

УДК 541.18;544.52

## ВЛИЯНИЕ СТАРЕНИЯ УЛЬТРАМАЛЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ХОЛЕСТЕРИЧЕСКИМИ МИКРОЧАСТИЦАМИ ДНК

© 2023 г. М. А. Климович<sup>1, 2</sup>, М. А. Кольванова<sup>1, 2</sup>,  
О. В. Дементьева<sup>3</sup>, О. Н. Климович<sup>1</sup>, В. М. Рудой<sup>3</sup>, В. А. Кузьмин<sup>1</sup>, В. Н. Морозов<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,  
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

<sup>2</sup>Федеральный медицинский биофизический центр  
им. А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098 Россия

<sup>3</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,  
Ленинский просп., 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: morozov.v.n@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Исследована корреляция между временем предварительной выдержки синтезированных по методу Даффа ультрамалых наночастиц золота (НЧЗ) и структурными аспектами их взаимодействия с частицами холестерического жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК. Установлено, что “возраст” НЧЗ в значительной мере определяет величину их деструктивного действия по отношению к упорядоченной организации частиц ХЖКД ДНК. Наблюдаемый эффект может быть связан как с постепенным совершенствованием кристаллической решетки (металлизацией) исследуемых НЧЗ, так и с изменением во времени химии их поверхности.

**Ключевые слова:** жидкие кристаллы ДНК, круговой дихроизм, наночастицы золота, старение наночастиц, металлизация наночастиц

**DOI:** 10.31857/S0023291223600542, **EDN:** DIAVWZ

### ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своим свойствам холестерические жидкокристаллические дисперсии ДНК, получаемые методом *psi*-конденсации (также  $\psi$ ; акроним слов “*Polymer and Salt Induced*” [1]), имеют большой потенциал для решения фундаментальных и практических задач биологии и медицины. С одной стороны, они являются удобными модельными системами, поскольку плотная упаковка молекул ДНК в частицах ХЖКД в определенной степени воспроизводит ее организацию *in vivo* [2–4]. С другой стороны, *psi*-ДНК обладает выдающимся по интенсивности сигналом кругового дихроизма (КД), который может как выступать маркером тех или иных физических воздействий [5–8], так и использоваться для обнаружения биологически активных соединений [9]. Более того, различные низкомолекулярные соединения, а также наночастицы (НЧ) металлов можно целенаправленно интегрировать в частицы ХЖКД ДНК [10–14], что позволяет значительно расширить функциональные возможности последних. Впрочем, введение таких агентов может оказывать негатив-

ное влияние на упорядоченную организацию молекул ДНК. Так, например, в работах Евдокимова и соавт. [15–17] продемонстрировано и подробно исследовано деструктивное действие на частицы ХЖКД ДНК ультрамалых НЧ золота, полученных восстановлением ионов  $\text{Au}^{3+}$  хлоридом тетракис(гидроксиметил)фосфония (ТГФХ) — так называемым методом Даффа [18, 19]. Изучению этого явления посвящены и наши недавние работы [20, 21].

Сопоставляя полученные нами результаты с данными Евдокимова и соавт., можно заметить, что несмотря на качественное сходство наблюдаемых эффектов в их количественном выражении наблюдаются расхождения. Так, например, мы регистрировали весьма небольшое различие в величинах деструктивного действия НЧЗ в случае их предварительной инкубации в заданной концентрации с раствором ДНК и при введении в такую же концентрацию в готовую ХЖКД [21]. В то же время Евдокимов и соавт. отмечали, что значения концентрации НЧЗ, при которых для этих двух путей их введения в систему наблюдались

близкие по величине эффекты, различались более чем на порядок [17]. Мы полагаем, что такие расхождения отчасти могут быть обусловлены состоянием НЧЗ. Действительно, при анализе опубликованных работ видны существенные различия в “возрасте” использованных НЧЗ. Например, в работе Евдокимова и соавт. [16] использовался гидрозоль НЧЗ, хранившийся после синтеза около 2.5 мес, в то время как мы изучали либо свежеприготовленные НЧЗ [21], либо их гидрозоль возрастом более 6 мес [20]. При этом хорошо известно, что свойства НЧ могут заметно изменяться в процессе их “старения” [22–24]. Этот факт отмечали и для ультрамалых НЧЗ, синтезированных по методу Даффа [25, 26]. Поэтому целью настоящей работы являлось исследование влияния возраста таких НЧЗ на их взаимодействие с молекулами ДНК в частицах ее ХЖКД.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления ХЖКД использовали коммерческие препараты выделенной из молок осетровых или лососевых рыб и деполимеризованной ультразвуком ДНК (Деринат®;  $(0.25–0.5) \times 10^6$  Да; Техномедсервис, Россия) и полиэтиленгликоля (ПЭГ, 4000 Да; Sigma, США). Их растворы готовили на основе водно-солевого буфера, содержащего  $10^{-2}$  М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 0.3 М NaCl ( $\text{pH} \approx 7.4$ ), а полученные после смешения этих растворов образцы интенсивно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре до окончательного формирования оптически активной дисперсии. Содержание ПЭГ в конечной системе было фиксированным и составляло 170 мг/мл (17%), тогда как концентрацию ДНК варьировали от  $1.27 \times 10^{-5}$  до  $2.03 \times 10^{-4}$  М (для определения ее концентрации использовали значение коэффициента экстинкции  $\epsilon_{260} \approx 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Индикатором образования ХЖКД ДНК являлось появление на спектре КД интенсивной отрицательной полосы (также называемой аномальной [27]) в области длин волн  $\lambda = 260–280$  нм.

Процедура синтеза исходных сферических НЧЗ, средний размер которых непосредственно после получения составлял  $\approx 2.5$  нм, а также методы анализа их характеристик детально описаны в наших предыдущих работах [13, 14]. Были приготовлены три гидрозоль НЧЗ, которые после определения их исходных характеристик выдерживали в холодильнике при температуре  $4^\circ\text{C}$  в течение 1, 6 и 12 мес (далее они обозначаются как золи I, II и III соответственно). Затем эти золи были повторно охарактеризованы и сразу же использованы в эксперименте. Были рассмотрены два различных способа введения НЧЗ в систему: 1) раствор ДНК в течение 20–30 мин инкубировали с НЧЗ при комнатной температуре, после чего до-

бавляли в систему 34%-ный раствор ПЭГ в пропорции 1 : 1, индуцируя образование ХЖКД, 2) НЧЗ вносили в предварительно приготовленную ХЖКД ДНК дробно (с шагом 20 мкл) с соблюдением тех же условий инкубации, что и в первом способе.

