

## ВЛИЯНИЕ pH НА СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ “МЯГКОЙ” БЕЛКОВОЙ КОРОНЫ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Ф. Д. Давыдов, А. А. Кулешова, А. М. Салецкий\*

УДК 535.343;535.372;620.3

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2022-89-2-230-237>

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,  
Москва, Россия; e-mail: sam@physics.msu.ru

(Поступила 29 ноября 2021)

Исследованы спектрально-флуоресцентные характеристики молекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) в “мягкой” короне наночастиц серебра (Ag-НЧ) при различных значениях pH. Установлено формирование комплексов БСА + Ag-НЧ. Определены константы связи комплекса ( $K_{as}$ ) и биомолекулярные константы скорости тушения флуоресценции БСА ( $K_q$ ) для различных pH. Зависимости  $K_{as}$  и  $K_q$  от pH являются немонотонными с максимумами при pH 6.0. Количество сайтов связывания (коэффициент Хилла  $n$ ) и толщина мягкой короны БСА ( $\Delta d$ ) также максимальны при pH 6.0. При больших и меньших pH (относительно pH 6.0) эти параметры уменьшаются. Вариация параметров взаимодействия БСА и Ag-НЧ обусловлена изменением конформационных модификаций белка (содержания  $\alpha$ -спирали) и микроокружения Tyr- и Trp-остатков белка в мягкой короне (гидрофобности белка).

**Ключевые слова:** белок, бычий сывороточный альбумин, наночастица, серебро, спектры поглощения и флуоресценции, pH.

The spectral and fluorescent characteristics of bovine serum albumin (BSA) molecules in the soft crown of silver nanoparticles (AgNP) were studied at different pH values. The formation of BSA + AgNP complexes was established. The coupling constants of the complex ( $K_{ass}$ ) and the biomolecular rate constants of the BSA fluorescence quenching ( $K_q$ ) were determined for different pH values. The dependences of  $K_{ass}$  and  $K_q$  on pH are nonmonotonic with maxima at pH 6.0. The number of binding sites (Hill coefficient ( $n$ )) and the thickness of the BSA soft crown ( $\Delta d$ ) are also maximal at pH 6.0. At higher and lower pH values (relative to pH 6.0), these parameters decrease. Variations in the parameters of interaction between BSA and AgNP are due to changes in the conformational modifications of the protein (content of the  $\alpha$ -helix) and the microenvironment of Tyr and Trp protein residues in the soft crown (hydrophobicity of the protein).

**Keywords:** protein, bovine serum albumin, nanoparticle, silver, absorption and fluorescence spectra, pH.

**Введение.** В последние годы наночастицы (НЧ) благородных металлов привлекают внимание исследователей во всех областях науки благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам. Среди металлических НЧ наночастицы серебра (Ag-НЧ) вызывают интерес вследствие широкого применения в первую очередь в биомедицине [1]. Ag-НЧ обладают широким спектром антимикробных свойств против патогенов, в том числе бактерий и вирусов [2, 3]. В настоящее время НЧ применяются при терапии рака, что развивает новую область противоопухолевой медицины — наномедицину рака [4]. По сравнению с традиционными противоопухолевыми средствами металлические НЧ могут быть использованы как новые терапевтические агенты или носители в комбинации с лекарственными средствами, обеспечивающие их целенаправленную доставку [5]. Среди наночастиц Ag-НЧ — идеальный вариант для использования в качестве противоопухолевого лечебного сред-

---

## INFLUENCE OF pH ON THE SPECTRAL-LUMINESCENT CHARACTERISTICS OF THE SOFT PROTEIN CROWN OF SILVER NANOPARTICLES

F. D. Davidov, A. A. Kuleshova, A. M. Saletsky\* (M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; e-mail: sam@physics.msu.ru)

ства [5]. Помимо противомикробных и противораковых свойств Ag-НЧ также могут быть использованы в других медицинских применениях, например при восстановлении костей [6], а также в качестве добавки в стоматологические материалы или адьювантов в вакцине.

Когда НЧ попадают в биологическую систему, они покрываются ионами, белками, липидами и другими биомолекулами. Образуется так называемая “белковая корона”, которая обычно изменяет физико-химические свойства как НЧ, так и белков [7]. Белковая корона состоит из двух частей — мягкой и жесткой [8]. Мягкая корона состоит из большого количества белков с низким сродством, тогда как жесткая — из редких белков с высокой аффинностью [8]. Белковая корона существенно влияет на всасывание, накопление и последующее поведение НЧ в клетках, снижает их токсичность [8]. Кроме того, любой вид конформационных изменений в белке под действием НЧ может изменить его функцию. В связи с этим понимание механизмов взаимодействия НЧ с белками имеет первостепенное значение. Особый интерес представляют основные транспортные белки системы кровообращения — сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА).

