

УДК 557.612.822.615

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ И НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ГЕМОГЛОБИНА

Г.В. Максимов², Т.Г. Сазонтова¹, С.С. Коваленко², Н.А. Браже², А.А. Семенова³,
Е.Ю. Паршина², Л.В. Кузьмичева⁴, В.В. Шутова⁴, А.И. Юсипович², О.В. Сосновцева⁵,
Е.А. Гудилин³, Ю.В. Архипенко¹

(¹факультет фундаментальной медицины, ²биологический факультет, ³факультет наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва (РФ); ⁴биологический факультет МГУ имени Огарева, Саранск (РФ); ⁵медицинский факультет университета в Копенгагене (Дания))

Спектроскопия комбинационного рассеяния в сочетании с использованием наночастиц серебра (НЧС) является чувствительным методом оценки состояния гемоглобина в биомедицине. Показано, что возможности его применения при инъекции в организм НЧС ограничены за счет побочных факторов, приводящих к изменению способности гемоглобина переносить O₂. Применение наноструктурированных подложек из серебра является более эффективным и нативным способом исследования конформации гемоглобина, не требующим инъекции НЧС в организм.

Ключевые слова спектроскопия комбинационного рассеяния (Раман-спектроскопия), гемоглобин, коллоидные частицы серебра, наноструктурированные подложки из серебра.

Известно, что наночастицы проникают через гематоэнцефалический барьер и циркулируют в крови, накапливаясь в клетках органов и тканей. Применение металлических наночастиц (НЧ) в биомедицине исследуется в двух основных направлениях:

- 1) изучение действия НЧ на свойства клеток, тканей и организма в целом;
- 2) применение наночастиц в биомедицине для терапии и диагностики за счет усиления флуоресценции и комбинационного рассеяния (КР) света клеток и биомолекул [1, 2].

В зависимости от состава, размера и формы наночастиц может быть выбрано направление исследования.

Наночастицы серебра (НЧС) представляют особый интерес, поскольку могут применяться в биологии и медицине для неспецифического воздействия на свойства молекул и клеток, а также в спектро- и микроскопии для усиления интенсивности КР [3, 4]. Так, в спектро- и микроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) используются эффекты плазмонного резонанса и переноса заряда, возникающие на поверхности НЧС и приводящие к усилению интенсивности КР в 10⁶–10⁸ раз [5]. Однако побочные эффекты от воздействия НЧС на конформацию гемопорфирина гемоглобина и способность переносить кислород в

организме до конца не исследованы, что требует разработки иных нанобиотехнологических подходов, таких как регистрация сигнала КР крови, размещенной на наноструктурированных подложках (НСП) из серебра [6, 7].

Цель исследования заключалась в изучении конформации гемопорфирина и способности гемоглобина переносить кислород при введении животным наночастиц серебра, а также способности этих частиц усиливать КР при использовании наноструктурированных подложек.

Объект и методы исследования

Исследовали три группы животных:

- 1) контрольная;
- 2) крысы, получавшие внутривентральные инъекции воды;
- 3) крысы, получавшие внутривентральные инъекции раствора серебра.

НЧС получали путем восстановления нитрата серебра гидросиламингидрохлоридом в щелочной среде при комнатной температуре [8]. Для оценки размеров НЧС использовали метод абсорбционной спектроскопии и динамическое светорассеяние [8]. Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра «Hitachi» (Japan) в диапазоне от 400 до 800 нм. Для регистрации динамического светорассеяния использовали прибор «Zetasizer Nano».

Используемые НЧС содержали мелкие (10 нм) и крупные (30–40 нм) фракции.

Изменения конформации гемопорфирина гемоглобина исследовали методом спектроскопии комбинационного рассеяния [2, 9]. Капилляр (диаметр 2 мм) с суспензией эритроцитов помещали в ячейку спектрометра и фокусировали на нем луч лазера ($\lambda = 473$ нм, $P = 18\text{--}20$ мВт). Для анализа конформации использовали определенные характерные полосы спектра КР, характеризующие число комплексов дезоксигемоглобина (д-Гб) и его способность связывать и сбрасывать O_2 , а также число комплексов оксигемоглобина (о-Гб) и его способность сбрасывать и связывать O_2 [2, 10, 11].