Регистрацию спектров поглощения НЧЗ, а также определение концентрации ДНК проводили с помощью спектрофотометра UV-3101 PC (Shimadzu, Япония) в прямоугольных кварцевых кюветах сечением  $1.0 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm}$ . Спектры динамического рассеяния света (ДРС) гидрозольями I–III регистрировали с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Спектры КД измеряли, используя дихрограф СКД-2, разработанный и произведенный в лаборатории лазерно-спектрального приборостроения Института спектроскопии РАН [28], и кварцевые кюветы сечением  $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ . Спектры КД представляли в виде зависимости разницы поглощения лево- и правополяризованного света  $\Delta A = A_L - A_R$  от длины волны  $\lambda$ . Для измерения кинетики формирования аномального КД-сигнала ХЖКД ДНК растворы ДНК и ПЭГ смешивали вручную непосредственно в кюветном отделении дихрографа (“мертвое время”, затраченное на перемешивание полученной смеси, составляло 3–7 с). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью уравнения

$$\Delta A(t) = \sum_{i=1}^n \Delta A_i e^{-k_i t}. \quad (1)$$

Погрешность определения констант скорости  $k_i$  не превышала 10%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе исследованы синтезированные методом восстановления ионов  $\text{AuCl}_4^-$  хлоридом ТГФХ по Даффу гидрозоль ультрамалых сферических НЧЗ разного возраста: 1, 6 и 12 мес (золи I, II и III соответственно). На рис. 1 представлены результаты их анализа методом спектроскопии поглощения в УФ и видимой областях. Известно, что спектр поглощения таких НЧЗ сразу после приготовления обычно представляет собой плавную спадающую в диапазоне от 190 до 1100 нм кривую, а их старение сопровождается появлением широкой полосы с максимумом вблизи 500 нм, свидетельствующей о возникновении у частиц локализованного поверхностного плазмонного резонанса [18, 25]. В полном соответствии с этими данными, в спектре золя I в данной области наблюдается лишь незначительное увеличение поглощения (кривая 1), в то время как для золя II, возраст которого составляет 6 мес, интенсивность этой полосы существенно возрастает (кривая 2), а в случае золя III, хранившегося 12 мес, спектр ха-

рактируется ярко выраженным плазмонным пиком (кривая 3). Такое поведение спектра поглощения свидетельствует о постепенном совершенствовании кристаллической решетки ультрамалых НЧЗ, т.е. об их переходе из квазиметаллического состояния в металлическое [18, 29]. Отметим, что размеры НЧЗ (по данным ДРС – примерно от 2.5 до 3.5 нм в золях разного возраста) позволяют предположить возможность их встраивания между холестерическими слоями ДНК в соответствии с существующей теорией [16], поскольку расстояния между этими слоями, согласно имеющимся представлениям [30], должны составлять от  $\approx 4.9$  до  $\approx 3.2$  нм.

Как было сказано выше, возможны два принципиально различающихся способа инкорпорирования НЧЗ в частицы ХЖКД ДНК: внесение золя золота в готовую холестерическую дисперсию или предварительная инкубация раствора ДНК с частицами золя с последующей *psi*-конденсацией молекул нуклеиновой кислоты при добавлении ПЭГ [17, 21]. На рис. 2 на примере НЧЗ возрастом 6 мес (золь II) сопоставлены данные об их деструктивном действии на упорядоченную структуру частиц ХЖКД ДНК при двух этих вариантах введения в систему (концентрация ДНК в обоих случаях составляла  $1.35 \times 10^{-4}$  М)<sup>1</sup>. Видно (рис. 2а), что при обработке золем золота готовой дисперсии характерный для холестерической упаковки ДНК аномальный сигнал КД частично сохраняется даже в случае максимальной исследованной концентрации НЧЗ, равной  $19.33 \times 10^{-8}$  М (хотя его амплитуда и уменьшается при этом более чем в четыре раза). В случае же предварительной инкубации ДНК с НЧЗ наблюдается значительно более сильное падение амплитуды КД-сигнала формируемой затем ХЖКД. Так, уже при концентрации НЧЗ, равной  $12.42 \times 10^{-8}$  М, его интенсивность составляет только около 5% от исходного значения, а при концентрации НЧЗ  $14.25 \times 10^{-8}$  М спектр КД очень похож на характерную для изотропного раствора ДНК кривую с разнонаправленными полосами с максимумами вблизи 240 и 270 нм (рис. 2б). Зависимости интенсивности сигнала КД, нормированной на ее исходное значение, от концентрации НЧЗ золя II для обоих вариантов их введения в ХЖКД показаны на рис. 2в. Видно, что ход кривых отклоняется от линейного, который в аналогичных координатах  $\Delta A/\Delta A_0 - [H_2O]$  или  $\Delta A/\Delta A_0 - [(CH_3)_2SO]$  ( $\Delta A_0$  и  $\Delta A$  – значения амплитуды сигнала КД до и после

<sup>1</sup> В случае предварительного контакта раствора ДНК с НЧЗ, очевидно, корректнее говорить о той или иной степени их препятствования образованию ХЖКД, а не о ее разрушении. Однако использование термина “разрушение” позволяет компактнее представлять и сопоставлять данные, полученные при двух рассматриваемых способах включения НЧЗ в частицы дисперсии ДНК.