Известно, что структура БСА изменяется в зависимости от pH [9, 10]. В условиях кислой среды вблизи изоэлектрической точки БСА начинает разворачиваться. Дальше от изоэлектрической точки БСА принимает протяженную структуру, становясь почти линейной. Эти изменения могут повлиять на функцию БСА, например, если БСА адсорбируется на поверхности НЧ и выносятся из кровотока в среду с новым pH или если БСА принимает новую структуру при адсорбции на поверхности НЧ. В свою очередь изменения pH среды могут приводить к агрегации Ag-НЧ [11].

Исследования белков проводятся с использованием различных методов. Так, при изучении влияния pH на характеристики альбуминов и их взаимодействие с молекулами красителей использовались спектроскопия комбинационного рассеяния света и флуоресценция [12—14]. При исследовании белковой короны НЧ наиболее распространен метод флуоресценции [15—18].

В данной работе исследованы спектрально-люминесцентные характеристики “мягкой” белковой короны и взаимодействия молекул белка с Ag-НЧ. Для определения размеров комплексов белок–Ag-НЧ использован метод динамического рассеяния света. В качестве белка выбран БСА как основной переносчик жирных кислот, продуктов обмена веществ, таких как тироксин, билирубин, эндогенные и экзогенные соединения и т. д., который обладает исключительным свойством обратимо связывать огромное количество соединений [19]. Исследования проведены для различных pH растворов. Это связано с тем, что хотя большая часть человеческого тела имеет pH 7.4, некоторые органы работают при очень разных pH [20]. Например, в желудке очень кислая среда с pH 2.0, тогда как в желудочно-кишечном тракте pH ближе к 8.0, pH альвеолярных мешков в легких ~4.5. Следовательно, изучение белковой короны при различных pH имеет решающее значение при определении безопасности и эффективности Ag-НЧ.

**Эксперимент.** НЧ серебра изготовлены методом химического восстановления ионов серебра по методике [21]. Для приготовления растворов молекул БСА (Sigma-Aldrich) и Ag-НЧ с различными pH применялись буферные растворы:



Для изучения спектральных характеристик БСА приготовлены растворы БСА ( $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л) и Ag-НЧ ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) с pH 3.5—8.0.

Для формирования мягкой короны смешивались исходные растворы и получались растворы БСА+Ag-НЧ при концентрациях белка  $2.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5.0 \cdot 10^{-5}$  и  $7.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л и концентрациях Ag-НЧ  $2 \cdot 10^{-10}$ ,  $4 \cdot 10^{-10}$  и  $6 \cdot 10^{-10}$  моль/л. При используемых концентрациях БСА формируется мягкая корона НЧ [15]. Для сравнения приготовлены растворы БСА без Ag-НЧ концентраций  $2.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  и  $7.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Растворы БСА+Ag-НЧ и растворы БСА имели pH 3.5, 4, 5, 6, 7 и 8.

Размеры комплексов, образующихся при взаимодействии БСА при различных pH среды с Ag-НЧ, определялись методом корреляционной спектроскопии рассеянного света на корреляционном спектрометре Photocor Complex (Россия) при комнатной температуре. Исследования спектров поглощения растворов проведены с помощью спектрофотометра SOLAR PB 2201 (Беларусь). Измерения стационарных спектров флуоресценции растворов проводились с помощью спектрофлуориметра SOLAR PB 2203 (Беларусь). Синхронные спектры флуоресценции зарегистрированы в области 250—350 нм при сдвигах  $\Delta\lambda = 15$  и 60 нм. Полученные спектры обработаны программой OriginPro 8.5.

Измерения времени жизни флуоресценции образцов проводились с использованием прибора Simple Tau 140 (Becker & Hickl, Германия), работающего в режиме счета фотонов. Флуоресценцию БСА возбуждали излучением пикосекундного полупроводникового лазера EPLED 280 (Edinburg Photonics, Ирландия)  $\lambda = 280$  нм с длительностью импульса 870 пс. Кривые кинетической флуоресценции обработаны с помощью программы SPImage (Becker & Hickl, Германия). Погрешность измерения  $\pm 0.05$  нс. Кривая затухания флуоресценции аппроксимировалась несколькими экспонентами:

$$F(t) = \sum_{i=1}^N A_i e^{-t/\tau_i}, \quad (1)$$

где  $N$  — число экспонент;  $t$  — время;  $\tau_i$  — время жизни флуоресценции;  $A_i$  — амплитуда.

Для анализа влияния pH среды и взаимодействия с НЧ на кинетические характеристики флуоресценции БСА определялось среднее время жизни флуоресценции:

$$\tau_0 = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i}. \quad (2)$$

Измерения проводились при температуре 295 К.