КР эритроцитов, фиксированных на наноструктурированных подложках серебра (НСП, [6, 7]) регистрировали на спектрометре «IN VIA BASIS» фирмы «Renishaw» (Великобритания) (возбуждение монохроматическим светом с длиной волны 532 нм, мощностью 100 мВт, объектив 50×) с помощью CCD-детектора (1024×256 пикселей с охлаждением до -70°C) с решеткой 1800 штр/мм. Микроскоп класса «Leica» использовали для визуального выбора места регистрации КР. Для усиления КР использовали НСП с покрытием на основе серебра, на которые наносили образцы крови.

Результаты исследования и их обсуждение

При инъекции животному НЧС регистрировали следующие параметры, характеризующие изменения

конформации гемопорфирина гемоглобина (Гб): количество комплексов оксигемоглобина, сродство Гб к O_2 , а также способность Гб связывать и сбрасывать O_2 . Установлено, что при инъекциях животным НЧС в течение одного месяца достоверно изменяется содержание комплексов Гб- O_2 (рис. 1, а): в обеих группах содержание комплексов Гб- O_2 в 2–3 раза меньше комплексов Гб. Известно, что в венозной крови млекопитающих содержание Гб- O_2 составляет около 60% от всего Гб. Поскольку в экспериментах используют венозную кровь, при инъекции НЧС животным эритроциты, вероятно, сбрасывают в ткани меньше O_2 , чем в контроле. При инъекциях НЧС в течение шести месяцев было обнаружено достоверное уменьшение количества о-Гб (рис. 1, б), что может свидетельствовать:

- 1) об уменьшении степени оксигенации гемоглобина в эритроцитах в капиллярах легких;
- 2) о высокой степени сброса O_2 в капиллярах тканей в связи с увеличением потребления O_2 клетками.

При инъекциях НЧС животным в течение одного месяца мы не обнаружили изменений способности Гб связывать O_2 (рис. 2, а), однако происходит увеличение способности гемоглобина сбрасывать O_2 (рис. 2, б), что приводит к уменьшению сродства Гб к O_2 (рис. 2, в).

Вероятно, при инъекциях НЧС в тканях облегчается сброс O_2 . Кроме того, увеличение относительного содержания комплексов о-Гб, не связано с уменьшением выделения O_2 в ткани. Происходит

