клітини [4–7]; показано, що накопичення НС у навколишньому середовищі призводить до погіршення екологічної ситуації [8]. З іншого боку, отримано дані про можливість застосування НС при лікуванні онкологічних захворювань [9].

У зв'язку з цим, необхідність досліджувати вплив НС на зміну стану тканин на клітинному рівні є актуальним завданням. В даний час показано, що механізм біологічної дії іонів срібла визначається переважно їх взаємодією з ДНК і полягає в утворенні комплексів з ДНК [10].

Раніше були проведені роботи по дослідженню впливу дегідратації розчинів білків і суспензій біо-

логічних рідин (кров, плазма крові), а також розчинів ДНК з різними іонами металів на формування дендритних структур на поверхні плівок, що утворюються внаслідок дегідратації. Так, у роботах [11–14] розроблено теоретичні моделі процесів дегідратації і показано, що формування дендритних структур зумовлено неоднорідностями гелю, що формується при дегідратації, які утворюються білковими молекулами і компонентами крові.

У роботі [15] показано, що характер текстур, які утворюються при дегідратації розчинів ДНК з іонами металів, і площа, яку вони займають на поверхні плівки, пов'язані зі ступенем мутагенності іонів металів розчину, з якого плівки були виготовлені.

У даній роботі проведено порівняльне дослідження дендритних текстур і площ, що займають на поверхні плівок, які формуються при дегідратації розчинів ДНК з іонами Na^+ , Ag^+ і його наноструктури.

2. Матеріали і методи

Для приготування розчинів було використано Na-DНК тимуса теляти фірми “Serva” і “Sigma-Aldrich”, суспензія НС з розміром 4 нм отримана у Фізико-технічному інституті ім. А.Ф. Іоффе РАН (Санкт-Петербург). Розчин ДНК готувався в два етапи. Спочатку зразок ДНК витримували в розчині відповідної солі необхідної концентрації протягом 12 годин при температурі 8–10 °С. Потім отриманий розчин ДНК розмішувався протягом 8 годин за допомогою лабораторної мішалки.

Плівки з розчинів ДНК з нітратом срібла і НС готувалися за методикою [16].

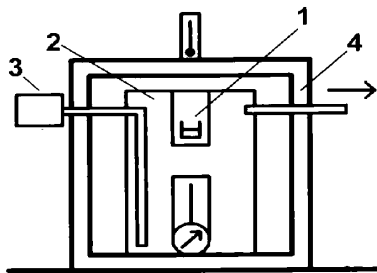


Рис. 1. Схема установки для отримання плівок ДНК: 1 – скляна кювета для розчинів, 2 – посудина з вводами для прокачування повітря, 3 – повітряний компресор для подачі повітря, 4 – водяний термостат

Схему установки для отримання плівок з розчинів Na-ДНК тимуса теляти з концентрацією 0,2 мг/мл з іонами Ag^+ і суспензії Na-ДНК з НС наведено на рис. 1. Кювета 1 площею $20 \times 20 \text{ мм}^2$ з розчином розміщувалася в герметичну камеру 2, через яку за допомогою компресора 3 продувалося повітря. Герметична камера розташована в термостаті 4 марки ТХ-50. В камері знаходяться також датчик температури, гігрометр і ємності з силікагелем для підтримки фіксованих значень відносної вологості (ВВ) повітря. Всі солі металів типу “ХС”.

Контроль структурного стану ДНК у розчинах з іонами Ag^+ і наночастинками срібла здійснювався за допомогою УФ-спектроскопії по поглинанню на довжині хвилі $\lambda = 260 \text{ нм}$, а структурного стану ДНК з НС в плівках – за допомогою ІЧ-спектроскопії в області $900\text{--}1800 \text{ см}^{-1}$, де розташовані реперні смуги поглинання, чутливі до конформації сахарофосфатного остова і азотистих основ ДНК.