**Результаты и их обсуждение.** Влияние pH на размеры мягкой короны НЧ. Методом динамического рассеяния света определены гидродинамические диаметры Ag-НЧ  $d$  и комплексов БСА+Ag-НЧ  $d_c$  для различных pH. Из экспериментальных данных определены толщины слоев мягкой короны  $\Delta d = (d_c - d)/2$  для исследуемых концентраций БСА и различных pH. На рис. 1 представлены зависимости  $d$  и  $\Delta d$  от pH. Видно, что зависимость  $d$  от pH немонотонная. В области pH 3.5—5.0 при увеличении pH наблюдается рост  $d$ , обусловленный агрегацией Ag-НЧ. Увеличение pH в области 5.0—8.0 сопровождается уменьшением  $d$  с достижением значения  $d = 6$  нм, т. е. рост pH от 5.0 до 8.0 вызывает разрушение агрегатов Ag-НЧ. Зависимость толщины  $\Delta d$  мягкой короны БСА от pH немонотонная с максимумом при pH 6.0. Рост слоя мягкой короны БСА обусловлен его конформационной модификацией при изменении pH. Способность альбуминов подвергаться обратимым конформационным модификациям при изменении pH, которые характеризуются изменениями как вторичной, так и третичной структуры, описана в [22] и подтверждена многочисленными исследованиями с привлечением различных методик. Так, в [23] методом кругового дихроизма установлено, что при увеличении pH от 3.5 до 4.5 содержание  $\alpha$ -спирали БСА снижается с 62 до 55 %. При увеличении pH от 4.5 до 6.0 содержание  $\alpha$ -спирали увеличивается от 55 до 68 %. В диапазоне pH 6—7 содержание  $\alpha$ -спирали

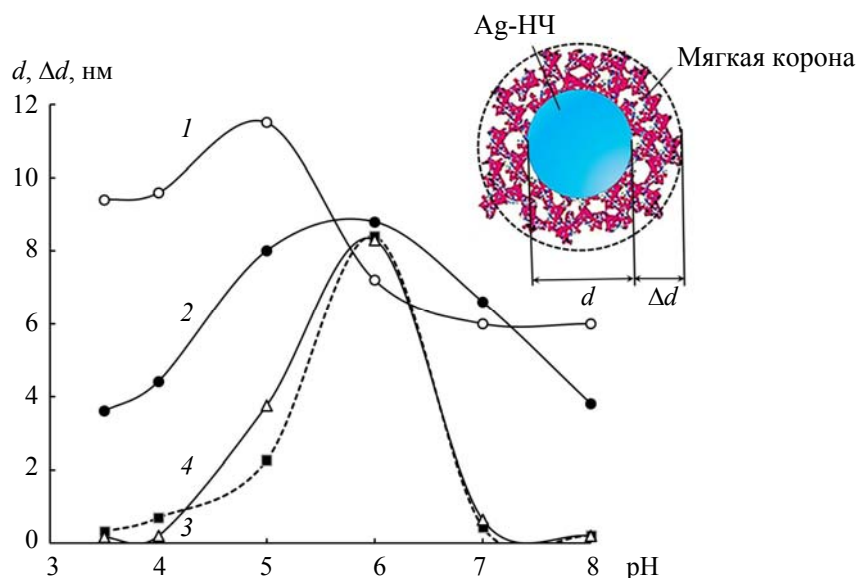
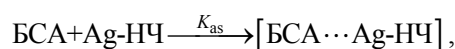


Рис. 1. Зависимости диаметра  $d$  частиц серебра (1), слоя  $\Delta d$  мягкой короны БСА (2—4) от pH; концентрация Ag-НЧ  $2 \cdot 10^{-10}$  моль/л; концентрация БСА  $2.5 \cdot 10^{-5}$  (2),  $5 \cdot 10^{-5}$  (3) и  $7.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л (4); на вставке — комплекс Ag-НЧ+мягкая корона БСА

достигает максимального значения и при дальнейшем увеличении pH снижается. Таким образом, максимальная толщина слоя мягкой короны НЧ наблюдается при максимальном содержании  $\alpha$ -спирали в БСА.

*Спектры поглощения БСА короны при различных pH. Образование комплекса БСА+Ag-НЧ.* Как показывают исследования спектров поглощения БСА при разных pH, положение максимумов практически не меняется. В области pH 5–7 длина волны максимумов поглощения постоянна, а оптическая плотность  $D$  с ростом pH изменяется медленно в пределах  $\Delta D = 0.03$ , что указывает на стабильность молекулярных конформаций БСА. Добавление Ag-НЧ в растворы БСА увеличивает поглощение в исследуемой области pH. На рис. 2, а представлены спектры поглощения БСА для разных концентраций Ag-НЧ. Видно, что с увеличением концентрации Ag-НЧ растет интенсивность поглощения, что обусловлено образованием комплекса между БСА и НЧ в основном состоянии при адсорбции молекул БСА на поверхности Ag-НЧ.

Оценим эффективность этого процесса. Равновесие для образования комплекса между БСА и Ag-НЧ описывается схемой



где  $K_{\text{as}} = \frac{\alpha}{(1-\alpha)C_{\text{Ag-НЧ}}}$  — константа связи комплекса (кажущаяся степень ассоциации),  $\alpha$  — степень ассоциации.