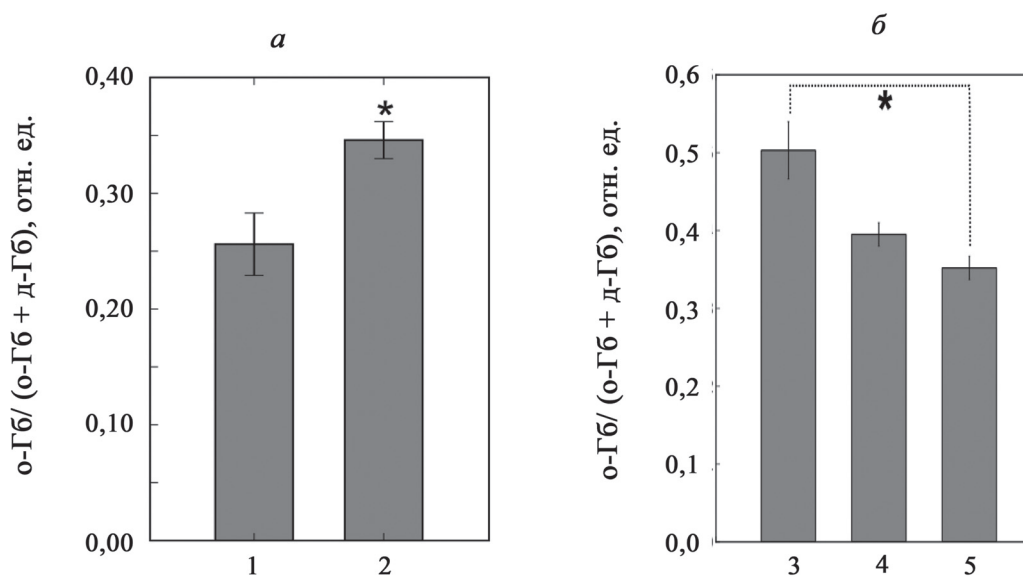


Рис. 1. Изменение содержания комплексов оксигемоглобина в крови крыс при инъекции НЧС в течение одного месяца (а) и шести месяцев (б): 1 – контрольный раствор (группа 1), 2 – НЧС (группа 2), 3 – контрольная группа (группа 3), 4 – инъекция контрольного раствора (группа 4), 5 – НЧС (группа 5). На оси ординат указано содержание комплексов оксигемоглобина по отношению к общему количеству комплексов окси- и дезоксигемоглобина, отн. ед. ($p < 0,05$)