Дослідження спектральних властивостей суспензій наночастинок срібла з ДНК, а також розчинів ДНК з солями металів проводили за допомогою спектрофотометра Hitachi U2310. ІЧ-спектри вологих плівок ДНК з НС отримані за допомогою двопроменевого спектрофотометра UR-20 в спектральному інтервалі $1000\text{--}1850 \text{ см}^{-1}$. Використовувалася призма NaCl з роздільною здатністю 6 см^{-1} при 1600 см^{-1} . Плівки були отримані на флюоритових підкладках. Зволоження плівок проводили за стандартними методиками в герметичній кюветі з використанням насичених розчинів солі [17, 18].

3. Результати та їх обговорення

Для порівняльного аналізу при різному збільшенні на відповідних рисунках наведені текстури плівок, отриманих при дегідратації з розчинів, що містять:

- 0,03 М NaNO_3 + Na-ДНК (рис. 2, рис. 3);
- $5,05 \times 10^{-5}$ М AgNO_3 + 0,03 М NaNO_3 + ДНК (рис. 4, рис. 5);
- 15 мкг/мл НС + 0,03 М NaNO_3 + ДНК (рис. 6, рис. 7).

Площа текстур на поверхні плівки з розчину з $5,05 \times 10^{-5}$ М AgNO_3 + 0,03 М NaNO_3 (рис. 4) становить $32 \pm 2\%$ від площі всієї плівки (зменшується на 50%) у порівнянні з площею текстур на поверхні плівки 0,03 М NaNO_3 + Na-ДНК ($62 \pm 2\%$ від площі всієї плівки, рис. 2). Площа текстур на поверхні плівки з розчину, що містить 15 мкг/мл НС + 0,03 М NaNO_3 (рис. 6) зменшується також на 50% ($35 \pm 2\%$ від площі всієї плівки) в порівнянні з площею текстур на поверхні плівки 0,03 М NaNO_3 (рис. 2). З цих даних можна зробити висновок про те, що зменшення площі текстур пов’язане зі взаємодією як іонів срібла з молекулами ДНК, так і атомарного срібла на поверхні частинок НС з молекулами ДНК. Оскільки такого роду взаємодія має мутагенний характер [19, 20] (порушує нативну структуру ДНК), то можна припустити, що текстури на плівці утворюються композиціями солей з молекулами ДНК у конформаційно зміненому стані.

Ці дані також свідчать про те, що зменшення площі з іонами срібла і його наноструктурами, очевидно, пов’язано з різним характером взаємодії з ДНК іонів Na^+ , іонів Ag^+ і його наночастинок.

Для з’ясування цих припущень нами були проведені дослідження в УФ-діапазоні розчинів, з яких готувалися плівки ДНК з іонами срібла і його наноструктур.

Інтенсивність взаємодії ДНК з іонами срібла в розчинах AgNO_3 і з наночастинками Ag, на нашу думку, визначається кількістю частинок (іонів/атомів), що беруть участь в асоціації з ДНК. Беручи до уваги, що металеве срібло має кубічну гранецентровану ґратку з сталою 4086 \AA , можна оцінити кількість атомів в одній наночастиці. Так, наночастинка діаметром 4 нм буде містити на поверхні розділу фаз приблизно 1500 атомів, тобто тільки третину від загальної кількості атомів частинки.

Враховуючи те, що нітрат срібла повністю дисоціює у водних розчинах, тобто іони Ag^+ при розчиненні повністю переходять у водну фазу, можна припустити, що при рівних масових концентраціях (в перерахунку на срібло) в розчині AgNO_3 знаходиться втричі більше реакційноздатних іонів срібла, ніж в розчині наночастинок.

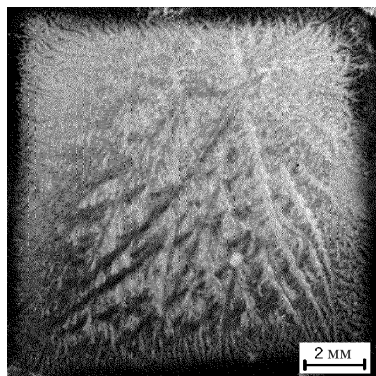


Рис. 2. Фотографія плівки, отриманої з розчину, що містить $0,03 \text{ M NaNO}_3 + \text{Na-ДНК}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{ВВ} = 30 \pm 2\%$