$K_{\text{as}}$  рассчитывали с помощью уравнения Бенеси—Гильдебранда [24]:

$$\frac{1}{D - D_0} = \frac{1}{D_C - D_0} + \frac{1}{K_{\text{as}}(D_C - D_0)C_{\text{Ag-НЧ}}}, \quad (3)$$

где  $D$  — оптическая плотность растворов БСА, содержащих различные концентрации Ag-НЧ, в максимуме спектров поглощения;  $D_0$  — оптическая плотность растворов БСА;  $D_C$  — оптическая плотность комплекса БСА+Ag-НЧ, соответствующая связыванию в комплекс всех Ag-НЧ.

С использованием экспериментальных значений  $D_0$  и  $D$  с помощью (3) методом наименьших квадратов вычислены  $K_{\text{as}}$  для разных pH. На рис. 2, б представлена зависимость  $K_{\text{as}}(\text{pH})$  с максимумом при pH 6.

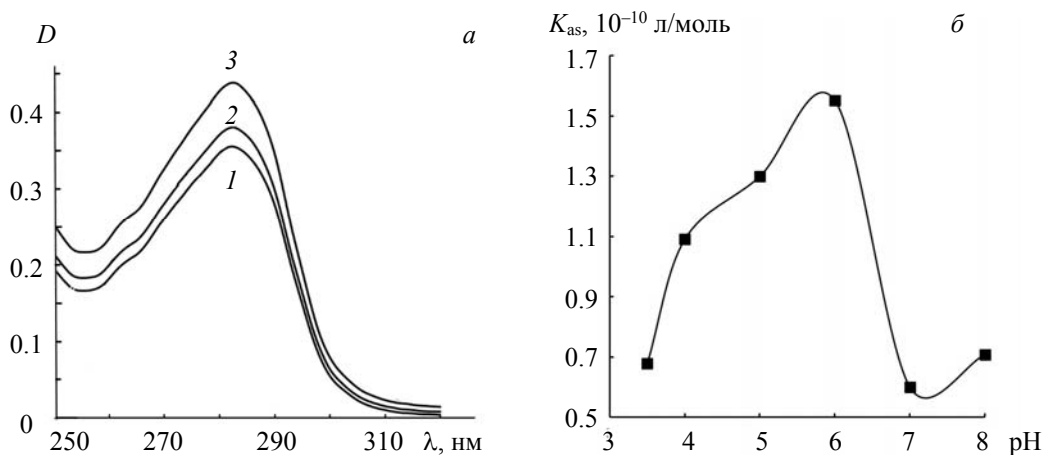


Рис. 2. Спектры поглощения (1—3) растворов БСА, содержащих Ag-НЧ концентраций  $2 \cdot 10^{-10}$  (1),  $4 \cdot 10^{-10}$  (2) и  $6 \cdot 10^{-10}$  моль/л (3), pH 6 (а) и зависимость  $K_{\text{as}}$  от pH (б); концентрация БСА  $2.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л

*Спектрально-флуоресцентные характеристики молекул БСА в мягкой короне Ag-НЧ.* Исследованы спектры флуоресценции растворов БСА, не содержащих и содержащих Ag-НЧ. Собственная флуоресценция белков обусловлена существованием трех эндогенных аминокислот — триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe). Наибольшую интенсивность флуоресценции имеют Trp и Tyr, наименьшую — Phe. Из-за очень низкого квантового выхода флуоресценции Phe его спектр из-

лучения практически не наблюдается. Таким образом, собственная флуоресценция белка в основном зависит от остатков Трп и Туг.