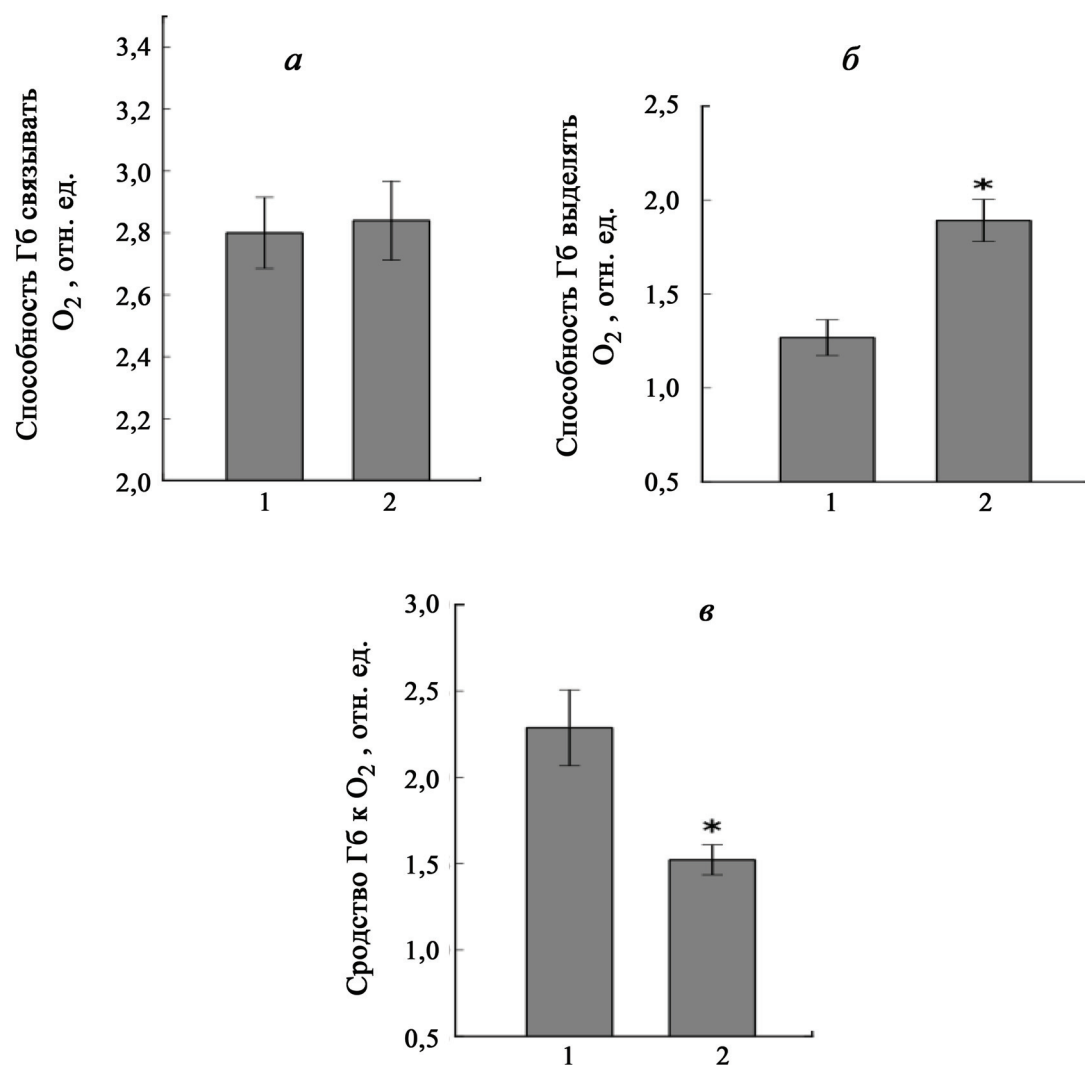


Рис. 2. Изменение способности гемоглобина связывать (*а*) и сбрасывать (*б*) кислород, а также сродство гемоглобина к O₂ (*в*) эритроцитов крыс при инъекции контрольного раствора (группа 1) и НЧС (группа 2) в течение одного месяца. На оси ординат указана способность гемоглобина связывать O₂, отн. ед.

оптимальное насыщение гемоглобина эритроцитов кислородом, возможно, вследствие изменения физико-химических свойств мембраны и более легкого проникновения O₂ в клетку. В частности, увеличение проникновения O₂ в эритроциты могло быть вызвано уменьшением вязкости плазматической мембраны. Выдвинутое предположение согласуется с обнаруженным нами фактом (данные не представлены) увеличения устойчивости эритроцитов крыс к гемолизу. Возможно, что увеличение способности Гб сбрасывать O₂ и снижение сродства к O₂ при инъекции НЧС связано с локальным увеличением в капиллярах тканей концентрации ионов H⁺ и молекул CO₂, уменьшающих сродство Гб к O₂. Более вероятно, что усиление способности Гб сбрасывать O₂ и, как следствие, уменьшение сродства Гб к O₂ на фоне неизменной способности Гб

связывать O₂ свидетельствует об отсутствии повреждающего действия НЧС: в капиллярах легких кислород связывается на Гб так же, как и в контрольной группе, но при этом в тканях кислород легче сбрасывается с Гб.

Напротив, инъекция НЧС в течение шести месяцев существенно меняет кислород-связывающие свойства гемоглобина. Так, способность Гб связывать O₂ достоверно увеличивается, а способность Гб сбрасывать O₂ не изменяется ни в одной из исследуемых групп (4 и 5) (рис. 3, *а*, *б*). Вероятно, увеличение способности Гб связывать O₂ является компенсаторной реакцией на снижение поступления O₂ в эритроциты. При инъекциях НЧС животному наблюдается увеличение сродства Гб к O₂ (рис. 3, *в*), что обусловлено увеличением способности Гб связывать O₂. Итак, при инъекциях НЧС

