КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ, 2024, том 86, № 3, с. 344–356

УДК 541.18:544.52

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАМАЛЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИМИ МИКРОЧАСТИЦАМИ ДНК: РАЗРУШЕНИЕ VS СТАБИЛИЗАЦИЯ

© 2024 г. М. А. Колыванова[1, 2], М. А. Климович[1, 2], Е. М. Шишмакова[3], А. А. Маркова[1], О. В. Дементьева[3], В. М. Рудой[3], В. А. Кузьмин[1], В. Н. Морозов[1, *]

[1]*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия*

[2]*Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098 Россия*

[3]*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 02.11.2023 г.
После доработки 16.12.2023 г.
Принята к публикации 16.12.2023 г.

Исследована взаимосвязь между деструктивным и стабилизирующим действием синтезированных по методу Даффа ультрамалых наночастиц золота (НЧЗ) по отношению к внутренней структуре частиц жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) ДНК в зависимости от степени упорядоченности последних. Показано, что “стабилизация” упорядоченной структуры частиц фактически оказывается следствием ее “разрушения”. При этом доминирование того или другого эффекта сложным образом зависит от расстояния между соседними молекулами ДНК в частицах ее ЖКД, определяемого осмотическими условиями, и эффективностью проникновения НЧЗ в эти частицы.

Ключевые слова: жидкие кристаллы, ДНК, круговой дихроизм, наночастицы золота

DOI: 10.31857/S0023291224030049, **EDN:** BMLGLG

ВВЕДЕНИЕ

Исследование взаимодействия нанообъектов, в особенности неорганических наночастиц (НЧ), с жидкокристаллическими системами представляет несомненный интерес с точки зрения создания новых функциональных материалов [1–3]. Поскольку к мезогенам среди прочих относятся некоторые белки [4], полисахариды [5] и нуклеиновые кислоты [6–10], в отдельное направление можно выделить работы с использованием “биологических” жидких кристаллов. Так, значительное внимание уделяется взаимодействию НЧ золота (НЧЗ) с мезофазами ДНК [11–14]. Весьма интересный пример подобных систем представляют получаемые методом *psi*-конденсации (также ψ; акроним слов “*Polymer and Salt Induced*” [15]) жидкокристаллические дисперсии (ЖКД) низкомолекулярных ДНК. С одной стороны, они являются удобными биофизическими моделями, поскольку плотная упаковка молекул нуклеиновой кислоты в дисперсных частицах может в определенной степени воспроизводить ее организацию *in vivo* [16–18], а с другой, представляют собой многофункциональную платформу для биомедицины [19–21]. Примечательной особенностью ЖКД ДНК является также возможность целенаправленного инкорпорирования в их частицы НЧЗ как метода конструирования, к примеру, флуоресцентных сенсорных систем, в которых НЧЗ могут выступать тушителями или, напротив, усилителями сигнала. Изучению структурных аспектов такого инкорпорирования посвящены работы Евдокимова и соавторов [22–28], а также нашей научной группы [29–31]. Тем не менее, несмотря на достаточно большое число публикаций, некоторые из этих аспектов остаются не до конца изученными. Так, например, не ясно, как взаимосвязаны процессы разрушения и стабилизации упорядоченной внутренней структуры частиц ЖКД ДНК при их взаимодействии с гидрозолем НЧЗ. Также неизвестно, как глубина протекания этих процессов соотносится со степенью внутренней упорядоченности (разупорядоченности) частиц дисперсии. Поиск ответов на эти вопросы и явился целью настоящего исследования. Они представляются нам тем более важными, что полученные

закономерности могут быть вполне актуальными и применительно к другим биомакромолекулярным жидкокристаллическим системам, функционализируемым НЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления ЖКД использовали коммерческий препарат выделенной из молок осетровых или лососевых рыб и деполимеризованной ультразвуком ДНК (Деринат®; (0.25–0.5) × 10^6 Да (≈400–800 п.о.); Техномедсервис, Россия) и полиэтиленгликоль (ПЭГ, 4000 Да; Sigma, США). Их растворы приготовляли на основе водно-солевого буфера, содержащего 0.01 M Na_2HPO_4 и 0.3 M NaCl (pH ≈ 7.4), а полученные после смешения этих растворов образцы интенсивно перемешивали и в соответствии с известными данными о кинетике формирования оптически активных ЖКД ДНК (см. [31, 32]) выдерживали при комнатной температуре не менее 1.5 ч. Содержание ДНК в образцах было фиксированным и составляло 1.35 × 10^{-4} M (для ее спектрофотометрического определения использовали значение коэффициента экстинкции ε_{260} ≈ 6600 M^{-1} $см^{-1}$ [33]), тогда как концентрацию ПЭГ варьировали в диапазоне 0–300 мг/мл (0–30 масс. %), используя для этого в качестве исходного раствор полимера с концентрацией 60 масс. %.

Процедура синтеза гидрозоля сферических НЧЗ детально описана в наших предыдущих работах [34, 35]. Для характеризации частиц использовали просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) и спектрометр динамического рассеяния света Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). В последнем случае измерения проводили под углом 173° при 25°C, а экспериментальные данные усредняли по пяти последовательным циклам измерений, каждый из которых включал 10–15 “прогонов”.

В настоящем исследовании были использованы НЧЗ золя возрастом 5 мес, для которых уже наблюдается эффект локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР). Все это время золь после анализа исходных характеристик хранили в холодильнике при 4°C. Затем он был повторно охарактеризован и сразу же использован в экспериментах.

Готовые образцы ЖКД ДНК с различным содержанием ПЭГ титровали дистиллированной водой или гидрозолем НЧЗ. Для этого к 1 мл образца добавляли до 200 мкл (с шагом 20 мкл) воды или золя золота, что в последнем случае соответствует максимальной концентрации НЧЗ в ЖКД, равной 19.33 × 10^{-8} M. Поскольку в предыдущих публикациях мы оперировали величиной концентрации НЧЗ, а не вносимого объема золя, на рис. 1 для удобства представлен график сопоставления этих параметров.