На рис. 3, *a* представлены спектры флуоресценции БСА в растворе с рН 3.5 и разными концентрациями Аг-НЧ. Видно, что с увеличением концентрации Аг-НЧ наблюдаются тушение флуоресценции и изменение положения максимума спектра. При изменении рН растворов происходит смещение спектров флуоресценции как буферных растворов БСА, так и растворов, содержащих Аг-НЧ. На рис. 3, *б* приведены зависимости длины волны максимума спектра флуоресценции  $\lambda_{\max}$  от рН среды. Как видно, они имеют *S*-образный вид. В области  $3.5 < \text{pH} < 4.0$  длина волны максимума спектра флуоресценции БСА  $\lambda_{\max}$  не изменяется (кривая 1). При  $4.0 < \text{pH} < 6.0$  наблюдается длинноволновый сдвиг  $\lambda_{\max}$ . При  $6.0 < \text{pH} < 8.0$  происходит незначительный длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции БСА. *S*-образный сдвиг спектра флуоресценции БСА наблюдается и при добавлении Аг-НЧ (кривая 2). Для анализа изменений спектральных характеристик флуоресценции БСА при добавлении Аг-НЧ определен сдвиг спектров флуоресценции БСА, обусловленный добавлением Аг-НЧ  $\Delta\lambda = \lambda_{\text{АгНЧ}} - \lambda_{\max}$ , где  $\lambda_{\text{АгНЧ}}$  и  $\lambda_{\max}$  — длины волн максимума спектра флуоресценции БСА в растворах с Аг-НЧ и в буферных растворах. Как видно из зависимости  $\Delta\lambda$  от рН (кривая 3), при  $3.5 < \text{pH} < 6.0$  добавление в раствор БСА Аг-НЧ вызывает сдвиг спектра флуоресценции БСА в коротковолновую область, при этом максимальный сдвиг спектра флуоресценции происходит при рН 5. В области  $6.0 < \text{pH} < 8.0$  наблюдается длинноволновый сдвиг. Известно [25], что спектры флуоресценции растворов БСА указывают на изменение гидрофобности белка: красный или синий сдвиг максимума спектра флуоресценции показывает, что гидрофобность аминокислотных остатков БСА уменьшается или увеличивается. Поэтому зависимость  $\Delta\lambda$  от рН (рис. 3, *б*, кривая 3) можно объяснить следующим образом. При  $3.5 < \text{pH} < 6.0$  добавление Аг-НЧ в раствор БСА вызывает увеличение гидрофобности аминокислотных остатков, достигая максимума при рН 5.0. При рН  $> 6.0$  гидрофобность аминокислотных остатков уменьшается. Таким образом, рН может изменить микросреду молекул мягкой белковой короны.

Для анализа изменения микроокружения Туг- и Трп-остатков БСА исследованы синхронные спектры флуоресценции БСА при разностях между длиной регистрации и возбуждения флуоресценции  $d\lambda = 15$  и 60 нм. Спектральное изменение при  $d\lambda = 15$  нм показывает участие Туг во взаимодействии НЧ. Изменения в синхронных спектрах флуоресценции при  $d\lambda = 60$  нм указывают на конформационные изменения в БСА из-за изменений в микроокружении аминокислоты Трп.

На рис. 3, *a* показаны синхронные спектры флуоресценции БСА ( $2.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) для  $d\lambda = 60$  и 15 нм при рН 6. Видно, что интенсивность флуоресценции Туг меньше, чем Трп.

Спектры синхронной флуоресценции БСА для  $d\lambda = 60$  и 15 нм измерены при разных рН, а также при добавлении Аг-НЧ. Из спектров определены интенсивности в максимуме  $I_{\text{Трп}}$  и  $I_{\text{Туг}}$ . На рис. 4 представлены зависимости отношения интенсивности свечения  $I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}}$  от рН, а также  $I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}}$  от рН при добавлении Аг-НЧ. В области  $3.5 < \text{pH} < 5.0$  с увеличением рН наблюдается рост отношения  $I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}}$  как для буферных растворов БСА, так и для растворов БСА с Аг-НЧ, т. е. с ростом рН в короне Аг-НЧ увеличивается концентрация Трп. В области  $5.0 < \text{pH} < 8.0$  изменение отношения  $I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}}$  с увеличением рН незначительное. Зависимость разницы отношений  $(I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}})_{\text{НЧ}} - I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}}$  от рН показывает, что с ростом рН от 3.5 до 6.0 увеличивается концентрация Трп в формировании флуоресценции короны Аг-НЧ. При дальнейшем росте рН собственная флуоресценция БСА в короне Аг-НЧ наблюдается при постоянном соотношении концентраций  $I_{\text{Трп}}$  и  $I_{\text{Туг}}$ .

Изменения в зависимостях  $I_{\text{Трп}}$  и  $I_{\text{Туг}}$  от рН объясняются изменением гидрофобности среды. Гидрофобность остатков как Туг, так и Трп снижается в области рН 3.5—6.0 и увеличивается в области 6.0—8.0 [26]. Изменения гидрофобности Трп при различных рН выше, чем для Туг, поэтому зависимость  $(I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}})_{\text{АгНЧ}} - I_{\text{Трп}}/I_{\text{Туг}}$  от рН имеет вид кривой 3 на рис. 4.

Как отмечалось выше, с ростом концентрации Аг-НЧ наблюдается тушение флуоресценции БСА (рис. 3, *a*, кривые 1—4). Для определения количественных характеристик данного процесса воспользуемся уравнением Штерна—Вольмера

$$I_0/I = 1 + K_{\text{SV}}C_{\text{Аг-НЧ}} = 1 + K_q\tau C_{\text{Аг-НЧ}}, \quad (4)$$

где  $I_0$  и  $I$  — интенсивности флуоресценции БСА в отсутствие и при наличии Аг-НЧ;  $C_{\text{Аг-НЧ}}$  — концентрация Аг-НЧ;  $K_{\text{SV}}$  — константа Штерна—Вольмера;  $K_q$  — бимолекулярная константа скорости тушения флуоресценции БСА;  $\tau$  — среднее время жизни возбужденного состояния молекул белка.