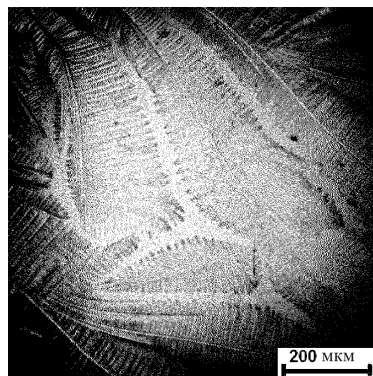


Рис. 5. Фотографія плівки, отриманої з розчину, що містить $0,03 \text{ M NaNO}_3 + \text{Na-ДНК}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{ВВ} = 30 \pm 2\%$

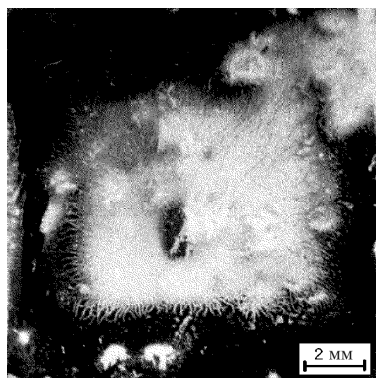


Рис. 3. Фотографія плівки, отриманої з розчину, що містить $5,05 \cdot 10^{-5} \text{ M AgNO}_3 + 0,03 \text{ M NaNO}_3 + \text{ДНК}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{ВВ} = 30 \pm 2\%$

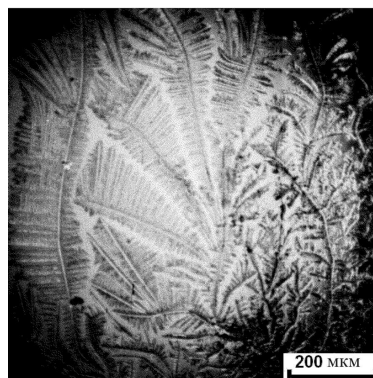


Рис. 6. Фотографія плівки, отриманої з розчину, що містить $5,05 \cdot 10^{-5} \text{ M AgNO}_3 + 0,03 \text{ M NaNO}_3 + \text{ДНК}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{ВВ} = 30 \pm 2\%$

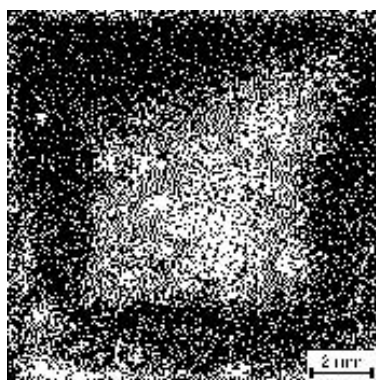


Рис. 4. Фотографія плівки, отриманої з суспензії, яка містить $15 \text{ мкг/мл Ag} + 0,03 \text{ M NaNO}_3 + \text{ДНК}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{ВВ} = 28$

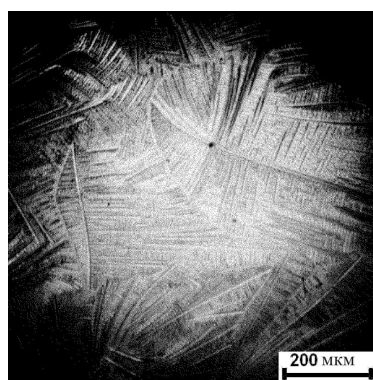


Рис. 7. Фотографія плівки, отриманої з суспензії, яка містить $15 \text{ мкг/мл Ag} + 0,03 \text{ M NaNO}_3 + \text{ДНК}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{ВВ} = 28$

Взаємодія іонів срібла в розчині і на поверхні наночастинки з молекулами ДНК, ймовірно, має однаковий донорно-акцепторний характер, тому положення смуг в УФ-спектрах поглинання можуть значною мірою залежати від поляризуючого впливу іонів на

хромофорні фрагменти ДНК. Очевидно, що сольватований іон Ag^+ в розчині має значно більшу поляризуючу дію на молекулу ДНК, ніж такий же іон, вбудований в кристалічну ґратку, заряд якого частково скомпенсований електронним газом.