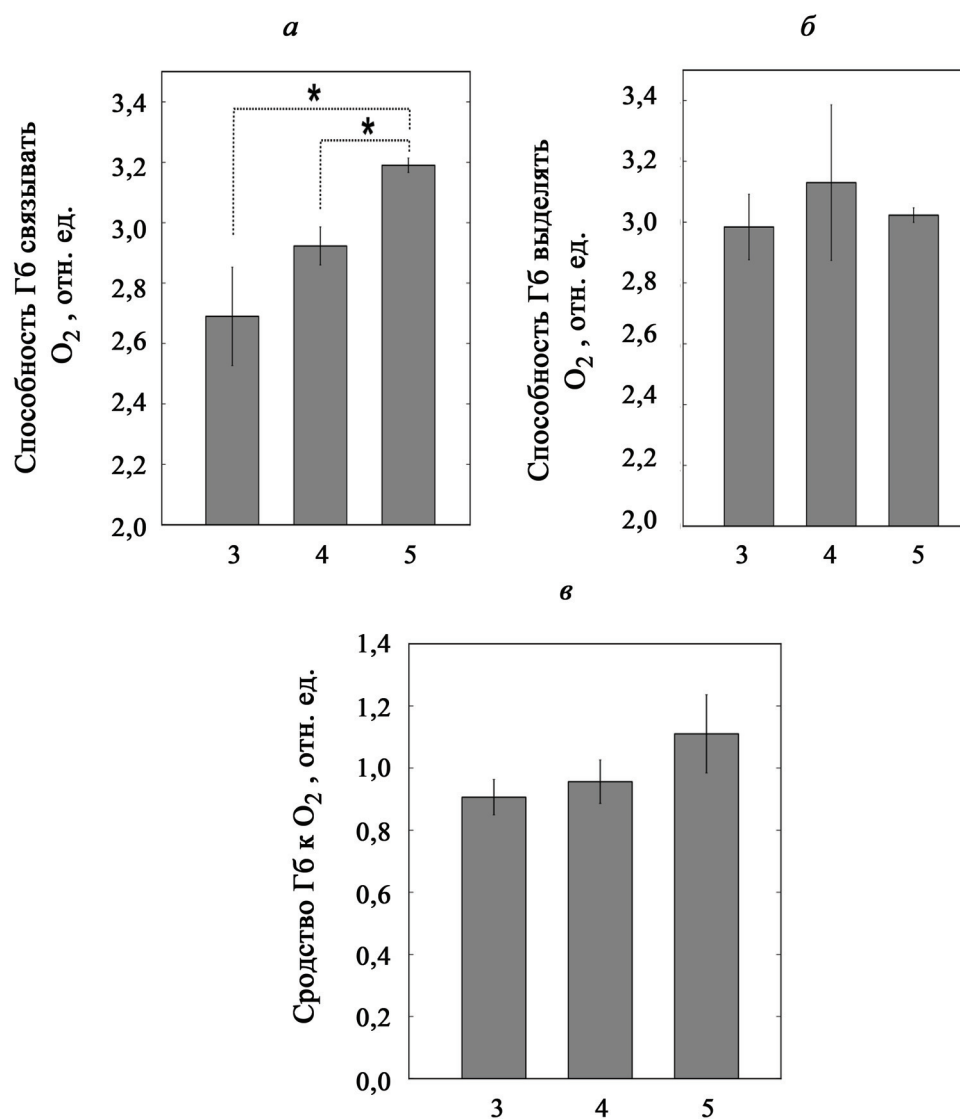


Рис. 3. Изменение способности гемоглобина связывать (а) и сбрасывать (б) кислород, а также сродство гемоглобина к O₂ (в) эритроцитов крыс при инъекции контрольного раствора (группа 1) и НЧС (группа 2) в течение шести месяцев. На оси ординат указана способность гемоглобина связывать O₂, отн. ед.

животному в течение шести месяцев существенно меняется конформация гемоглобина, и O₂ лучше связывается с Гб. Возможно, это связано с изменением в крови концентрации молекул-модуляторов или с появлением в крови новой формы Гб с другими O₂-связывающими свойствами.

Таким образом, введение в кровь НЧС для усиления КР и диагностики состояния гемопорфирина гемоглобина сопряжено с рядом побочных эффектов. В заключительной серии экспериментов мы показали, что изготовленные НСП серебра позволяют усилить сигнал гемопорфирина крови даже при ее существенном разбавлении (в 10³ и 3·10³ раз) (рис. 4). Эти данные позволяют сформировать новую оригинальную методику зондирования

состояния гемоглобина крови без инъекции НЧС целому животному.

Таким образом, применение спектроскопии КР и НЧС это чувствительный метод оценки свойства гемоглобина, который можно использовать в биомедицинских исследованиях и диагностике ряда заболеваний [11, 12]. Однако возможность применения НЧС при инъекции в организм ограничены: возрастает способность Гб связывать O₂, что может привести к уменьшению парциального давления O₂ в тканях и гипоксии клеток. Очевидно, применение НСП является более эффективным и нативным методом исследования конформации гемоглобина без инъекции НЧС в кровь животного [3–7].