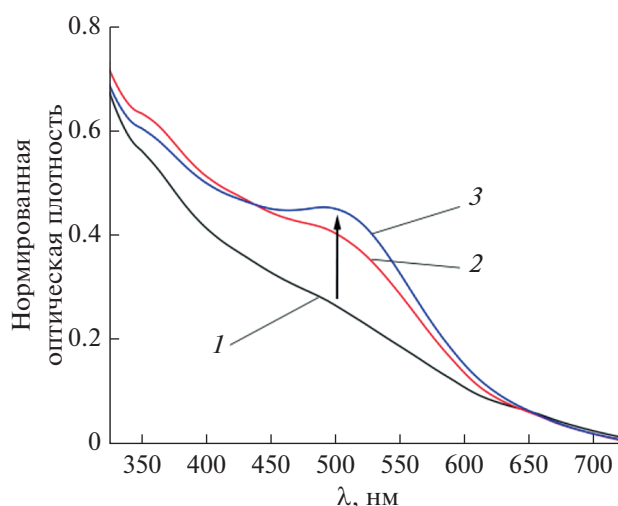
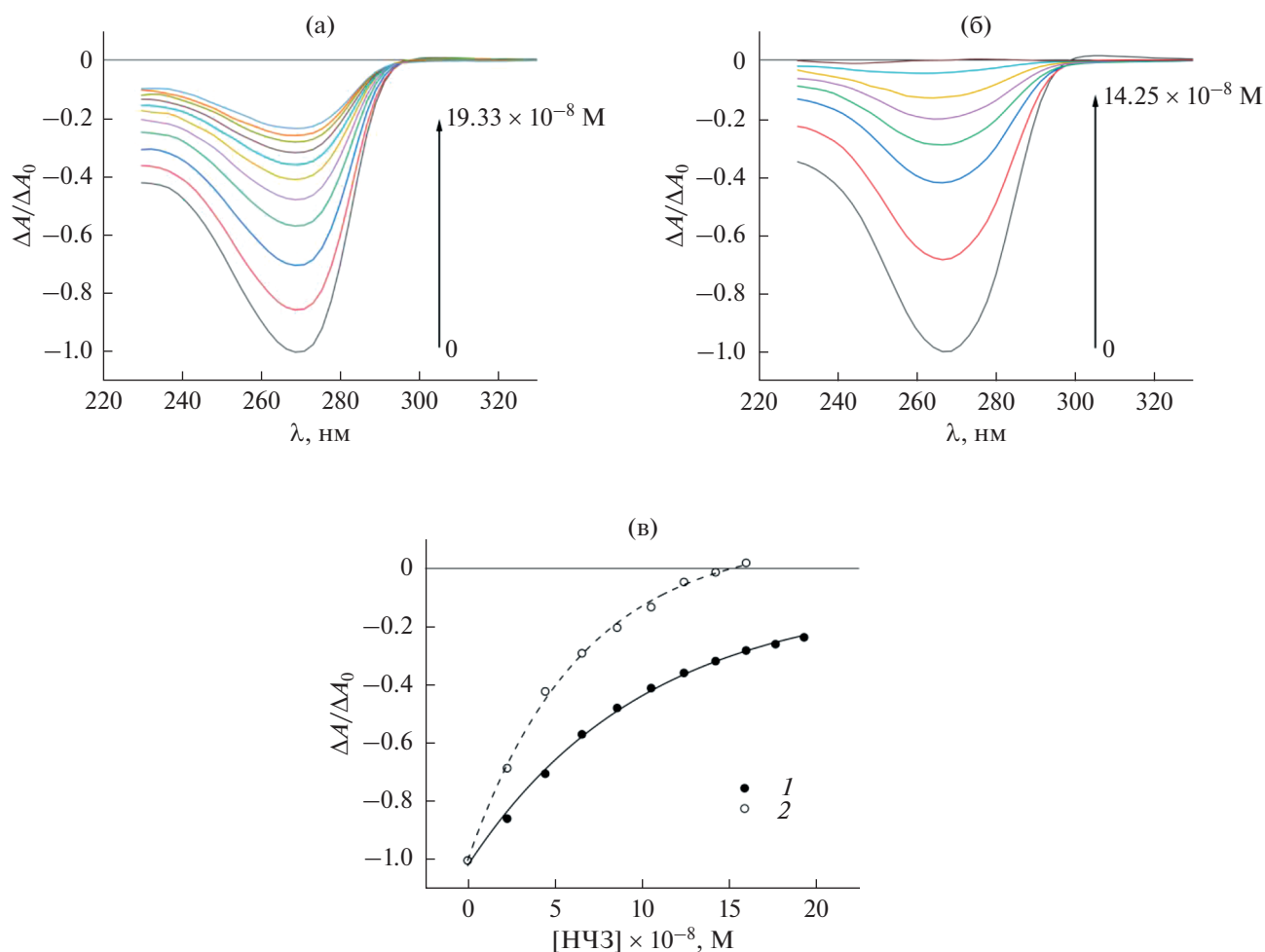


Рис. 1. Спектры поглощения использованных гидрозолей золота разного возраста: 1 (1), 6 (2) и 12 мес (3). Концентрация НЧЗ во всех случаях составляла  $10.45 \times 10^{-8}$  М. Спектры нормированы на величину оптической плотности на длине волны  $\lambda = 300$  нм.

обработки системы) характерен для случая разрушения холестерической упаковки ДНК за счет уменьшения осмотического давления раствора ПЭГ, стабилизирующего частицы дисперсии, при разбавлении системы водой или диметилсульфоксидом соответственно.

На рис. 3 сопоставлены результаты изучения разрушения ХЖКД ДНК под действием НЧЗ всех трех исследуемых золей при двух разных способах их введения в систему. Эти данные представлены в виде зависимостей от концентрации НЧЗ ( $[HЧЗ]$ ) отношения  $\Delta A_0/\Delta A$ , а также отношения  $(\Delta A_0/\Delta A)_{до}/(\Delta A_0/\Delta A)_{после}$ , где нижние индексы “до” и “после” указывают на введение НЧЗ в систему до и после формирования ХЖКД.

Обратим внимание на вид кривых на рис. 3а, демонстрирующем уменьшение интенсивности аномального КД-сигнала относительно ее исходного значения при обработке НЧЗ готовой ХЖКД ДНК. Для НЧЗ золей II и III результаты близки: различия между кривыми 2 и 3 составляют менее 10%. Ход обеих зависимостей почти линейен, что хорошо согласуется с результатами нашей недавней работы, где были исследованы НЧЗ схожего возраста [20]. Довольно хорошо согласуются и соответствующие численные значения степени разрушения упорядоченной упаковки ДНК. В случае золя I начальный участок зависимости  $\Delta A_0/\Delta A$  от  $[HЧЗ]$  тоже близок к линейному, однако, начиная с концентрации НЧЗ, равной примерно  $10.45 \times 10^{-8}$  М, рост значений  $\Delta A_0/\Delta A$  становится более интенсивным (см. кривую 1 на рис. 3а). Такой ход этой зависимости аналогичен наблюдаемому нами при изучении взаимодействия с



**Рис. 2.** КД-спектры ХЖКД ( $[ДНК] = 1.35 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), измеренные в присутствии разных количеств НЧЗ возрастом 6 мес (золя II): (а) введение НЧЗ в готовую ХЖКД, (б) предварительная инкубация ДНК с НЧЗ. (в) Зависимости пиковой интенсивности КД-полосы от концентрации НЧЗ при обработке ими готовой ХЖКД (1) и в случае их предварительной инкубации с ДНК (2). Все значения  $\Delta A$  нормированы на абсолютное значение амплитуды КД-сигнала для соответствующего контрольного образца ХЖКД, не содержащего НЧЗ. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7%.