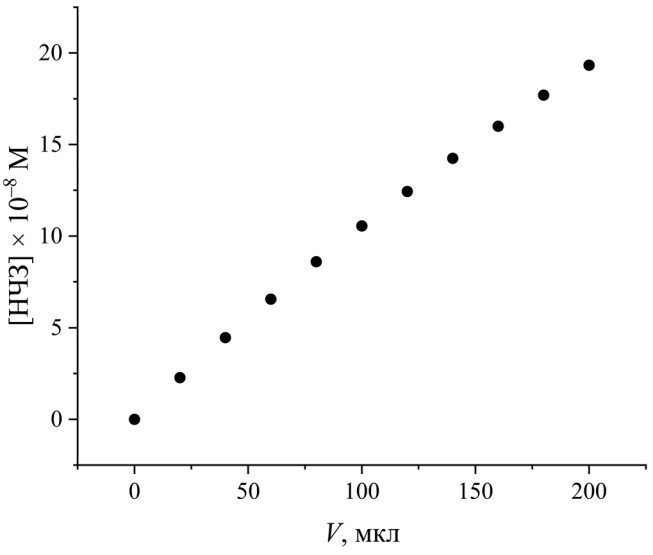


Рис. 1. Сопоставление вносимого объема гидрозоля НЧЗ и их конечной концентрации в системе с учетом разбавления.

Регистрацию спектров поглощения проводили с помощью спектрофотометра UV-3101 PC (Shimadzu, Япония). Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли, используя дихрограф СКД-2 (Институт спектроскопии РАН, Россия), и представляли в виде зависимости разницы поглощения лево- и правополяризованного света $\Delta A = A_L - A_R$ от длины волны λ. Все измерения проводили в кварцевых кюветах (Hellma, Германия). Частицы ЖКД ДНК визуализировали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica Microsystem, Германия). Для этого использовали флуоресцентный краситель SYBR Green I (SG; Lumiprobe, США). Этот краситель имеет низкий квантовый выход флуоресценции в свободном состоянии (≈10^{-4}), который при его связывании с ДНК увеличивается более чем в 1000 раз [36]. К 1 мл образца ЖКД ДНК добавляли 2.5 мкл раствора красителя с концентрацией 7 × 10^{-4} M, т.е. концентрация SG в системе составляла 1.75 × 10^{-6} M. Затем 20 мкл полученной дисперсии помещали на предметное стекло (Menzel-Gläser, Германия). Краситель возбуждали аргоновым лазером на длине волны 488 нм, а его флуоресценцию регистрировали в диапазоне 500–600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе использовали гидрозоль сферических НЧЗ, синтезированный путем восстановления ионов $AuCl_4^-$ хлоридом тетракис(-гидроксиметил)фосфония (ТГФХ): этот способ, получивший известность как метод Даффа, был разработан группой Эдвардса [37–39]. Средний

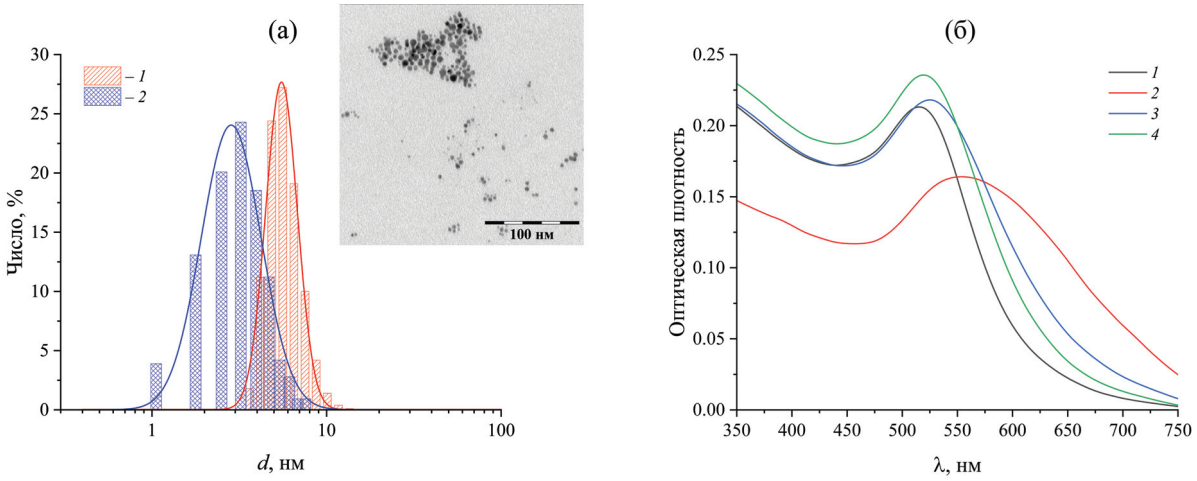


Рис. 2. (а) Распределения НЧЗ по размерам, построенные по данным динамического рассеяния света (*1*) и ПЭМ (*2*); на вставке – микрофотография этих НЧЗ. (б) Спектры поглощения 10.45×10^{-8} М НЧЗ в дистиллированной воде (*1*) и буферном растворе (*2*), а также в буферном растворе в присутствии 1.35×10^{-4} М ДНК (*3*) или 18 масс. % ПЭГ (*4*).

размер таких частиц непосредственно после получения обычно составляет ≈2.5 нм, тогда как при их "старении", равно как и при воздействии различных внешних факторов (см., например, [40–42]), он может заметно увеличиваться. После выдержки гидрозоля в течение 5 мес при 4°C средний размер НЧЗ согласно данным динамического рассеяния света составлял около 5–6 нм (рис. 2а), а по данным ПЭМ – примерно 3.4 нм (см. вставку на том же рисунке). Спектр поглощения таких НЧЗ в дистиллированной воде характеризуется выраженным пиком вблизи 500 нм (кривая *1* на рис. 2б), свидетельствующим о наличии у них ЛППР, тогда как непосредственно после синтеза их спектр поглощения представляет собой плавно спадающую кривую [38]. При введении частиц в буферный раствор, содержащий 0.3 М NaCl, полоса ЛППР заметно уширяется, ее интенсивность снижается, а максимум батохромно смещается с 515 до 553 нм (кривая *2* на рис. 2б). Такое поведение спектра обусловлено агрегацией НЧЗ, вызванной экранированием катионами соли отрицательного заряда их поверхности [43, 44]. В присутствии в буферном растворе ПЭГ или ДНК спектр поглощения НЧЗ изменяется гораздо меньше (так, плазмонный пик смещается до 520 или 526 нм соответственно – см. кривые *3* и *4* на рис. 2б) и по форме он значительно ближе к их спектру в дистиллированной воде. Сохранение агрегативной устойчивости таких систем в условиях высокой ионной силы свидетельствует о взаимодействии молекул ДНК и ПЭГ с НЧЗ, обеспечивающем стабилизацию гидрозоля золота, очевидно, по стерическому механизму.