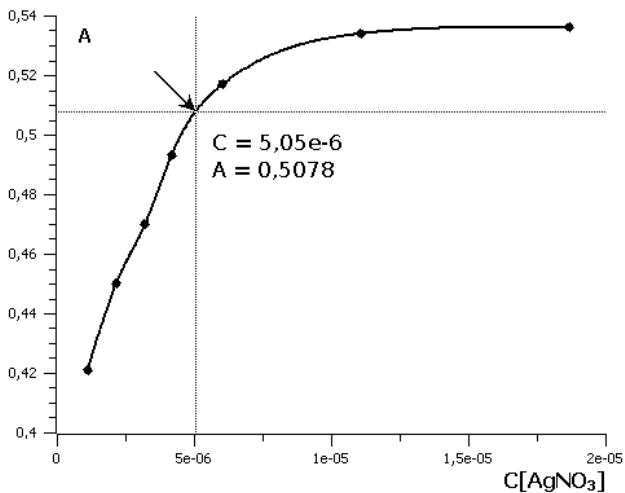


Рис. 8. Залежність оптичної щільності на довжині хвилі $\lambda = 260$ нм від концентрації Ag^+

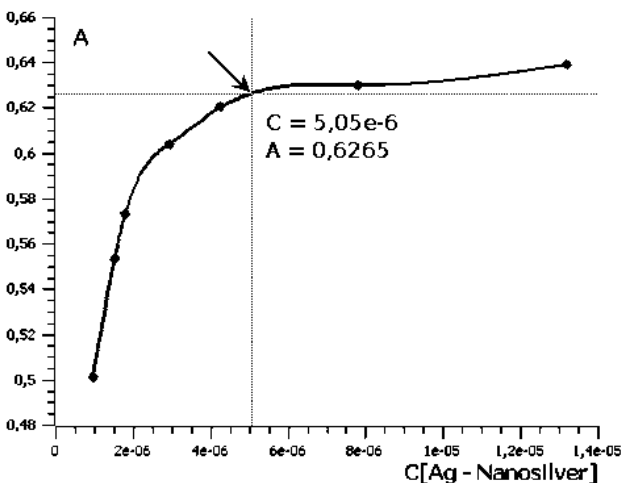


Рис. 9. Залежність оптичної щільності на довжині хвилі $\lambda = 260$ нм від концентрації НС

Як відомо, іони Na^+ стабілізують структуру ДНК в розчині, при цьому гіпохромізм при теплової денатурації становить 38–40%. Для дослідження структури ДНК нами була визначена залежність оптичної густини від концентрації Ag^+ і НС на довжині хвилі $\lambda = 260$ нм. На рис. 8 і рис. 9 наведено такі залежності. Можна бачити, що зі зростанням концентрації іонів срібла і НС інтенсивність смуги зростає, що свідчить про руйнування спіральної структури ДНК. На цих же графіках показані стрілками ті концентрації розчинів ДНК з іонами Ag^+ і суспензії ДНК з НС, з яких були отримані плівки. Розрахунок гіпохромного ефекту ДНК при цих концентраціях Ag^+ і НС дає величину 26–27%, що становить 70% від повного гіпохромного ефекту нативної ДНК.

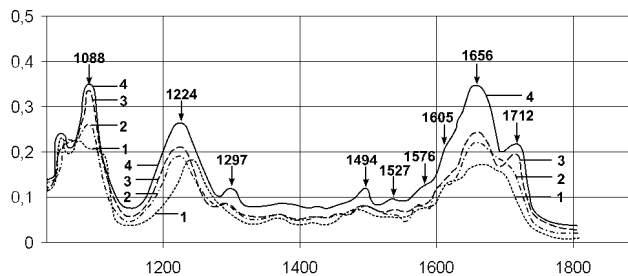


Рис. 10. ІЧ-спектри нативної ДНК. при різних відносних вологостях: 1 – 0%, 2 – 66%, 3 – 86%, 4 – 92%