Из (4) видно, что изменение отношения интенсивностей флуоресценции БСА от концентрации Ag-НЧ является линейной зависимостью с коэффициентом наклона  $K_q\tau$ . С учетом  $I_0$ ,  $I$  и (4) методом наименьших квадратов вычислены  $K_q\tau$  для разных pH и бимолекулярные константы скорости тушения флуоресценции исследуемых систем  $K_q$  (экспериментальная зависимость  $\tau$  от pH представлена на рис. 4, кривая 4).

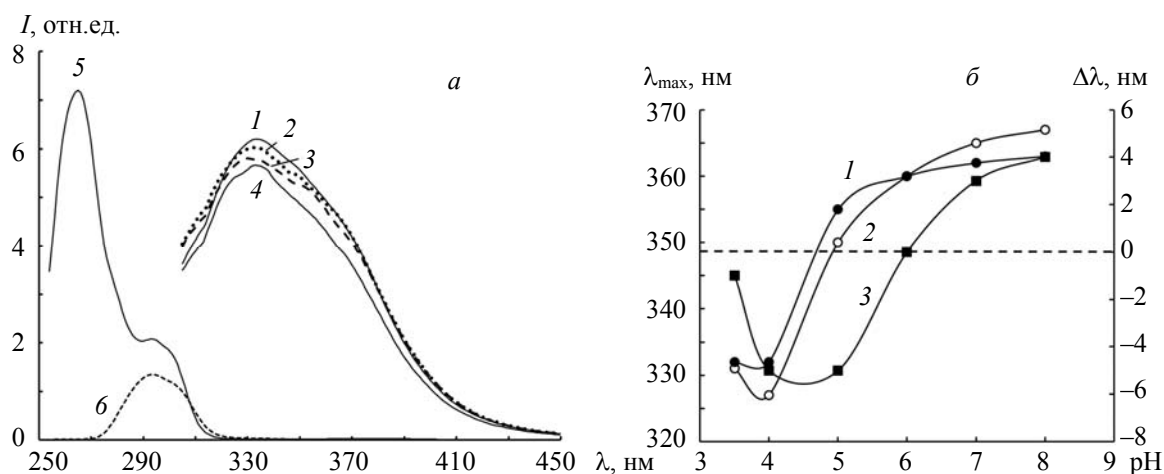


Рис. 3. Спектры флуоресценции растворов БСА (1—4) при содержаниях Ag-НЧ 0 (1),  $2 \cdot 10^{-10}$  (2),  $4 \cdot 10^{-10}$  (3) и  $6 \cdot 10^{-10}$  моль/л (4) (pH 3.5,  $C_{\text{БСА}} = 2.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л); синхронные спектры флуоресценции БСА (pH 6,  $C_{\text{БСА}} = 2.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) для  $d\lambda = 60$  (5) и 15 нм (6) (a); зависимости максимумов спектров флуоресценции  $\lambda_{\text{max}}$  растворов БСА (1) и БСА с добавками Ag-НЧ (2) концентрации  $2 \cdot 10^{-10}$  моль/л (2) и сдвигов спектров флуоресценции  $\Delta\lambda$  (3) от pH (б)

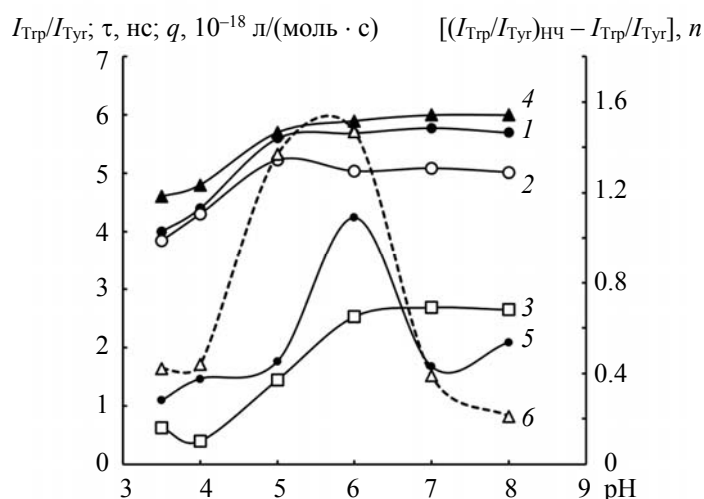


Рис. 4. Зависимости отношений интенсивностей синхронных спектров флуоресценции БСА концентрации  $2.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л  $I_{\text{Tp}}/I_{\text{Tyr}}$  ( $I_{\text{Tp}}$  и  $I_{\text{Tyr}}$  — интенсивности свечения при  $d\lambda = 60$  и 15 нм) для растворов БСА без Ag-НЧ (1) и при наличии Ag-НЧ концентрации  $2 \cdot 10^{-9}$  моль/л (2), разности  $(I_{\text{Tp}}/I_{\text{Tyr}})_{\text{НЧ}} - I_{\text{Tp}}/I_{\text{Tyr}}$  (3),  $\tau$  (4),  $K_q$  (5) и  $n$  (6) от pH