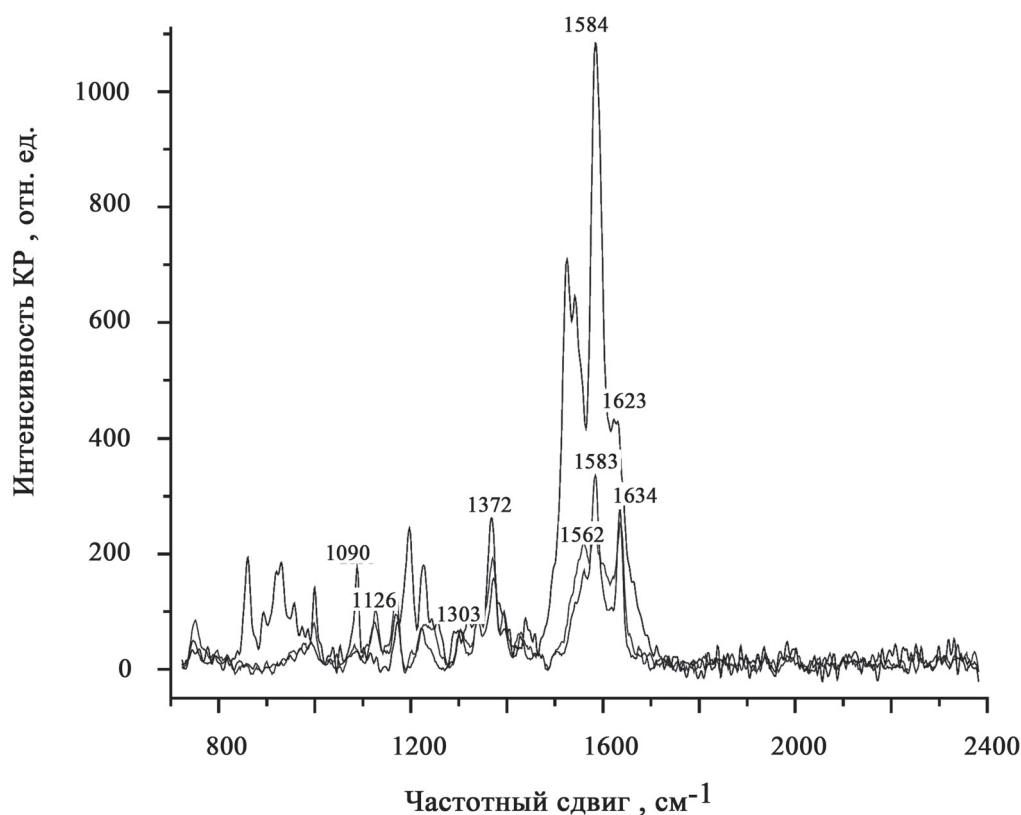


Рис. 4. Спектры КР гемопорфирина гемоглобина крови на наноструктурированной серебряной подложке. По оси абсцисс – длина волны, см^{-1} ; по оси ординат – интенсивность КР, отн.ед.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancherri S., Mc-Naughton D. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 387. P. 1691.
2. Carey P.R. *Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies.* N.Y., 1982. P. 262.
3. Semenova A., Brazhe N.A., Parshina E.Y., Ivanov V.K., Maksimov G.V., Goodilin E.A. // *Plasmonics.* 2014. Vol. 9. N 2. P. 227.
4. Parshina E., Sarycheva A., Yusipovich A., Brazhe N., Goodilin E., Maksimov G. // *Las. Phys. Lett.* 2013. Vol. 10. N 7. P. 075607.
5. Brazhe N., Parshina E., Khabatova V., Semenova A., Brazhe A., Yusipovich A., Sarycheva A., Churin A., Goodilin E., Maksimov G., Sosnovtseva O. // *J. of Raman Spectroscopy.* 2013. Vol. 44. N 5. P. 686.
6. Semenova A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Lebedev V.A., Goldt A.E., Sosnovtseva O.V., Savilov S.V., Egorov A.V., Brazhe A.R., Parshina E.Y., Luneva O.G., Maksimov G.V., Tretyakov Y.D. // *J. of Materials Chemistry.* 2012. Vol. 22. N 47. P. 24530.
7. Semenova A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Lebedev V.A., Goldt A.E., Sosnovtseva O.V., Savilov S.V., Egorov A.V., Brazhe A.R., Parshina E.Y., Luneva O.G., Maksimov G.V., Tretyakov Y.D. // *J. Mat. Chem.* 2012. Vol. 22. P. 24530.
8. Leopold N., Lendl B. // *J. Phys. Chem. B.* 2003. Vol. 107. P. 5723.
9. Соловьев К.Н., Гладков Л.Л., Старухин А.С., Шкирман С.Ф. *Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния.* Минск, 1985. С. 245.
10. Torres Filho I.P., Terner J., Pittman R.N., Somera L.G., Ward K.R. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005. Vol. 289. H488-H495.
11. Luneva O.G., Brazhe A.R., Maksimova N.V., Rodnenkov O.V., Parshina E.Y., Bryzgalova N.Y., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I. // *Pathophysiology.* 2007. Vol. 14. P. 41.
12. Rodnenkov O.V., Luneva O.G., Ulyanova N.A., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I. // *Pathophysiology.* 2005. Vol. 11. P. 209.