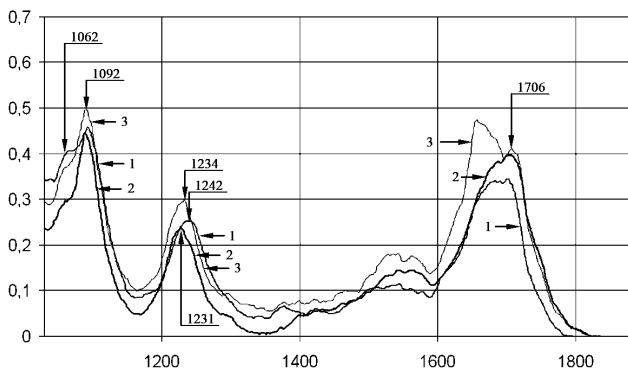


Рис. 11. ІЧ-спектри плівок ДНК з наночастинками срібла при різних відносних вологостях: 1 – 40%, 2 – 76%, 3 – 92%

Ці дані свідчать про те, що вторинна спіральна структура ДНК була порушена, що, імовірно, і привело до формування різних площ текстур. Добре відомо [17, 18], що при дегідратації ДНК відбувається руйнування спіральної структури Na-ДНК. Однак при зволоженні цих плівок до 92% ВВ спіральна структура відновлюється.

У разі формування плівок ДНК з розчинів з іонами срібла і суспензій з НС, іони срібла взаємодіють з дегідратованими групами ДНК, і відбувається подальше руйнування вторинної структури при дегідратації під впливом взаємодії іонів Ag^+ і НС з ДНК.

Для підтвердження такого механізму руйнування спіральної структури ДНК частинками НС нами були проведені дослідження ІЧ-спектрів плівок ДНК з наносріблом при різних вологостях. На рис. 10 і рис. 11 наведені інфрачервоні спектри Na-ДНК і Na-ДНК з наночастинками срібла.

Як видно, зі зволоженням плівок Na-ДНК переходить в В-форму ДНК при 92% відносної вологості, що визначається з формування маркерних смуг при 92% ВВ: утворення смуги при $\nu = 1712 \text{ cm}^{-1}$ свідчить про те, що азотисті основи сформували правильну міжпарну стопочну структуру В-форми ДНК, фор-

мування смуги антисиметричного коливання фосфатів при $\nu = 1224 \text{ см}^{-1}$ і дезоксірибозної смуги при $\nu = 1053 \text{ см}^{-1}$ також свідчить про те, що сформувався сахарофосфатний ланцюг В-форми ДНК.

Однак, як видно з рис. 11, при тій же вологості (92% ВВ) в плівці ДНК з НС антисиметричні коливання фосфатів проявилися на частоті $\nu = 1234 \text{ см}^{-1}$, що не характерно для В-форми ДНК; смуга з $\nu = 1712 \text{ см}^{-1}$ відсутня, відсутня також смуга з $\nu = 1053 \text{ см}^{-1}$. Ці дані свідчать про те, що спіральна структура ДНК зруйнована наносріблом. При цьому молекули води не відновлюють спіральну структуру ДНК. Мабуть, взаємодія води з ДНК (азотистими основами і фосфатними групами) значно слабкіше, ніж з НС. Останнє ствердження потребує подальших досліджень.

Таким чином, дані УФ- та ІЧ-спектроскопії свідчать про те, що характер сформованих дендритних структур (площ) визначається структурним станом ДНК.