Рассмотрим сначала титрование гидрозолем золота "классической" холестерической ЖКД ДНК с 18%-м содержанием ПЭГ (рис. 3). Ее спектр КД характеризуется интенсивной отрицательной полосой с максимумом вблизи 270 нм (так называемый аномальный КД-сигнал [45]), примерно в 20 раз превосходящей по амплитуде КД-сигнал изотропного раствора ДНК. Расстояние между соседними слоями, формируемыми молекулами нуклеиновой кислоты, согласно данным малоуглового рентгеновского рассеяния, в этом случае близко к 3.5 нм [25]. Как при пошаговом разбавлении этой системы дистиллированной водой, так и при добавлении к ней гидрозоля золота амплитуда аномального КД-сигнала постепенно уменьшается: в первом случае – вплоть до ≈5.12 раз (рис. 3а), а во втором – до ≈7.63 раз (рис. 3б). Сопоставляя эти результаты с полученными ранее, можно отметить более сильное (до ≈1.9 раз) ослабление сигнала, чем, например, в работах [29, 31]. По этому параметру они значительно ближе к результатам работы [30]. В то же время, поскольку в работе [30] был использован свежеприготовленный гидрозоль золота, а в настоящей работе – выдержанный в течение 5 мес, можно заключить, что сохраняется показанная нами ранее (см. подробнее в [31]) практическая независимость степени воздействия НЧЗ на величину аномального КД-сигнала готовой ЖКД ДНК от возраста гидрозоля.

Обратим теперь внимание на принципиальные различия в характере изменений амплитуды аномального КД-сигнала, наблюдаемые при титровании рассматриваемой ЖКД ДНК дистиллированной водой и золем НЧЗ. Как мы отмечали в предыдущей статье [31], в случае разбавления этой системы водой (равно как и, например, водным раствором ТГФХ) зависимость отношения

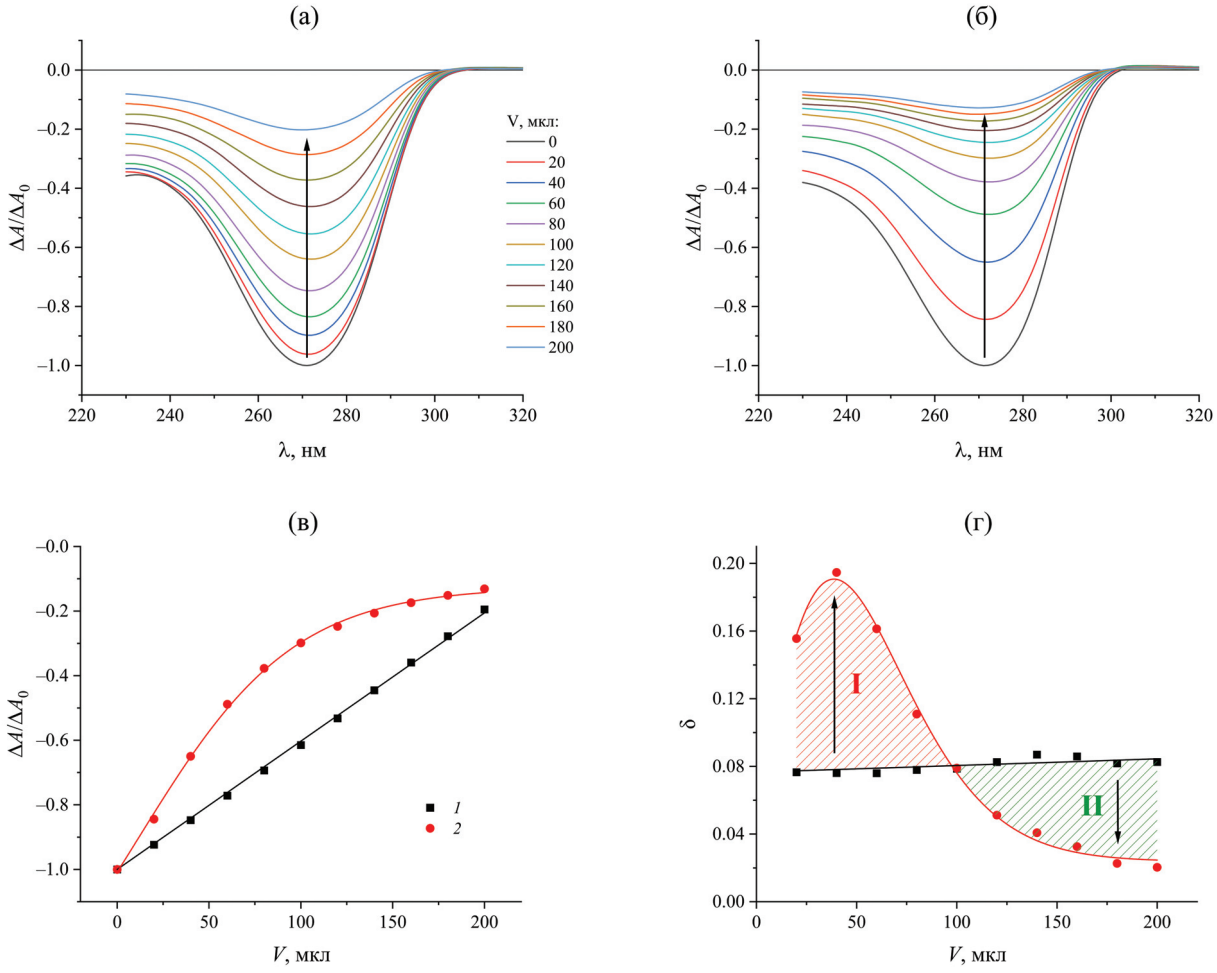


Рис. 3. Спектры КД, полученные при титровании ЖКД ДНК с 18%-м содержанием ПЭГ дистиллированной водой (а) или золем НЧЗ (б). (в) Зависимости пиковой интенсивности КД-сигнала от объема добавляемых к ЖКД ДНК воды (*1*) или золя НЧЗ (*2*). (г) Зависимости величины декремента, рассчитываемого по формуле (1), от вносимого в систему объема жидкости. Цветовая легенда аналогична рисунку (в). Красной и зеленой штриховкой обозначены соответственно области разрушения и стабилизации частиц ЖКД ДНК. Все значения ΔA нормированы на абсолютное значение амплитуды КД-сигнала для соответствующего контрольного образца. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7% (в) и 14% (г).