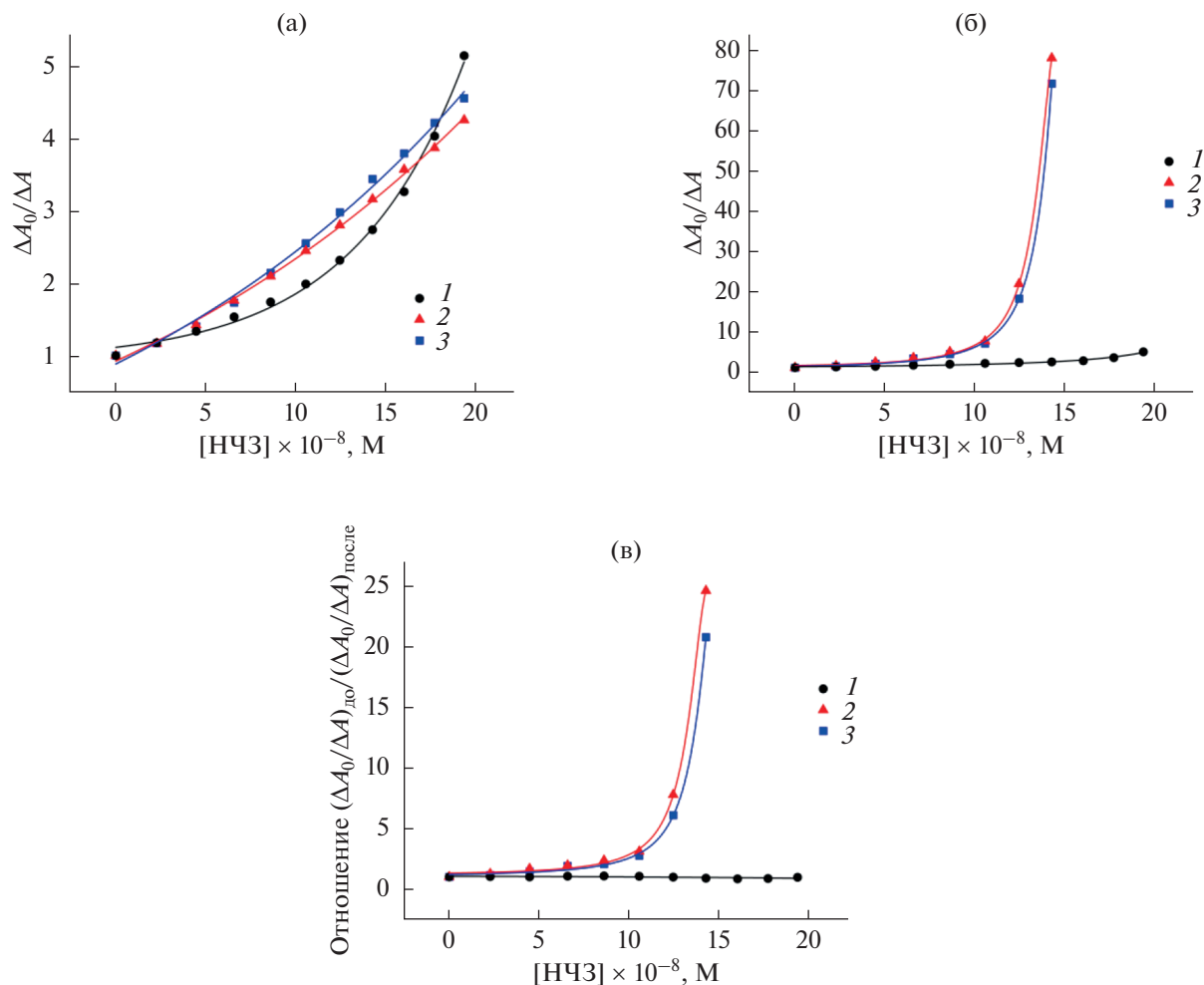
ХЖКД ДНК свежесинтезированных ультрамалых НЧЗ [21].

Отметим, что в исследованном диапазоне концентраций НЧЗ при данном способе их введения в ХЖКД ДНК значения степени ее разрушения частицами золя I отличаются от соответствующих значений для частиц золь II и III не более чем на 25%.

В случае предварительной инкубации ДНК с НЧЗ золь II и III результаты также оказались близки между собой. Различия в значениях  $\Delta A_0/\Delta A$  составляют не более 20% (сравните кривые 2 и 3 на рис. 3б), однако обе зависимости имеют выраженный экспоненциальный характер. При этом значения степени разрушения ХЖКД ДНК для максимальной исследованной концентрации этих НЧЗ более чем на порядок превосходят величины, полученные при обработке готовой дисперсии (кривые 2 и 3 на рис. 3в). В то же время из-

менения в степени разрушения ХЖКД после предварительного контакта ДНК с НЧЗ “свежего” золя I по сравнению с регистрируемыми после обработки ими готовой ХЖКД весьма незначительны (различия не превышают 15%, кривая 1 на рис. 3в). Как и в нашей недавней работе [21], в этом случае зависимость  $\Delta A_0/\Delta A$  от  $[НЧЗ]$  имеет более продолжительный линейный участок (вплоть до  $[НЧЗ] = 16.00 \times 10^{-8} \text{ M}$ , см. кривую 1 на рис. 3б), чем при обработке готовой ХЖКД ДНК.

Таким образом, предварительная инкубация ДНК с ультрамалыми НЧЗ достаточно большого возраста способствует более сильной последующей деструкции структуры частиц ее ХЖКД (точнее, сильнее препятствует образованию соответствующей холестерической дисперсии). Кроме того, полученные результаты позволяют предположить, что свойства ультрамалых НЧЗ, получен-