1. H.Y. Zhou, J. Zhang, R.L. Yan, Q. Wang, L.Y. Fan, Q. Zhang, W.J. Wang, and Z.Q. Hu, *Annals of Surgery* **253**(5), 1033 (2011).
2. P. Suchetan, D. Zhengtao, D. Baoquan, Y. Hao, and L. Yan, *Angewandte Chemie International Edition* **49**(15), 2700 (2010).
3. X. Kai, H. Junran, Y. Zunzhong, Y. Yibin, and L. Yanbin, *Sensors* **9**(7), 5534 (2009).
4. W. Yang, C. Shen, Q. Ji, H. An, J. Wang, Q. Liu, and Z. Zhang, *Nanotechnology* **20**(8), 1 (2009).
5. K. Babu, M. Deepa, S.G. Shankar, and S. Rai, *The Internet Journal of Nanotechnology* **2**(2) (2008).
6. E. Sawosz, M. Grodzik, M. Zielinska, T. Niemiec, B. Olaszanska, and B. Chwalibog, *Archiv fur Geflugelkunde* **73**(3), 208 (2009).
7. P.V. Asharani, G.L.K. Mun, M.P. Hande, and S. Valiyaveetil, *ACS Nano* **3**(2), 279 (2009).
8. S.W.P. Wijnhoven, W.J.G.M. Peijnenburg, C.A. Herberts, W.I. Hagens, A.G. Oomen, E.H.W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Meent, S. Dekkers, W.H. Jong, M. Zijverden, A.J.A.M. Sips, and R.E. Geertsma, *Nanotoxicology* **3**(2), 109 (2009).
9. R. Vaidyanathan, K. Kalishwaralal, S. Gopalram, and S. Gurunathan, *Biotechnology Advances* **27**, 924 (2009).
10. H. Arakawa, J.F. Neault, and H.A. Tajmir-Riahi, *Biophysical Journal* **81**(3), 1580 (2001).
11. Ю.Ю. Тарасевич, *Усп. физ. наук* **174**(7), 779 (2004).
12. Ю.Ю. Тарасевич, О.П. Исакова, В.В. Кондухов, и А.В. Савицкая, *ЖТФ* **80**(5), 45 (2010).
13. Ю.Ю. Тарасевич, В.О. Константинов, и А.К. Аюпова, *Известия вузов. Северокавказский регион. Естествен-*

ные науки (Спецвыпуск. Математическое моделирование), 147 (2001).

14. Т.А. Яхно, А.Г. Санин, О.А. Санина, и В.Г. Яхно, *Биофизика* **56**(8), 1016 (2011).
15. G.M. Glibitskiy, *Biophysical Bulletin* **21**, 29 (2008).
16. Г.М. Глибицкий, і А.А. Красницька, Патент на винахід №86246 UA, Бюл. №7, 10.04.2009.
17. М.А. Семенов, Б.И. Сухоруков, и З.Я. Малеев, *Биофизика* **26**, 979 (1981).
18. М.А. Семенов, *Молекулярная генетика и биофизика* (Киевский государственный университет, Киев, 1984).
19. M.A. Siriver, and L.A. Loeb, *Science* **194**, 1434 (1976).
20. Э.Л. Андроникашвили, и Н.Г. Есипова, *Биофизика* **6**, 1022 (1982).

Одержано 03.02.12

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

Г.М. Глибицкий, В.В. Джелали, М.А. Семенов, А.Д. Рошаль, Д.М. Глибицкий, А.Ю. Волянский, Г.Г. Зебря

Р е з ю м е

Проведено исследование дегидратационной самоорганизации ДНК с ионами Na^+ , Ag^+ и наночастицами серебра. Показано, что характер формирования дендритных текстур (размер площади, занимаемой на поверхности пленки) определяется конформационным состоянием ДНК.

INTERACTION OF DNA WITH SILVER NANOPARTICLES

G.M. Glibitskiy¹, V.V. Jelali², M.O. Semenov¹, A.D. Roshal³, D.M. Glibitskiy¹, O.Yu. Volyanskiy², G.G. Zegrya⁴

¹A.Ya. Usikov Institute of Radiophysics and Electronics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine (12, Acad. Proscury Str., Kharkiv 61085, Ukraine; e-mail: glibit@ukr.net),

²I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Acad. of Med. Sci. of Ukraine (14, Pushkinska Str., Kharkiv 61057, Ukraine),

³V.N. Karazin Kharkiv National University, Institute for Chemistry (4, Svobody Sq., Kharkiv 61077, Ukraine),

⁴A.F. Ioffe Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences (26, Polytekhnicheskaya Str., St. Petersburg 194021, Russian Federation)

S u m m a r y

The dehydration self-organization of DNA with Na^+ and Ag^+ ions and silver nanoparticles has been studied. It has been shown that the character of the formation of dendritic textures (the size of the area occupied on the film surface) is governed by the conformational state of DNA.