$\Delta A/\Delta A_0$ от величины вносимого объема жидкости V линейна (кривая *1* на рис. 3в). Уменьшение амплитуды КД-сигнала при этом обусловлено, во-первых, понижением осмотического давления раствора ПЭГ, стабилизирующего частицы ЖКД ДНК, и, во-вторых, уменьшением числа самих этих частиц в единице объема образца (однако, поскольку здесь мы сопоставляем действие одинаковых объемов дистиллированной воды и гидрозоля, вторым фактором можно пренебречь). Вместе с тем при добавлении к ЖКД ДНК золя золота помимо ее разбавления имеет место непосредственное воздействие НЧЗ на упорядоченную внутреннюю структуру частиц дисперсии. То есть в соответствии с известными литературными данными, с точки зрения изменения амплитуды аномального КД-сигнала, НЧЗ в принципе могут как усиливать, так и ослаблять эффект разбавления; будем далее называть это их действие соответственно деструктивным и стабилизирующим (соответствующие механизмы весьма подробно разобраны в обзоре [46]). В случае титрования ЖКД ДНК гидрозолем зависимость $\Delta A/\Delta A_0$ от V на начальном этапе характеризуется более крутым подъемом, за которым, однако, следует постепенное уменьшение ее наклона (ср. кривые *1* и *2* на рис. 3в). Такая же форма этой кривой наблюдалась в ряде работ, опубликованных ранее [27, 29, 31, 46].

Для более детального анализа зависимостей $\Delta A/\Delta A_0$ от V введем понятие декремента $\delta(V)$ – величины, на которую изменяется амплитуда

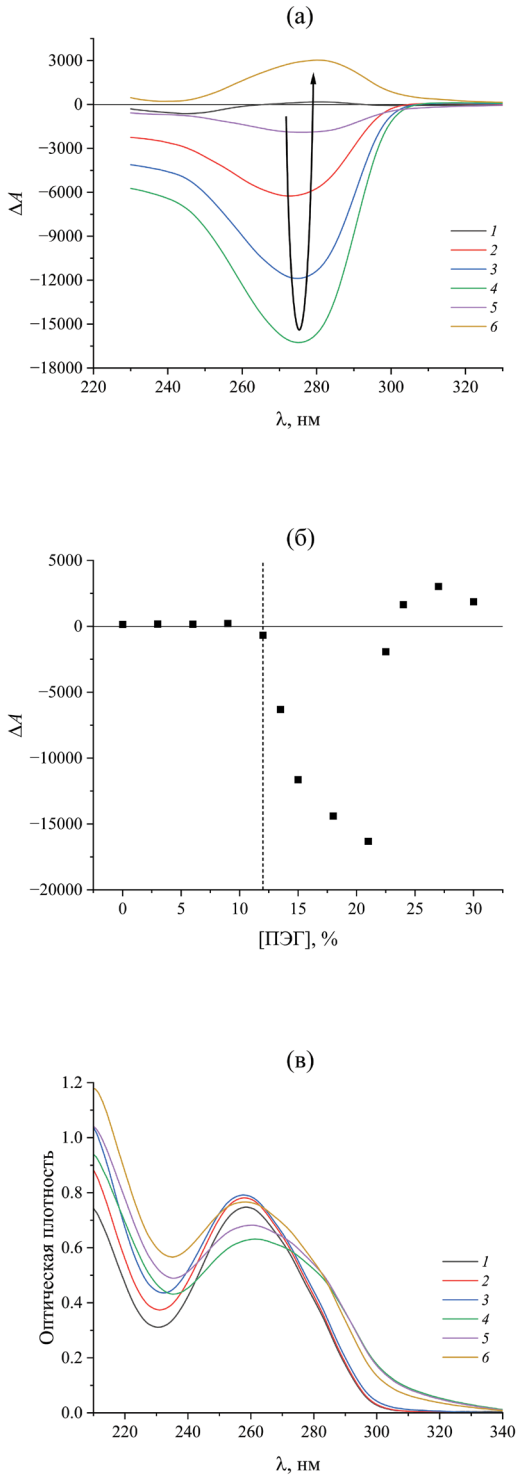


Рис. 4. (а) Спектры КД систем с различным содержанием ПЭГ (масс. %): *1* – 0, *2* – 13.5, *3* – 16.5, *4* – 21, *5* – 22.5, *6* – 27. (б) Зависимость амплитуды КД-сигнала от концентрации ПЭГ в системе. Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7%. (в) Спектры поглощения систем с различным содержанием ПЭГ (масс. %): *1* – 0, *2* – 6, *3* – 12, *4* – 18, *5* – 24, *6* – 30.

КД-сигнала системы на каждом шаге ее титрования дистиллированной водой или золем НЧЗ, отнесенной к амплитуде исходного сигнала:

$$\delta(V) = \left| \frac{\Delta A_i - \Delta A_j}{\Delta A_0} \right|. \quad (1)$$

Сопоставляя полученные графические зависимости $\delta(V)$, можно выделить две области (рис. 3г): область I, в которой действие НЧЗ сильнее, чем эффект разбавления, и область II, в которой эффект разбавления, напротив, сильнее, чем действие НЧЗ (в первой области доминирует деструктивное действие НЧЗ, а во второй – стабилизирующее; на рисунке они обозначены соответственно красной и зеленой штриховкой). Можно заключить, что в “красной” области внутренняя структура частиц дисперсии возмущается вследствие накопления в них НЧЗ, встраивающихся между холестерическими слоями ДНК. Согласно существующим представлениям, ее возмущение заключается в раздвижении и изменении угла закрутки слоев, формируемых молекулами ДНК. В “зеленой” области НЧЗ, инкорпорированные в частицы дисперсии, по-видимому, стабилизируют их структуру за счет связывания/”сшивания” молекул ДНК соседних слоев и, таким образом, препятствуют разрушению ЖКД при снижении осмотического давления раствора ПЭГ. Действительно, как отмечено в обзоре [46], “металлизированные” (т.е. содержащие значительное число НЧЗ) частицы ЖКД ДНК могут существовать даже в отсутствие высокого осмотического давления раствора.

