

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

## **ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ**

**Кочнева Е. М.**

*студентка V курса химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова  
г. Москва, Россия  
katerina80103@gmail.com;*

**Созарукова М. М.**

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза  
функциональных материалов и переработки минерального сырья Института  
общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук,  
г. Москва, Россия  
s\_madinam@bk.ru;*

**Проскурнина Е. В.**

*д. м. н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной  
биологии Медико-генетического научного центра имени академика  
Н.П. Бочкова, г. Москва, Россия  
proskurnina@gmail.com;*

*Перспективы биомедицинского применения наночастиц  $\text{CeO}_2$  делают необходимым анализ их взаимодействия с биомолекулами, в том числе с белками. Сывороточный альбумин человека (САЧ) является одним из наиболее важных белков плазмы крови и содержит в структуре природные флуорофоры — тирозин и триптофан. Целью работы был анализ влияния наночастиц  $\text{CeO}_2$  (3 нм) на флуоресцентные свойства САЧ. Получено дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции белка в присутствии нанодисперсного диоксида церия. Рассчитаны константы Штерна-Фольмера и скорости тушения флуоресценции, а также параметры связывания (константа и число сайтов связывания).*

**Ключевые слова:** наночастицы диоксида церия; нанозимы; сывороточный альбумин человека; транспортные свойства; флуоресценция

## **FLUORESCENCE PROPERTIES OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN THE PRESENCE OF CERIUM OXIDE NANOPARTICLES**

**Kochneva E. M.**

*5th year student of the Faculty of Chemistry  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
katerina80103@gmail.com;*

**Sozarukova M. M.**

*Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory for the  
advanced materials synthesis and minerals processing  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia  
s\_madinam@bk.ru;*

**Proskurnina E. V.**

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of  
Molecular Biology  
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia  
proskurnina@gmail.com;*

*The prospects of biomedical applications of CeO<sub>2</sub> nanoparticles make it necessary to analyze their interaction with biomolecules, including proteins. Human serum albumin (HSA) is one of the most important blood plasma proteins containing natural fluorophores — tyrosine and tryptophan. The aim of the work was to analyze the effect of CeO<sub>2</sub> nanoparticles (3 nm) on the fluorescent properties of HSA. A dose-dependent decrease in protein fluorescence intensity in the presence of cerium dioxide nanoparticles was obtained. The Stern-Volmer constant and fluorescence quenching rate constant, as well as binding parameters (binding constant and number of binding sites) were calculated.*

**Key words:** *cerium dioxide nanoparticles; nanozymes; human serum albumin; transport properties; fluorescence*

Наночастицы CeO<sub>2</sub> являются представителем нового класса нанозимов, неорганических материалов с ферментоподобной активностью. Перспективы биомедицинского применения нанодисперсного CeO<sub>2</sub> делают необходимым детальный анализ его взаимодействия с биомолекулами, в том числе с сывороточным альбумином человека (САЧ) [1]. САЧ выполняет в плазме множество функций, среди которых антиоксидантная и транспортная. В структуре САЧ находятся природные флуорофоры — тирозин и триптофан. Таким образом, целью работы был анализ флуоресцентных свойств сывороточного альбумина человека в присутствии наночастиц CeO<sub>2</sub>.

#### **Материалы и методы исследования.**

**Модификация наночастиц CeO<sub>2</sub> сывороточным альбумином человека.** В работе использовали золь CeO<sub>2</sub>, полученный термогидролизом водного раствора гексанитратоцерата(IV) аммония [2]. Готовили серию золь диоксида церия ( $c_{\text{исх.}} = 6.5$  мкМ), модифицированного САЧ ( $c_{\text{исх.}} = 65$  мкМ) [1]. Были получены золи САЧ: CeO<sub>2</sub> со следующими соотношениями компонентов (по молям): 1:1, 2:5, 1:5, 1:10 и 1:20.

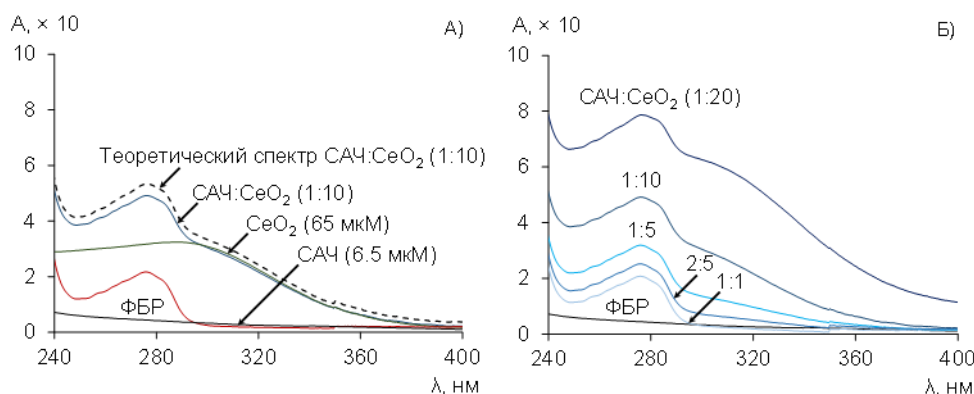
#### **Физико-химический анализ золь CeO<sub>2</sub>, модифицированных САЧ.**