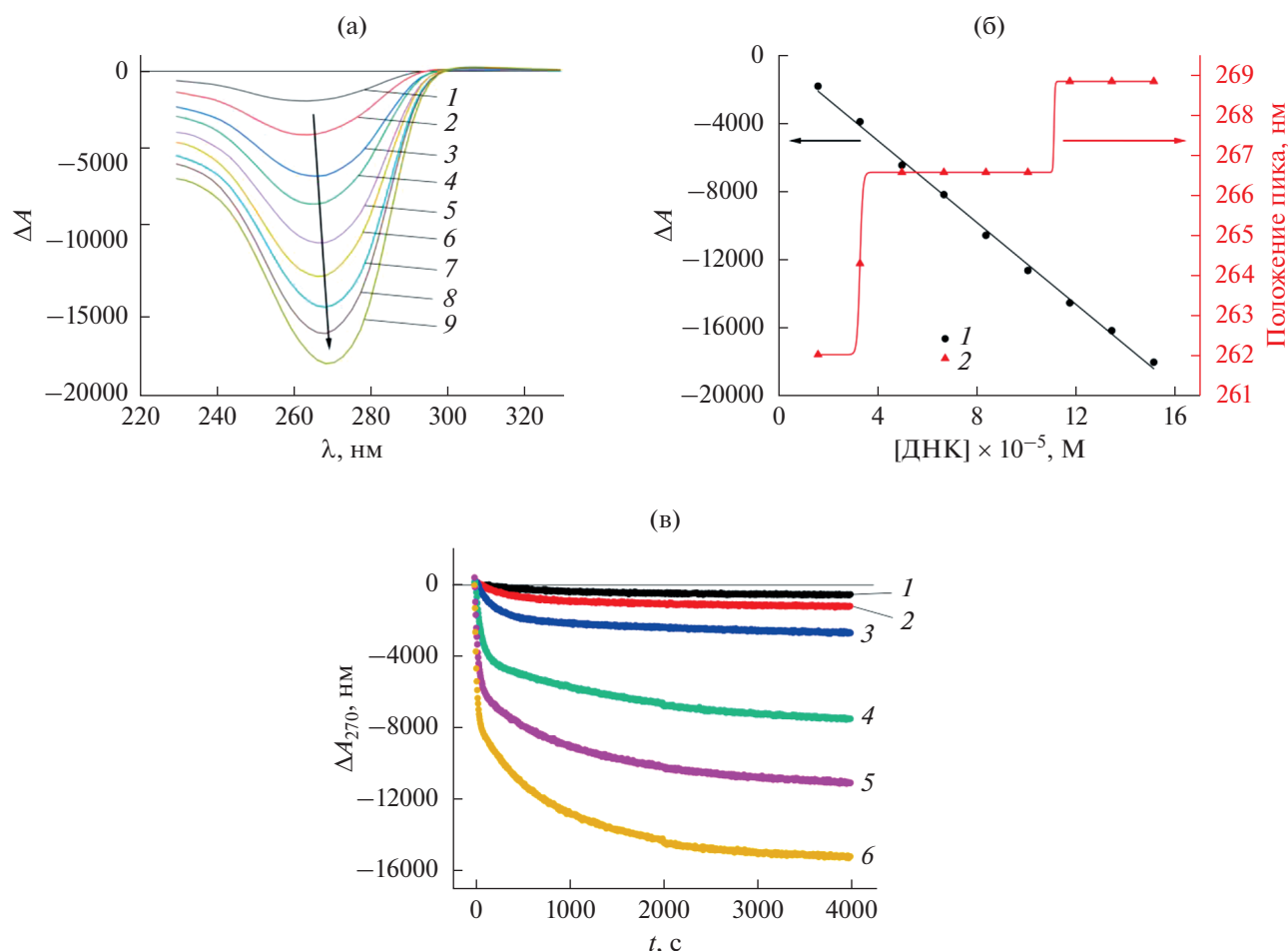


**Рис. 3.** Сопоставление зависимостей степени разрушения ХЖКД ДНК ( $[ДНК] = 1.35 \times 10^{-4}$  М) от концентрации НЧ исследуемых золей золота при их введении в готовую дисперсию (а) и в случае предварительной инкубации с ДНК (б). (в) Отношение степеней разрушения холестерической микрофазы ДНК при этих двух способах введения НЧЗ в ХЖКД. Номера кривых соответствуют НЧЗ разного возраста: 1 – золь I, 2 – золь II, 3 – золь III. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7% (а, б) и 10% (в).

ных по методу Даффа, весьма существенно трансформируются в первые 6 мес после синтеза (по крайней мере, в части их взаимодействия с ДНК). При этом помимо уже отмеченной металлизации НЧЗ, обусловленной совершенствованием их кристаллической структуры, может, очевидно, изменяться и химия их поверхности. Более подробный анализ этих изменений, которые должны сказываться на взаимодействии НЧЗ с ДНК, является целью наших дальнейших исследований. А пока можно сделать следующие предварительные выводы. Во-первых, поскольку НЧЗ всех трех использованных золей по данным ДРС весьма близки по размеру, они должны обладать примерно одинаковой способностью проникать в микрофазу заранее сформированной ХЖКД ДНК и возмущать/разрушать их упорядоченную структуру. Это в целом и демонстрирует рис. 3а. Во-вторых, судя по рис. 3б, химия поверхности НЧЗ

возрастом 1 мес. еще заметно отличается от таковой у НЧЗ большего возраста, причем таким образом, что эти НЧЗ взаимодействуют с молекулами ДНК существенно слабее, чем НЧЗ возрастом 6 и 12 мес, и, в отличие от них, значительно меньше влияют на образование частиц ХЖКД. В то же время поверхностные свойства НЧЗ золей II и III, по-видимому, уже достаточно близки, что и обуславливает практически одинаковое их воздействие на формирование ХЖКД ДНК.

Еще одним фактором, который, по нашему мнению, может обуславливать различия в величине деструктивного действия НЧЗ на ХЖКД ДНК при двух разных способах их инкорпорирования в эту систему, является концентрация самой нуклеиновой кислоты. Известно, что размер агрегатов ДНК, формируемых методом *psi*-конденсации, зависит от ее молекулярной массы и



**Рис. 4.** (а) КД-спектры образцов ХЖКД с различным содержанием ДНК: 1– $1.69 \times 10^{-5}$ , 2– $3.38 \times 10^{-5}$ , 3– $5.06 \times 10^{-5}$ , 4– $6.75 \times 10^{-5}$ , 5– $8.44 \times 10^{-5}$ , 6– $1.01 \times 10^{-4}$ , 7– $1.18 \times 10^{-4}$ , 8– $1.35 \times 10^{-4}$ , 9– $1.52 \times 10^{-4}$  М. (б) Зависимости амплитуды сигнала КД (1) и положения его пика (2) от концентрации ДНК. Стандартные отклонения при определении амплитуды сигнала, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 5%. (в) Зарегистрированные на длине волны  $\lambda = 270$  нм кинетические кривые формирования аномальной полосы КД при разной концентрации ДНК: 1– $1.27 \times 10^{-5}$ , 2– $2.53 \times 10^{-5}$ , 3– $5.06 \times 10^{-5}$ , 4– $1.01 \times 10^{-4}$ , 5– $1.52 \times 10^{-4}$ , 6– $2.03 \times 10^{-4}$  М.