Оптически активные дисперсии ДНК при прочих равных условиях формируются в широком диапазоне концентраций ПЭГ (рис. 4а и 4б). Достаточно точно установлено, что критическая (минимальная) концентрация этого полимера[1], при которой начинается их образование, составляет 12–12.5 масс. % [32, 48]. Дальнейшее повышение концентрации ПЭГ[2] приводит сначала к интенсивному росту амплитуды аномального КД-сигнала, а затем к ее резкому скачкообразному падению (экстремум, согласно литературным данным, обычно наблюдается в диапазоне концентраций от 17 до 21 масс. %). Отметим, что вплоть до значений 22–24 масс. % такой ход зависимости ΔA от [ПЭГ] хорошо воспроизводится в независимых экспериментах. Сложнее обстоит дело с предельной

[1] Здесь мы говорим о ПЭГ с молекулярной массой, равной 4000 Да. Для полимера с другой молекулярной массой она может отличаться. Кроме того, критическая концентрация ПЭГ зависит от природы катионов и свойств молекул ДНК (например, нуклеотидного состава или молекулярной массы); см. подробнее в [47].

[2] Речь идет о ее повышении именно при приготовлении ЖКД ДНК. Этот процесс не эквивалентен увеличению концентрации ПЭГ в готовой ЖКД.

(максимальной) концентрацией полимера. В ряде работ аномальный КД-сигнал не обнаруживался при содержании ПЭГ в системе свыше 22 масс. % [49, 50]. Было сделано предположение, что в этой области концентраций ПЭГ холестерическая организация ДНК в частицах ее ЖКД трансформируется в гексагональную, для которой не характерна оптическая активность [51]. В то же время Сакурai и др. наблюдали характерные для холестерических дисперсных систем аномальные КД-сигналы со знаком, зависящим от длины молекул ДНК, даже при 40%-м содержании ПЭГ [52]. Возможность существования оптической активности у агрегатов ДНК при [ПЭГ] $\geqslant$ 24 масс. % продемонстрирована и в нашей недавней работе, причем было установлено, что знак аномального КД-сигнала зависит от концентрации исходного раствора полимера [32]. Так, в случае приготовления ЖКД ДНК по "классической" методике при смешении водно-солевых растворов ПЭГ и ДНК в объемном соотношении 1 : 1 (т.е. когда для получения системы с конечным содержанием ПЭГ, равным 30 масс. %, используется его 60%-й исходный раствор) на спектре КД наблюдаются положительные сигналы. На данный момент мы не имеем точного представления о внутренней организации формирующихся при этом частиц и не можем однозначно объяснить такое поведение оптической активности системы. Отметим, что относительно небольшие положительные КД-сигналы при высоком содержании ПЭГ также наблюдали Евдокимов и др. [53, 54].

Для дальнейшего обсуждения важно упомянуть, что образование ЖКД сопровождается специфическими изменениями спектра поглощения нуклеиновой кислоты (рис. 4в): характерная для ее изотропного раствора полоса с максимумом вблизи 260 нм заметно уширяется, сложным образом изменяются ее амплитуда и положение пика, кроме того, в области, где отсутствует поглощение как ДНК, так и ПЭГ ($\geqslant$ 310 нм), возникает "кажущаяся оптическая плотность", обусловленная рассеянием излучения на частицах дисперсии. Отметим, однако, что явное изменение спектра поглощения немного "запаздывает" относительно появления аномального КД-сигнала. Так, при 12%-м содержании ПЭГ в системе уже наблюдается характерная для холестерической дисперсии аномальная оптическая активность (рис. 4б), тогда как ее спектр поглощения все еще близок к спектру изотропного раствора (ср. кривые *1* и *3* на рис. 4в).

Методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и флуоресцентной спектроскопии установлено, что увеличение осмотического давления с повышением концентрации ПЭГ приводит к сближению молекул ДНК в частицах получаемых дисперсий [32, 48]. При этом известно, что характерные расстояния между молекулами ДНК в ее холестерических мезофазах составляют от ≈4.9 до ≈3.2 нм, а в гексагональных – от ≈3.2 до ≈2.4 нм [55]. Таким образом, учитывая близость размеров используемых нами ультрамалых НЧЗ и "свободного" межмолекулярного пространства в мезофазах, логично предположить, что изменение [ПЭГ] может влиять на проникновение таких НЧЗ в частицы ЖКД ДНК и, как следствие, на эффективность их деструктивного и стабилизирующего действия. Вместе с тем, роль стерических ограничений, накладываемых плотной упаковкой молекул ДНК, во взаимодействии НЧ с частицами ее ЖКД ясна не до конца. С одной стороны, было показано, что степень уменьшения амплитуды аномального КД-сигнала, ассоциированного с разрушением холестерической структуры частиц дисперсии, различается для НЧЗ разного размера [22]. Кроме того, в работах [24, 46, 56] подразумевается (согласно представленным в них схемам, хотя авторы не всегда прямо об этом говорят), что НЧЗ относительно больших размеров могут иметь стерические ограничения на проникновение в частицы ЖКД и взаимодействуют преимущественно с их "поверхностными" молекулами ДНК. С другой стороны, при обработке положительно заряженными НЧ феррита кобальта со средним размером около 5.5 нм холестерической ЖКД ДНК, для которой средние межмолекулярные расстояния составляли ≈3.3 нм, наблюдалось полное разрушение упорядоченной надмолекулярной структуры [57]. Такое различие, полученное для НЧ двух типов, свидетельствует о том, что, по всей видимости, электростатическое взаимодействие НЧ и молекул ДНК может способствовать преодолению стерических затруднений.

Рассмотрим теперь особенности взаимодействия НЧЗ с частицами ЖКД ДНК, содержащих 15, 21 и 27 масс. % ПЭГ. Соответствующие спектры КД и поглощения до и после добавления в эти дисперсные системы дистиллированной воды или гидрозоля НЧЗ представлены на рис. 5. Видно, что высказанное выше предположение подтверждается – действие НЧЗ на них заметно различается. Так, если при добавлении к ЖКД ДНК с 15%-м содержанием ПЭГ 200 мкл воды наблюдается превращение упорядоченной системы в изотропный раствор (кривые *2* и *4* на рис. 5а и 5б), то после внесения в эту систему такого же объема гидрозоля вид как спектра КД, так и спектра поглощения свидетельствует о сохранении холестерической дисперсной мезофазы (кривые *3* и *4* на тех же рисунках). В случае ЖКД ДНК с 21%-м содержанием ПЭГ падение амплитуды аномального КД-сигнала при ее титровании гидрозолем золота, напротив, значительно сильнее, чем в случае разбавления водой (кривые *2* и *3* на рис. 5в и 5г). Особенно интересен результат для дисперсии с 27%-м содержанием ПЭГ: при добавлении 200 мкл гидрозоля ее оптическая активность практически исчезает – амплитуда