Как видно из рис. 4 (кривая 5), зависимость  $K_q(\text{pH})$  немонотонная с максимумом при pH 6.0. Изменение  $K_q$  происходит в диапазоне  $0.5 \cdot 10^{18}$ — $4 \cdot 10^{18}$  л/(моль · с), т. е. измеренные константы скорости тушения флуоресценции намного выше максимальных констант бимолекулярных скоростей, контролируемых диффузией для различных тушителей и биополимеров (порядок констант скоростей  $\sim 2.0 \cdot 10^{10}$  л/(моль · с)), т. е. образуется комплекс БСА и Ag-НЧ в основном состоянии.

У БСА выявлены три основных сайта взаимодействия альбумина с лигандами (Садлоу I, Садлоу II и сайт III), а также несколько вторичных сайтов связывания жирных кислот [27]. Анализ кристаллической структуры показывает, что сайты связывания лекарств расположены в субдоменах ПА и ША [28]. В субдомене ПА присутствует большая гидрофобная полость. Геометрия кармана в ПА сильно отличается от таковой в ША. БСА имеет два триптофановых фрагмента (Trp-135 и Trp-214), расположенных в субдоменах IA и ПА [29].

В связи с тем что в белке существуют несколько сайтов связывания с Ag-НЧ, константа связывания ( $K$ ) и количество сайтов связывания ( $n$ ) могут быть определены из уравнения для статического тушащего взаимодействия [30]:

$$\log \frac{I_0 - I}{I} = \log K + n \log C_{\text{Ag-НЧ}}, \quad (5)$$

где  $I_0$  и  $I$  — интенсивность флуоресценции БСА в отсутствие и при наличии Ag-НЧ концентрации  $C_{\text{Ag-нч}}$ ,  $n$  — коэффициент Хилла (количество сайтов связывания).

Для коэффициента Хилла справедливы соотношения:  $n > 1$  (положительный, когда связывание одной НЧ с активным (связывающим) центром белка увеличивает сродство к Ag-НЧ остальных активных центров БСА);  $n < 1$  (отрицательный, наоборот, уменьшает сродство);  $n = 1$  (не наблюдается кооперативного эффекта).

Из экспериментальных данных по тушению флуоресценции БСА Ag-НЧ на основании (5) с помощью метода наименьших квадратов определены значения  $n$  для различных pH. На рис. 4 (кривая б) представлена зависимость  $n(\text{pH})$ , которая имеет немонотонный характер с максимумом при pH ~5—6. При этом  $n < 1$  для областей  $3.5 < \text{pH} < 4.0$  и  $7.0 < \text{pH} < 8.0$ , что явно меньше числа активных центров связывания на белке. Это свидетельствует об отрицательной кооперативности в системе БСА—Ag-НЧ [30]: связывание молекулой БСА первой молекулы наномаркера изменяет конфигурацию молекулы белка таким образом, что ухудшает (затрудняет) связывание белком следующих (или других) молекул наномаркера. При  $5.0 < \text{pH} < 6.0$   $n > 1$ , т. е. происходит связывание одной НЧ с активным (связывающим) центром белка, при этом увеличивается сродство к Ag-НЧ остальных активных центров БСА. В связи с тем что металлические НЧ, такие как золото и серебро, при взаимодействии с сывороточным альбумином изменяют гидрофобность сайта связывания [31], таким сайтом связывания является субдомен ПА. При этом увеличивается сродство к Ag-НЧ остальных активных центров БСА.

**Закключение.** Результаты экспериментального исследования спектрально-флуоресцентных характеристик молекул бычьего сывороточного альбумина в мягкой короне наночастиц серебра при различных pH указывают на формирование комплекса БСА+Ag-НЧ. При pH 6.0 имеют место максимальные значения константы связи комплекса, а также бимолекулярной константы скорости тушения флуоресценции бычьего сывороточного альбумина и количество сайтов связывания — коэффициент Хилла  $n$ . При больших и меньших pH относительно pH 6.0 эти параметры взаимодействия бычьего сывороточного альбумина и наночастиц серебра уменьшаются. Зависимости толщины мягкой короны бычьего сывороточного альбумина от pH имеют аналогичный вид (увеличение в области pH 3.5—6.0 и уменьшение в области 6.0—8.0). Вариация параметров взаимодействия бычьего сывороточного альбумина и наночастиц серебра обусловлена изменением конформационных модификаций белка (содержания  $\alpha$ -спирали) и микроокружения Туг- и Тгр-остатков белка в мягкой короне (гидрофобности белка).

Работа выполнена в рамках деятельности научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова “Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина”.