концентрации в широких диапазонах значений этих параметров [31]. В свою очередь, как показывает теоретический анализ [32], с увеличением размера частиц ХЖКД интенсивность КД-сигнала должна возрастать практически линейно, если их структура (в частности, шаг холестерической спирали) не изменяется. На рис. 4а представлены КД-спектры образцов ХЖКД, приготовленных при варьировании концентрации ДНК от  $1.69 \times 10^{-5}$  до  $1.52 \times 10^{-4}$  М. Видно, что увеличение содержания нуклеиновой кислоты в системе приводит к возрастанию амплитуды аномальной полосы КД (этот рост сопровождается bathochromным смещением полосы: при наименьшей исследованной концентрации ДНК ее максимум наблюдается на длине волны  $\lambda \approx 262$  нм, а при наибольшей – на  $\lambda \approx 269$  нм). Представленные в наглядной графической форме на рис. 4б эти спектральные данные свидетельствуют, в частности, о том, что амплитуда

аномальной полосы КД является именно линейной функцией содержания ДНК в системе. Поэтому с учетом сказанного выше можно полагать, что в исследованном концентрационном диапазоне, действительно, изменяется количество нуклеиновой кислоты в составе микрочастиц ХЖКД за счет изменения их размера (и, возможно, числа, см. ниже), но не структура самих микрочастиц.

От концентрации ДНК зависит и кинетика формирования ее ХЖКД. На рис. 4в приведены зависимости амплитуды аномального сигнала КД от времени, записанные на длине волны  $\lambda = 270$  нм сразу после смешения растворов нуклеиновой кислоты различной концентрации и раствора ПЭГ. Кривые 1–4 хорошо описываются в рамках двухэкспоненциальной модели, в то время как кривые 5 и 6 имеют трехэкспоненциальный характер. Соответствующие значения рассчитанных по формуле (1) констант скорости  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$

**Таблица 1.** Значения констант скорости, рассчитанные по экспериментальным кинетическим кривым, представленным на рис. 4в

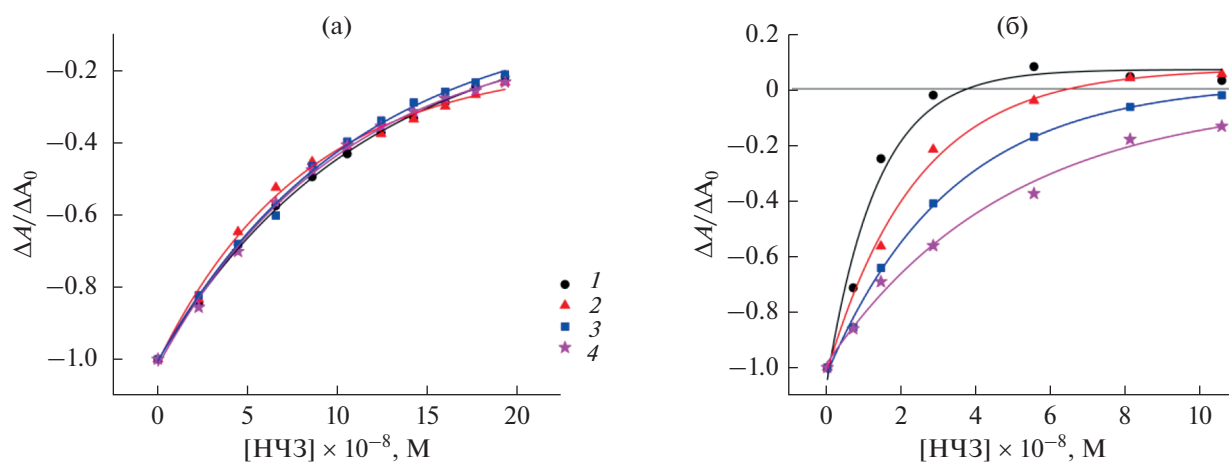
| Номер кривой на рис. 4в | [ДНК], М              | $k_1, \text{с}^{-1}$  | $k_2, \text{с}^{-1}$  | $k_3, \text{с}^{-1}$  |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1                       | $1.27 \times 10^{-5}$ | $2.00 \times 10^{-3}$ | $4.72 \times 10^{-4}$ | —                     |
| 2                       | $2.53 \times 10^{-5}$ | $3.61 \times 10^{-3}$ | $5.32 \times 10^{-4}$ | —                     |
| 3                       | $5.06 \times 10^{-5}$ | $6.02 \times 10^{-3}$ | $5.85 \times 10^{-4}$ | —                     |
| 4                       | $1.01 \times 10^{-4}$ | $1.76 \times 10^{-2}$ | $7.01 \times 10^{-4}$ | —                     |
| 5                       | $1.52 \times 10^{-4}$ | $3.28 \times 10^{-2}$ | $7.74 \times 10^{-4}$ | $6.67 \times 10^{-3}$ |
| 6                       | $2.03 \times 10^{-4}$ | $4.88 \times 10^{-2}$ | $8.93 \times 10^{-4}$ | $4.69 \times 10^{-3}$ |

суммированы в табл. 1. Отметим, что величина  $k_1$  изменяется по мере увеличения концентрации ДНК по экспоненциальному закону, а  $k_2$  — по линейному. Исходя из полученных данных, а также из существующих представлений о процессе формирования ХЖКД ДНК [33, 34], мы полагаем, что с помощью спектроскопии КД удастся наблюдать две его стадии: активный рост частиц за счет присоединения молекул ДНК к зародышу (с константой скорости  $k_1$ ) и упорядочение/перестройку холестерических слоев в сформированных частицах (с константой  $k_2$ ) [34]. Третья стадия, имеющая место только при весьма высоких концентрациях ДНК, представляет собой, по-видимому, агрегацию частиц дисперсии и может приводить к упомянутому выше одновременному изменению числа и размера микрочастиц нуклеиновой кислоты.

На рис. 5 в качестве примера сопоставлены зависимости нормированной интенсивности сигнала КД для ХЖКД с различным содержанием

ДНК от концентрации НЧЗ (использовался золь П возрастом 6 мес), полученные при двух различных способах их введения в систему. Видно, что при обработке НЧЗ готовой жидкокристаллической дисперсии степень разрушения холестерической организации ее частиц практически не зависит от концентрации ДНК: кривые 1–4 на рис. 5а совпадают в пределах 15%. В то же время в случае предварительной инкубации раствора ДНК с НЧЗ их деструктивное действие на формируемую затем ХЖКД заметно ослабевает с ростом концентрации нуклеиновой кислоты в том же диапазоне (рис. 5б), хотя в целом, как следует из сопоставления рис. 5а и 5б, подавление НЧЗ аномального КД-сигнала ХЖКД гораздо эффективнее именно при их предварительном контакте с ДНК.