Рентгенофазовый анализ наночастиц CeO<sub>2</sub> проводили с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (CuK $\alpha$ -излучение, геометрия  $\theta$ – $2\theta$ ). Для расшифровки рентгенограмм использовали банк данных ICDD PDF2. Концентрацию золя CeO<sub>2</sub> определяли термогравиметрическим методом. Средний гидродинамический диаметр частиц коллоидного раствора CeO<sub>2</sub> оценивали методом динамического рассеяния света с помощью анализатора Photocor Complex. Физико-химическое взаимодействие наночастиц CeO<sub>2</sub> с альбумином исследовали спектрофотометрическим и спектрофлуориметрическим методами. Для регистрации спектров поглощения золь CeO<sub>2</sub>, в том числе модифицированных САЧ, и индивидуального раствора

белка использовали спектрофотометр Cary 4000 (Agilent). Измерение флуоресценции исследуемых образцов проводили на приборе FluoroLog 3 (Horiba Jobin Yvon). По данным флуоресцентного анализа рассчитывали константы Штерна-Фольмера и скорости тушения флуоресценции, с помощью модифицированного уравнения Хилла — константу и число сайтов связывания нанодисперсного  $\text{CeO}_2$  с САЧ.

**Результаты и обсуждение.** В результате синтеза по методике, основанной на термогидролизе гексанитратоцерата(IV) аммония [2], был получен электростатически стабилизированный золь нанодисперсного диоксида церия. Концентрация полученного золя, по данным термогравиметрического анализа, составила 23 г/л (0.13 М по  $\text{CeO}_2$ ). Размер частиц  $\text{CeO}_2$ , определенный по соотношению Шеррера, был равен 3 нм. Величина среднего гидродинамического диаметра наночастиц  $\text{CeO}_2$  соответствовала 10–11 нм.

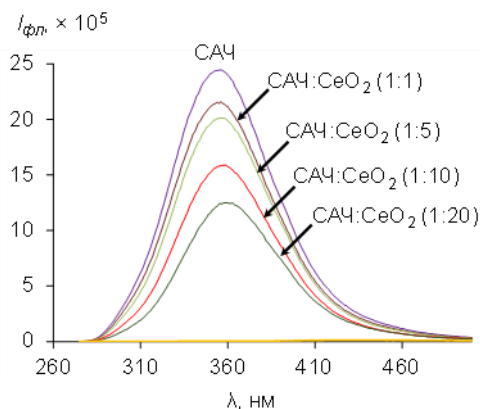
После синтеза и физико-химического анализа наночастиц  $\text{CeO}_2$  проводили функционализацию их поверхности сывороточным альбумином человека — основным белком плазмы крови. Спектры поглощения зольей  $\text{CeO}_2$ , в том числе модифицированных САЧ, и индивидуального белка приведены на рис. 1А, Б.



**Рисунок. 1.** А) Экспериментальные спектры поглощения золя  $\text{CeO}_2$ , в том числе модифицированного альбумином (САЧ: $\text{CeO}_2$ , 1:10, 6.5:65 мкМ), раствора индивидуального белка, и теоретический спектр золя САЧ: $\text{CeO}_2$  (1:10) (математическая сумма спектров 6.5 мкМ САЧ и 65 мкМ золя  $\text{CeO}_2$ ). Б) Спектры поглощения золя  $\text{CeO}_2$ , модифицированного САЧ в различных мольных соотношениях (САЧ: $\text{CeO}_2$  1:1, 1:5, 2:5, 1:10, 1:20).

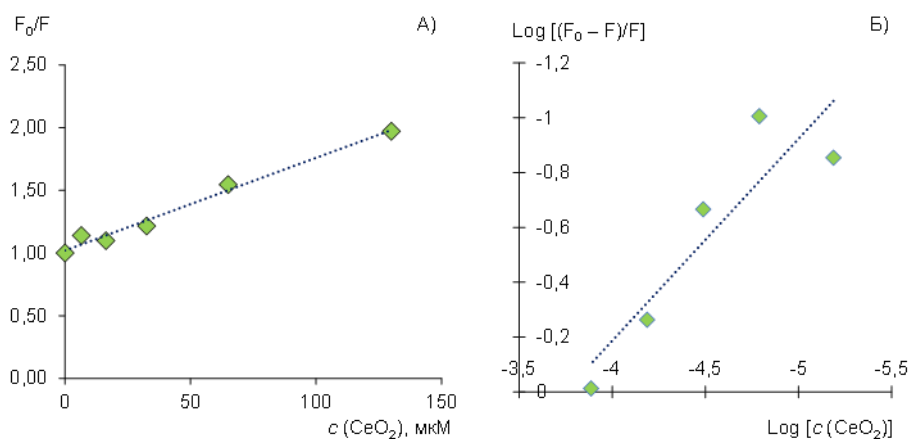
Спектр золя САЧ: $\text{CeO}_2$  (1:10) имеет максимум поглощения при длине волны, соответствующей амплитуде оптической плотности индивидуального раствора САЧ (275 нм), плечо на спектре обусловлено наночастицами  $\text{CeO}_2$  (рис. 1А). Это подтверждается теоретическим спектром золя САЧ: $\text{CeO}_2$  (1:10), являющегося математической суммой спектров немодифицированных наночастиц  $\text{CeO}_2$  и стабилизатора (рис. 1А). Полученные данные позволяют предположить функционализацию наночастиц  $\text{CeO}_2$  альбумином. Из рис. 1Б видно, что изменения спектров зольей САЧ: $\text{CeO}_2$  в зависимости от мольных соотношений отражают вклад нанодисперсного диоксида церия и белка.