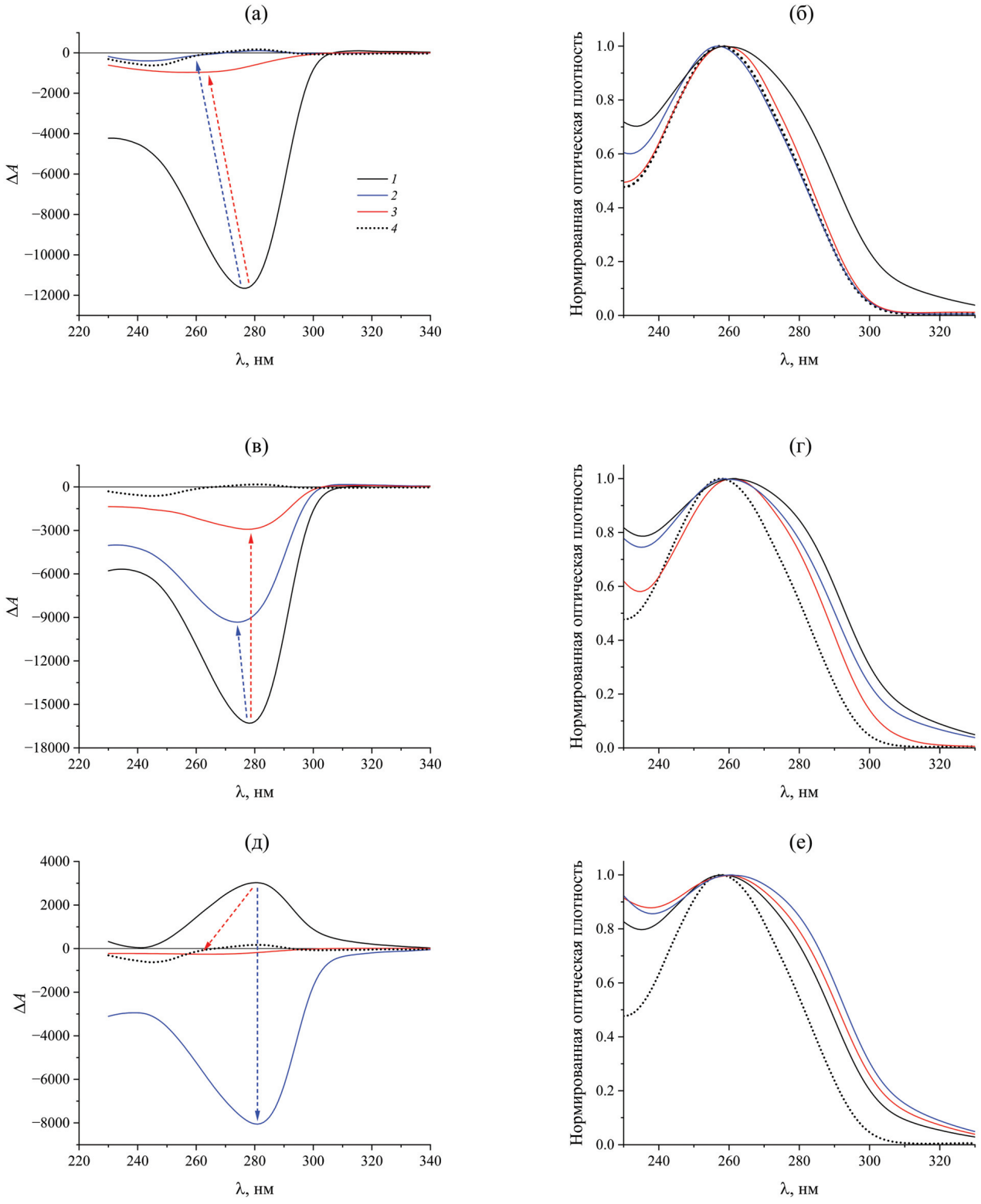


Рис. 5. Спектры КД и нормированные спектры поглощения исходных ЖКД ДНК с различным содержанием ПЭГ (*1*) и тех же систем после добавления 200 мкл дистиллированной воды (*2*) или золя НЧЗ (*3*; 19.33×10^{-8} М частиц). Содержание ПЭГ (масс. %): а, б – 15, в, г – 21, д, е – 27. Нормирование спектров поглощения в каждом случае проведено на соответствующее пиковое значение оптической плотности. В качестве контроля использованы обозначенные пунктиром спектры КД и поглощения изотропного раствора ДНК (*4*).