Согласно существующим представлениям, нарушение внутренней упаковки частиц ХЖКД ДНК, наблюдающееся при введении НЧЗ в готовую дисперсную систему, состоит в раздвижении и изменении угла закрутки холестерических слоев, фор-



**Рис. 5.** Зависимости интенсивности сигнала КД от концентрации НЧЗ золя П при обработке ими готовых ХЖКД (а) и при их предварительном контакте с растворами ДНК (б). Концентрация нуклеиновой кислоты в обоих случаях составляла: 1 –  $3.38 \times 10^{-5}$ , 2 –  $6.75 \times 10^{-5}$ , 3 –  $1.01 \times 10^{-4}$ , 4 –  $1.35 \times 10^{-4}$  М. Все значения  $\Delta A$  нормированы на абсолютные значения амплитуды КД-сигнала для соответствующих исходных ХЖКД, не содержащих НЧЗ. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7%.

мируемых молекулами ДНК [35]. В работе [36] для обозначения этого механизма был предложен термин “нематизация”. В случае же предварительной инкубации НЧЗ с ДНК происходит исключение отдельных молекул или их групп из процесса формирования ХЖКД при последующем добавлении ПЭГ. В работе [37] этот механизм был описан как предотвращение взаимного “узнавания” молекул ДНК. Очевидно, что в последнем случае увеличение соотношения [НЧЗ] : [ДНК] должно сопровождаться усилением деструктивного эффекта, как наглядно демонстрирует рис. 5б. Вместе с тем, инвариантность степени разрушения упорядоченной структуры частиц дисперсии относительно соотношения [НЧЗ] : [ДНК] при обработке готовой системы, показанная на рис. 5а, является весьма нетривиальной. Отметим здесь, что вкуче с непосредственным воздействием НЧЗ на упаковку ДНК в частицах ее ХЖКД при введении в эту систему золя золота также имеет место разбавление, а, следовательно, и уменьшение осмотического давления раствора ПЭГ. Вместе с тем известно, что при помощи НЧЗ можно стабилизировать структуру жидкокристаллических систем на основе ДНК [38]. В частности, эффект стабилизации внутренней организации в присутствии НЧЗ был ранее обнаружен и в случае разбавления ХЖКД ДНК [39]. Таким образом, действие НЧЗ на упорядоченную упаковку молекул ДНК в частицах ее ХЖКД представляется весьма многофакторным, и понимание многих его аспектов требует дальнейших исследований.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследовано влияние времени предварительной выдержки (от 1 до 12 мес) ультрамалых НЧЗ, синтезированных по методу Даффа, на структурные аспекты их взаимодействия с частицами ХЖКД ДНК. Полученные результаты весьма убедительно свидетельствуют о том, что “возраст” таких НЧЗ является существенным фактором, определяющим степень разрушения упорядоченной упаковки молекул ДНК в частицах ее ХЖКД. На основании полученных данных можно сделать следующие выводы.

1. При обработке готовой дисперсной системы различия в степени разрушения для НЧЗ разного “возраста” выражены довольно слабо. При этом для “выдержанных” НЧЗ эффект усиления степени разрушения ХЖКД в случае их предварительной инкубации с ДНК реализуется значительно сильнее. Вместе с тем, существенных различий в величине деструктивного эффекта для НЧЗ, выдержанных в течение 6 и 12 мес, в условиях проведенного эксперимента обнаружено не было.

2. Степень разрушения холестерической упаковки ДНК при обработке НЧЗ готовой дисперсной системы не зависит от концентрации нуклеи-

новой кислоты, в то время как в случае предварительной инкубации ДНК с НЧЗ эффект, напротив, сильно зависит от ее содержания в системе.

3. В части взаимодействия с ДНК свойства ультрамалых НЧЗ, полученных по методу Даффа, весьма существенно трансформируются в первые 6 мес после синтеза. Это может быть обусловлено как металлизацией НЧЗ вследствие совершенствования их кристаллической структуры, так и изменением химии их поверхности.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jordan C.F., Lerman L.S., Venable J.H.* Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions // *Nature: New Biology*. 1972. V. 236. № 64. P. 67–70.  
<https://doi.org/10.1038/newbio236067a0>
2. *Earnshaw W.C., Casjens S.R.* DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages // *Cell*. 1980. V. 21. № 2. P. 319–331.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90468-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90468-7)
3. *Yevdokimov Y.M., Skuridin S.G., Salyanov V.I.* The liquid-crystalline phases of double-stranded nucleic acids *in vitro* and *in vivo* // *Liquid Crystals*. 1988. V. 3. № 11. P. 1443–1459.  
<https://doi.org/10.1080/02678298808086687>
4. *Livolant F.* Ordered phases of DNA *in vivo* and *in vitro* // *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 1991. V. 176. № 1. P. 117–137.  
[https://doi.org/10.1016/0378-4371\(91\)90436-G](https://doi.org/10.1016/0378-4371(91)90436-G)
5. *Cheng S.-M., Mohr S.C.* The thermal transition of ‘PSI’ DNA monitored by circular dichroism // *FEBS Letters*. 1974. V. 49. № 1. P. 37–42.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80626-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80626-5)
6. *Nikogosyan D.N., Repeyev Y.A., Yakovlev D.Y. et al.* Photochemical alterations in DNA revealed by DNA-based liquid crystals // *Photochemistry and Photobiology*. 1994. V. 59. № 3. P. 269–276.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05033.x>
7. *Kolyvanova M.A., Klimovich M.A., Shibaeva A.V. et al.* Cholesteric liquid-crystalline DNA – a new type of chemical detector of ionizing radiation // *Liquid Crystals*. 2022. V. 49. № 10. P. 1359–1366.  
<https://doi.org/10.1080/02678292.2022.2032854>
8. *Кольванова М.А., Белоусов А.В., Кузьмин В.А. и др.* Модификация радиочувствительности холестерической дисперсии ДНК с помощью диметилсульфоксида // *Химия высоких энергий*. 2022. Т. 56. № 5. С. 416–418.  
<https://doi.org/10.31857/S0023119322050072>
9. *Yevdokimov Y.M., Salyanov V.I., Lortkipanidze G.B. et al.* Sensing biological effectors through the response of bridged nucleic acids and polynucleotides fixed in liquid-crystalline dispersions // *Biosensors and Bioelectronics*. 1998. V. 13. № 3–4. P. 279–291.  
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00133-4)
10. *Евдокимов Ю.М., Сальянов В.И., Кондрашина О.В. и др.* Жидкокристаллические дисперсии комплексов