Сывороточный альбумин человека содержит в своей структуре природные флуорофоры — тирозин и триптофан. Так, на следующем этапе работы регистрировали спектры флуоресценции зольей, выбранная длина волны возбуждения ( $\lambda_{ex} = 260$  нм), соответствовала тирозин-триптофановой флуоресценции САЧ (рис. 2).



**Рисунок 2.** Спектры флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 260$  нм) зольей САЧ:  $\text{CeO}_2$  в различных соотношениях (по молям).

Титрование САЧ при комнатной температуре различными концентрациями наночастиц  $\text{CeO}_2$  приводило к дозозависимому тушению флуоресценции белка. Зависимость снижения интенсивности флуоресценции САЧ от концентрации нанодисперсного  $\text{CeO}_2$  была построена в координатах Штерна-Фольмера и модифицированного уравнения Хилла (рис. 3А, Б).



**Рисунок 3.** Изменение флуоресценции САЧ ( $\lambda_{ex} = 260$  нм) при различных концентрациях наночастиц  $\text{CeO}_2$ , мкМ в координатах: А) Штерна-Фольмера ( $F_0/F = ((0.0074 \pm 0.0005) \times c(\text{CeO}_2, \text{мкМ}) + (1.02 \pm 0.06))$ ,  $r = 0.991$ ), Б) модифицированного уравнения Хилла ( $\text{Log}((F_0 - F)/F) = (1.12 \pm 0.04) \times \text{Log}[c(\text{CeO}_2, \text{мкМ})] + (4.4 \pm 0.2)$ ).

С помощью полученных зависимостей были рассчитаны константы Штерна-Фольмера ( $K_{SV} = 7.39 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) и скорости тушения флуоресценции ( $k_q = 7.39 \times 10^{11} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ). Полученные данные позволили сделать

предположение о том, что снижение интенсивности аналитического сигнала альбумина при связывании с наночастицами  $\text{CeO}_2$  происходит по механизму статистического тушения. С использованием модифицированного уравнения Хилла были определены константа связывания ( $K_b = 5.73 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ) и число сайтов связывания ( $n = 0.74$ ). Полученные в настоящей работе значения параметров связывания отличаются от литературных данных. Это можно объяснить природой нанодисперсного диоксида церия, физико-химические характеристики (размер частиц, морфология,  $\zeta$ -потенциал и др.) которого, как известно, существенно зависят от метода синтеза и определяют его свойства.

**Заключение.** В настоящей работе исследовано влияние наночастиц  $\text{CeO}_2$  на флуоресцентные свойства одного из наиболее важных белков плазмы крови — сывороточного альбумина человека. Получено дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции альбумина с увеличением концентрации золя  $\text{CeO}_2$  (3 нм) при длине волны возбуждения 260 нм. Рассчитанные значения константы Штерна-Фольмера и скорости тушения флуоресценции позволили предположить, что связывание белка с наночастицами  $\text{CeO}_2$  происходит по механизму статистического тушения. Выявлено, что на параметры связывания с белком оказывает влияние природа наночастиц  $\text{CeO}_2$ .

**Финансирование работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-00251).

#### Список литературы

1. Roudbaneh, S. Z. K. Albumin binding, antioxidant and antibacterial effects of cerium oxide nanoparticles / S. Z. K. Roudbaneh, et al. // *J. Mol. Liq.* — 2019. — V. 296. — P. 111–839.
2. Shcherbakov, A. B. Facile method for fabrication of surfactant-free concentrated  $\text{CeO}_2$  sols / A. B. Shcherbakov, et al. // *Mater. Res. Express.* — 2017. — V. 4, № 5. — P. 055008.
3. Добрецов, Г. Е. Альбуминовый флуоресцентный тест: результаты клинических исследований / Г. Е. Добрецов, Т. И. Сырейщикова, Н. В. Смолина, Г. В. Родоман, М. Г. Узбеков // *Эфферентная и физико-химическая медицина.* — 2009. — Т. 1. — С. 16–26.