Поступила в редакцию 10.10.14

RAMAN SPECTROSCOPY AND SILVER NANOPARTICLES IN BIOMEDICAL HEMOGLOBIN STUDIES

G.V. Maksimov², T.G. Sazontova¹, S.S. Kovalenko², N.A. Brazhe², A.A. Semenova³,
E.J. Parshina², L.V. Kuzmicheva⁴, V.V. Shutova⁴, A.I. Yusipovich², O.V. Sosnovtseva⁵,
E.A. Gudilin³, Y.V. Arhipenko¹

(¹Faculty of Basic Medicine, ²Faculty of Biology, ³Fakultet Materials Science of Lomonosov Moscow State University, Moscow (Russia); ⁴Faculty of Biology Ogarev Mordovia University, Saransk (Russia); ⁵Faculty of Medicine, Copenhagen University (Denmark))

Complex the Raman spectroscopy (RS) and silver nanoparticles (SNP) is a native and sensitive method for the biomedicine diagnostics of hemoglobin. It is shown that the possibility of its use in the SNP injection into the body are limited due to adverse factors driving change in the ability of hemoglobin to carry O₂. Applications of silver nanostructured substrates made is a more effective way to study and native conformation of hemoglobin does not require SNP injection into the body.

Key words: Raman spectroscopy, hemoglobin, colloidal particles of silver; nanostructured substrate of silver.

Сведения об авторах: Максимов Георгий Владимирович – профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ, профессор, докт. биол. наук (gmaksimov@mail.ru); Сазонтова Татьяна Геннадьевна – вед. науч. сотр. факультета фундаментальной медицины МГУ, профессор, докт. биол. наук (arkhipenko@fbm.msu.ru); Коваленко Светлана Сергеевна – аспирантка кафедры биофизики биологического факультета МГУ (biochem_mordovia@mail.ru); Браже Надежда Александровна – ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ, канд. биол. наук (nadiya.brazhe@gmail.com); Семенова Анна Александровна – науч. сотр. химического факультета МГУ, канд. хим. наук (annette_semenova@mail.ru); Паршина Евгения Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ, канд. биол. наук (parshinae@gmail.com); Кузьмичева Лидия Васильевна – профессор кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии биологического факультета Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева, докт. биол. наук, доцент (kuzlid@yandex.ru); Шутова Виталина Викторовна – доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии факультета биотехнологии и биологии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева, доцент, канд. биол. наук (vshutova@yandex.ru); Юсипович Александр Иванович – ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ, канд. биол. наук (sanyavor@gmail.com); Сосновцева Ольга Валентиновна – профессор медицинского факультета университета г. Копенгаген (Дания) (olgavita@yahoo.com); Гудилин Евгений Алексеевич – профессор факультета наук о материалах МГУ, докт. хим. наук (goodilin@gmail.com); Архипенко Юрий Владимирович – профессор факультета фундаментальной медицины МГУ, доктор биологических наук (arkhipenko@fbm.msu.ru).