- ДНК с гадолинием – потенциальная платформа для нейтронозахватывающей терапии // Доклады Академии наук. 2005. Т. 402. № 5. С. 693–696. <https://doi.org/10.1007/s10628-005-0081-z>
11. Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I. et al. DNA sequence-specific ligands. XVII. Synthesis, spectral properties, virological and biochemical studies of fluorescent dimeric bisbenzimidazoles DBA(n) // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2018. V. 26. № 9. P. 2302–2309. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.03.018>
  12. Koval V.S., Arutyunyan A.F., Salyanov V.I. et al. DNA sequence-specific ligands. XVIII. Synthesis, physicochemical properties; genetic, virological, and biochemical studies of fluorescent dimeric bisbenzimidazoles DBPA(n) // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2020. V. 28. № 7. P. 115378. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115378>
  13. Morozov V.N., Kolyvanova M.A., Dement'eva O.V. et al. Fluorescence superquenching of SYBR Green I in crowded DNA by gold nanoparticles // Journal of Luminescence. 2020. V. 219. P. 116898. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2019.116898>
  14. Morozov V.N., Kolyvanova M.A., Dement'eva O.V. et al. Comparison of quenching efficacy of SYBR Green I and PicoGreen fluorescence by ultrasmall gold nanoparticles in isotropic and liquid-crystalline DNA systems // Journal of Molecular Liquids. 2021. V. 321. P. 114751. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114751>
  15. Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Рудой В.М. и др. Действие наночастиц золота на упаковку молекул ДНК в модельных системах // Доклады Академии наук. 2010. Т. 432. № 6. С. 838–841.
  16. Евдокимов Ю.М., Салыанов В.И., Кац Е.И. и др. Кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // Acta Naturae. 2012. Т. 4. № 4 (15). С. 80–93.
  17. Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салыанов В.И. и др. Наночастицы золота влияют на “узнавание” двухцепочечных молекул ДНК и запрещают формирование их холестерической структуры // Жидкие кристаллы и их практическое использование. 2014. Т. 14. № 4. С. 5–21.
  18. Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation // Langmuir. 1993. V. 9. № 9. P. 2301–2309. <https://doi.org/10.1021/la00033a010>
  19. Duff D.G., Baiker A., Gameson I., Edwards P.P. A new hydrosol of gold clusters. 2. A comparison of some different measurement techniques // Langmuir. 1993. V. 9. № 9. P. 2310–2317. <https://doi.org/10.1021/la00033a011>
  20. Морозов В.Н., Климович М.А., Колыванова М.А. и др. Взаимодействие наночастиц золота с цианиновыми красителями в холестерических субмикрочастицах ДНК // Химия высоких энергий. 2021. Т. 55. № 5. С. 339–346.
  21. Колыванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др. Взаимодействие наночастиц золота с цианиновыми красителями в холестерических субмикрочастицах ДНК. Влияние способа их введения в систему // Химическая физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 64–72. <https://doi.org/10.31857/S0207401X23010065>
  22. Swarnkar R.K., Singh S.C., Gopal R. Effect of aging on copper nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in water: Structural and optical characterizations // Bulletin of Materials Science. 2011. V. 34. № 7. P. 1363–1369. <https://doi.org/10.1007/s12034-011-0329-4>
  23. Ma Y., Chechik V. Aging of gold nanoparticles: Ligand exchange with disulfides // Langmuir. 2011. V. 27. № 23. P. 14432–14437. <https://doi.org/10.1021/la202035x>
  24. Gubicza J., Lábár J.L., Quynh L.M. et al. Evolution of size and shape of gold nanoparticles during long-time aging // Materials Chemistry and Physics. 2013. V. 138. № 2–3. P. 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.01.012>
  25. Дементьева О.В., Карцева М.Е., Сухов В.М. и др. Температурно-временная эволюция ультрамалых затравочных наночастиц золота и синтез плазмонных наноболочек // Коллоидный журнал. 2017. Т. 79. № 5. С. 562–568. <https://doi.org/10.7868/S0023291217050056>
  26. Карцева М.Е., Шишмакова Е.М., Дементьева О.В. и др. Рост фосфониевых наночастиц золота в щелочной среде: кинетика и механизм процесса // Коллоидный журнал. 2021. Т. 83. № 6. С. 644–650. <https://doi.org/10.31857/S0023291221060057>
  27. Keller D., Bustamante C. Theory of the interaction of light with large inhomogeneous molecular aggregates. II. Psi-type circular dichroism // The Journal of Chemical Physics. 1986. V. 84. № 6. P. 2972–2980. <https://doi.org/10.1063/1.450278>
  28. Компанец О.Н. Портативные оптические биосенсоры для определения биологически активных и токсичных соединений // Успехи физических наук. 2004. Т. 174. № 6. С. 686–690.
  29. Еришов Б.Г. Короткоживущие малые кластеры металлов в водных растворах: получение, идентификация и свойства // Известия Академии наук. Серия химическая. 1999. № 1. С. 1–15.
  30. Livolant F., Leforestier A. Condensed phases of DNA: Structures and phase transitions // Progress in Polymer Science. 1996. V. 21. № 6. P. 1115–1164. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(96\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(96)00016-0)
  31. Muzzopappa F., Hertzog M., Erdel F. DNA length tunes the fluidity of DNA-based condensates // Biophysical Journal. 2021. V. 120. № 7. P. 1288–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.02.027>
  32. Семенов С.В., Евдокимов Ю.М. Круговой дихроизм частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК // Биофизика. 2015. Т. 60. № 2. С. 242–252.
  33. Скуридин С.Г., Лорткипанидзе Г.Б., Мусаев О.Р. и др. Формирование жидкокристаллических микрофаз двухцепочечных нуклеиновых кислот и синтетических полинуклеотидов низкой молекулярной массы // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 1985. Т. 27. № 11. С. 2261–2265.

34. *Morozov V.N., Klimovich M.A., Kostyukov A.A. et al.* Förster resonance energy transfer from Hoechst 33258 to SYBR Green I in cholesteric liquid-crystalline DNA // *Journal of Luminescence*. 2022. V. 252. P. 119381. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2022.119381>
35. *Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Штыкова Э.В. и др.* Фиксация наночастиц золота в структуре квазинематических слоев, образованных молекулами ДНК // *Биологические мембраны*. 2011. Т. 28. № 3. С. 191–198.
36. *Евдокимов Ю.М.* Наночастицы золота и жидкие кристаллы ДНК // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2015. Т. 56. № 3. С. 147–157.
37. *Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Скуридин С.Г. и др.* Физико-химический и нанотехнологический подходы к созданию “твердых” пространственных структур ДНК // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. № 1. С. 27–42.
38. *Brach K., Matczyszyn K., Olesiak-Banska J. et al.* Stabilization of DNA liquid crystals on doping with gold nanorods // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2016. V. 18. P. 7278–7283. <https://doi.org/10.1039/C5CP07026K>
39. *Скуридин С.Г., Салянов В.И., Попенко В.И. и др.* Структурные эффекты, вызываемые наночастицами золота, в частицах холестерических жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // *Химико-фармацевтический журнал*. 2013. Т. 47. № 2. С. 3–11. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2013-47-2-3-11>