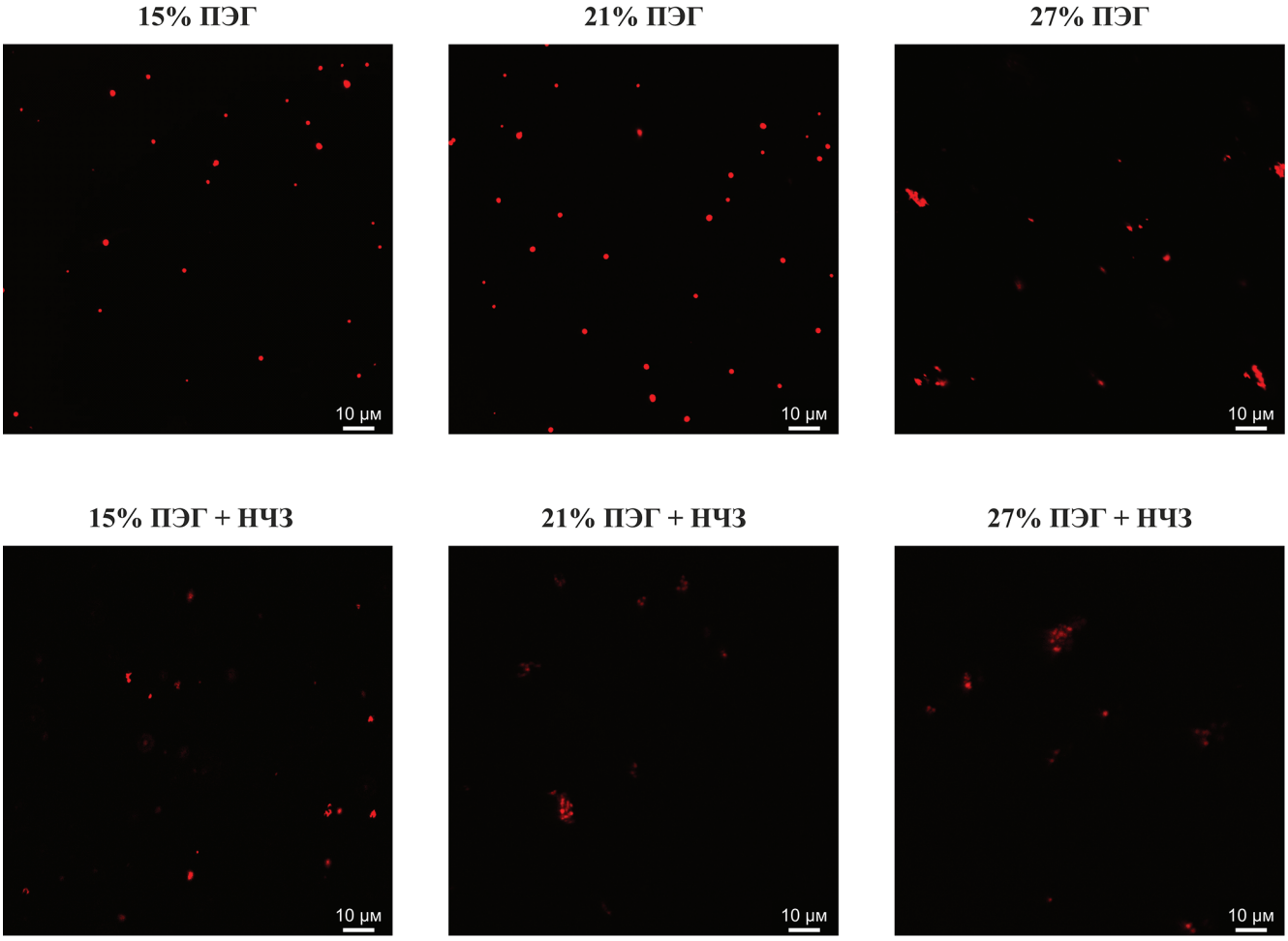


Рис. 6. Микрофотографии исходных образцов ЖКД ДНК, сформированных при разном содержании ПЭГ (верхний ряд), и тех же систем после добавления 200 мкл золя НЧЗ (нижний ряд).

КД-сигнала оказывается даже меньше сигнала изотропного раствора ДНК (кривые *3* и *4* на рис. 5д). Спектр поглощения, однако, однозначно свидетельствует о сохранении в этом случае фазового разделения (кривые *3* и *4* на рис. 5е).

Этот вывод подтверждается данными конфокальной микроскопии. На рис. 6 представлены микрофотографии частиц исследуемых ЖКД ДНК, окрашенных ДНК-специфичным флуоресцентным красителем SG. Видно, что разделение фаз ДНК и ПЭГ в присутствии НЧЗ сохраняется во всех образцах. Отметим также, что в полном соответствии с данными, полученными нами ранее (см. [32, 34]), с ростом концентрации ПЭГ наблюдается агрегация частиц дисперсии – наряду с “классическими” частицами сферической формы и субмикронного/микронного размера видны их крупные несимметричные агрегаты в форме гроздьев.

Рассмотрим различия в поведении ЖКД ДНК с разным содержанием ПЭГ более подробно и для этого сравним зависимости $\Delta A/\Delta A_0$ и δ от V, полученные при титровании этих систем дистиллированной водой и гидрозолем НЧЗ (рис. 7). В первую очередь отметим, что тенденция линейного изменения амплитуды аномального КД-сигнала при разбавлении водой наблюдается для всех из них. Обратим также внимание на то, что инверсия КД-сигнала в системе с 27%-м содержанием ПЭГ происходит без какого-либо скачка. Оценим теперь действие НЧЗ. Хорошо видно, что в системе с 15%-м содержанием ПЭГ они вплоть до концентрации 6.57×10^{-8} М (т.е. вплоть до введения в систему 60 мкл гидрозоля) не оказывают сколь-нибудь значимого структурного эффекта (рис. 7а и 7б). Можно предположить, что “большие” (относительно размеров НЧЗ) межмолекулярные расстояния позволяют им свободно проникать в частицы дисперсии, а уменьшение амплитуды аномального КД-сигнала в этом случае обусловлено исключительно ее разбавлением. Вместе с тем НЧЗ