- [1] L. Xu, Y. Wang, J. Huang, C. Chen, Z. Wang, H. Xie. *Theranostics*, **10**, N 20 (2020) 8996—9031
- [2] R. Salomoni, P. Léo, A. Montemor, B. Rinaldi, M. Rodrigues. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, N 10 (2017) 115—121
- [3] S. Saad. *Biomedicine*, **41**, N 2 (2021) 458—464
- [4] J. Shi, P. W. Kantoff, R. Wooster, O. C. Farokhzad. *Nat. Rev. Cancer*, **17** (2017) 20—37
- [5] R. Machado, A. Pironi, R. Alves, A. Dragalzew, I. Dalberto, M. Chorilli. *Curr. Med. Chem.*, **26** (2019) 2108—2146

- [6] **E. Marsich, F. Bellomo, G. Turco, A. Travan, I. Donati, S. Paoletti.** *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, (2013) 1799—1807
- [7] **I. Lynch, K. A. Dawson.** *Nano Today*, **3**, N 40 (2008) 1—2
- [8] **N. Singh, C. Marets, J. Boudon, N. Millot, L. Saviot, L. Maurizi.** *Nanoscale Adv.*, **3** (2021) 1209—1229
- [9] **R. Li, Z. W. Wu, Y. Wang, L. Ding, Y. Wang.** *Biotechnol. Rep.*, **9** (2016) 46—52
- [10] **E. S. Gorodnichev, A. A. Kuleshova, O. I. Volkova, A. M. Saletsky.** *Laser Phys.*, **31**, N 6 (2021) 065601
- [11] **P. Béteky, A. Rónavári, N. Igaz, B. Szerencsés, I. Y. Tóth, I. Pfeiffer, M. Kiricsi, Z. Kónya.** *Int. J. Nanomed.*, **14** (2019) 667—687
- [12] **I. M. Vlasova, A. M. Saletsky.** *J. Mol. Struct.*, **936** (2009) 220—227
- [13] **I. M. Vlasova, A. A. Vlasov, A. M. Saletsky.** *J. Mol. Struct.*, **984** (2010) 332—338
- [14] **I. M. Vlasova, E. M. Bukharova, A. A. Kuleshova, A. M. Saletsky.** *Curr. Appl. Phys.*, **11** (2011) 1126—1132
- [15] **J. Mariam, P. M. Dongre, D. C. Kothari.** *J. Fluoresc.*, **21** (2011) 2193—2199
- [16] **M. Liu, Y. Li, L. Li, X. Sun, J. Li, R. Lu.** *Журн. прикл. спект.*, **88**, № 1 (2021) 166 [**M. Liu, Y. Li, L. Li, X. Sun, J. Li, R. Lu.** *J. Appl. Spectr.*, **88** (2021) 153—165]
- [17] **G. Wang, Y. Lu, H. Hou, Y. Liu.** *RSC Adv.*, **7** (2017) 9393—9401
- [18] **M. Waghmare, B. Khade, P. Chaudhari, P. Dongre.** *J. Nanopart. Res.*, **20**, N 7 (2018) 1—21
- [19] **G. J. Quinlan, G. S. Martin, T. W. Evans.** *Hepatology*, **41** (2005) 1211—1219
- [20] **P. Watson, A. T. Jones, D. J. Stephens.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57** (2005) 43—61
- [21] **G. K. Vertelov, Y. A. Krutyakov, O. V. Efremenkova, A. Yu. Olenin, G. V. Lisichkin.** *Nanotechnology*, **19**, N 35 (2008) 355707
- [22] **J. F. Foster.** In: *Some Aspects of the Structure and Conformational Properties of Serum Albumin, in Albumin Structure, Functions and Uses*, Eds. V. M. Rosenoer, M. Oratz, M. A. Rothschild, Oxford, Pergamon Press (1977) 53—84
- [23] **Z. Chi, B. Hong, X. Ren, K. Cheng, Y. Lu, X. Liu.** *Spectrosc. Lett.*, **51**, N 6 (2018) 279—286
- [24] **W. Misiuk, M. Jozefowicz.** *J. Mol. Liquids*, **202** (2015) 101—106
- [25] **A. Varlan, M. Hillebrand.** *Molecules*, **15**, N 6 (2010) 3905—3919
- [26] **F. Ma, C. Sun, W. Zhou, C. Xu, J. Zhou, G. Wang, X. D. Yang.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectr.*, **97**, N 6 (2012) 885—891
- [27] **G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade.** *Mol. Pharmacol.*, **11** (1975) 824—832
- [28] **A. Sulkowska.** *J. Mol. Struct.*, **614** (2002) 227—232
- [29] **X. Feng, Z. Lin, L. Yang, C. Wang, C. Bai.** *Talanta*, **47**, N 5 (1998) 1223—1229
- [30] **И. М. Власова, А. А. Власов, А. А. Кулешова, Ю. А. Гордеева, А. М. Салецкий.** *Журн. физ. химии*, **94**, № 1 (2020) 114—120
- [31] **S. Naveenraj, S. Anandan.** *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **14** (2013) 53—71