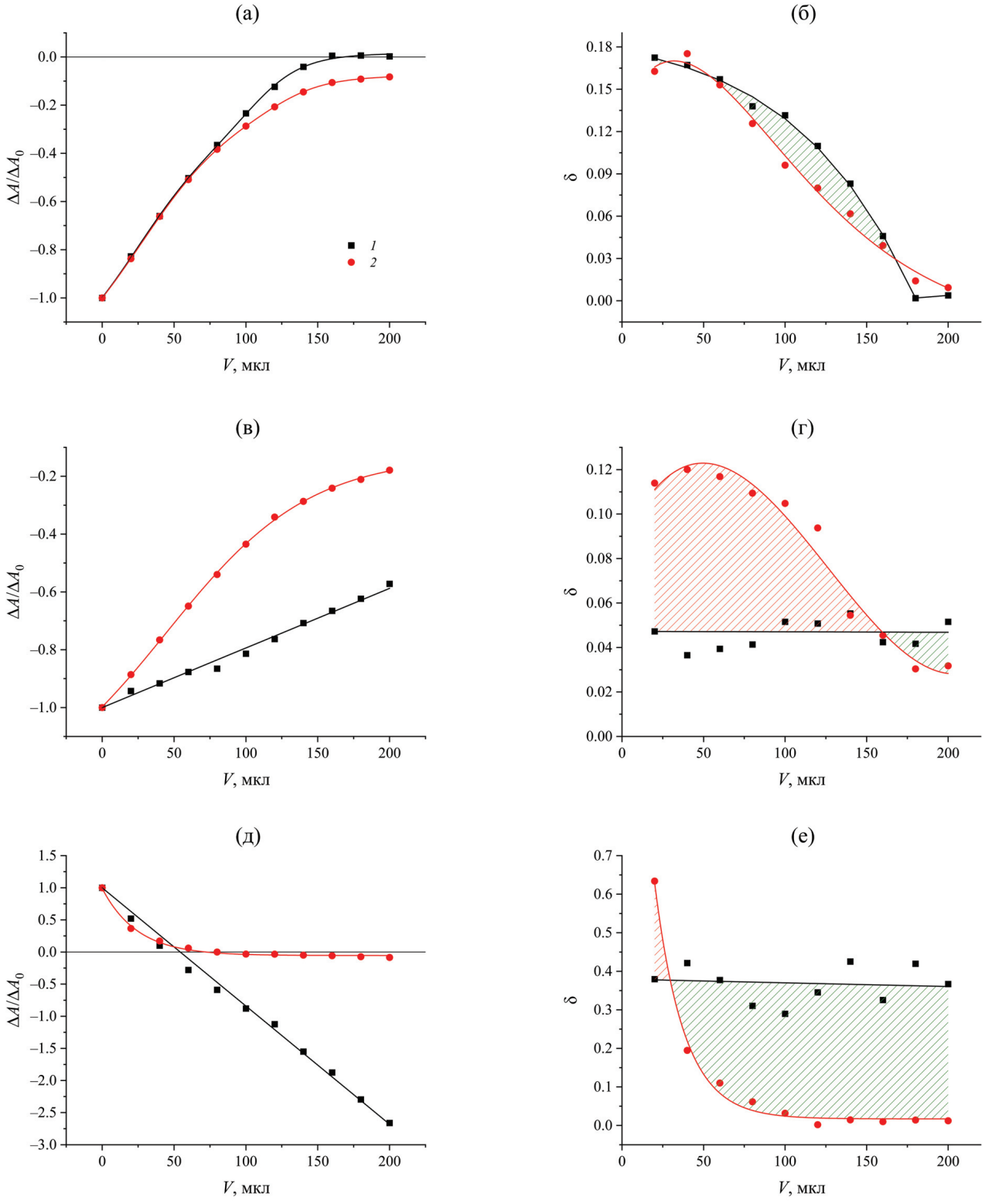


Рис. 7. Зависимости пиковой интенсивности КД-полосы, нормированной на абсолютное значение амплитуды сигнала для соответствующего контрольного образца (а, в, д), и рассчитанных значений δ (б, г, е) от вносимого объема дистиллированной воды (*1*) и гидрозоля НЧЗ (*2*) в ЖКД ДНК с разным содержанием ПЭГ (масс. %): 15 (а, б), 21 (в, г), 27 (д, е). Стандартные отклонения, рассчитанные по трем независимым измерениям, не превышают 7% (а, в, д) и 14% (б, г, е).

несколько стабилизируют структуру частиц ЖКД ДНК, начиная с концентрации 8.59×10^{-8} М (т.е. после введения в нее 80 мкл гидрозоля). Тот факт, что сами по себе НЧЗ не оказывают деструктивного эффекта, но при этом способствуют сшивке холестерических слоев, может косвенно свидетельствовать об образовании ими кластеров. Для системы с 21%-м содержанием ПЭГ деструктивное действие НЧЗ, напротив, ярко выражено (рис. 7в и 7г). По-видимому, "свободного" пространства для их беспрепятственного проникновения в частицы ЖКД в этом случае уже недостаточно, поэтому НЧЗ, взаимодействуя с молекулами ДНК, сильно возмущают их упорядоченную организацию. Другими словами, доступных центров связывания НЧЗ еще довольно много, однако "сопротивление" системы возрастает. Вместе с тем, можно предположить, что в результате раздвижения холестерических слоев могут возникать и новые центры связывания. Размеры "красной" области в этом случае являются наибольшими по сравнению с таковыми для других рассмотренных в настоящей работе систем. Стабилизирующее действие НЧЗ оказывается при этом довольно слабым. При 27%-м содержании ПЭГ частицы ЖКД ДНК очень быстро насыщаются НЧЗ (рис. 7д и 7е): межмолекулярные расстояния уже не позволяют им в большом количестве проникать внутрь, кроме того, их проникновение может значительно ограничиваться "сопротивлением" системы, в том числе из-за более высокого осмотического давления (≈15.3 атм *vs* ≈3.4 атм при 15% ПЭГ и ≈7.9 атм при 21% ПЭГ; методика расчета детально описана в [58]). Столь быстрый выход зависимости $\Delta A/\Delta A_0$ от V на плато ставит вопрос о взаимосвязи эффективности сшивания молекул ДНК, свободного расстояния между ними и размеров кластеров НЧЗ. Отметим, что возникновение межмолекулярных сшивок уже при низких концентрациях НЧЗ также может ограничивать количество НЧЗ, проникающих затем в частицы дисперсии.

Суммируя полученные результаты, можно отметить весьма интересное поведение зависимости отношения площадей "красной" и "зеленой" областей на графиках зависимости δ от V. Если при 15%-м содержании полимера в системе эта величина равна ≈0.90, то затем она увеличивается до ≈1.08 при [ПЭГ] = 18% и до ≈1.78 при [ПЭГ] = 21%. Далее наблюдается ее резкое падение до ≈0.01 при значении [ПЭГ] = 24%, которое, к слову, практически совпадает с отвечающим переходу от отрицательного КД-сигнала к положительному. При дальнейшем увеличении содержания ПЭГ в системе величина отношения площадей снова начинает возрастать: при [ПЭГ] = 27% она равна ≈0.21, а при [ПЭГ] = 30% составляет уже ≈0.58. Так наглядно проявляется взаимосвязь расстояния между соседними молекулами ДНК в частицах ее ЖКД и эффективности проникновения НЧЗ в эти частицы. Отметим также, что во всех случаях "зеленая" область на зависимости δ(V) идет после "красной" – это подтверждает предположение о том, что НЧЗ сначала нужно проникнуть в частицы дисперсии, возмущая при этом их упорядоченную внутреннюю структуру, чтобы затем обеспечить ее же стабилизацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, резюмируем основные выводы настоящего исследования. НЧЗ оказывают дуальное действие на ЖКД ДНК: с одной стороны, их встраивание между соседними молекулами нуклеиновой кислоты возмущает упорядоченную структуру частиц дисперсии, с другой – образование межмолекулярных сшивок с участием НЧЗ обусловливает стабилизацию упаковки ДНК. Два этих на первый взгляд антагонистичных процесса тесно связаны, причем "стабилизация" фактически оказывается следствием "разрушения". Кроме того, оба этих эффекта НЧЗ зависят от плотности упаковки ДНК в частицах ее ЖКД, задаваемой осмотическими условиями (в частности, содержанием ПЭГ). При низких концентрациях ПЭГ расстояния между соседними молекулами ДНК позволяют НЧЗ свободно проникать в частицы дисперсии, практически не оказывая деструктивного воздействия на их упорядоченную структуру. С ростом осмотического давления раствора ПЭГ проникновение НЧЗ ограничивается, с одной стороны, уменьшением межмолекулярных расстояний, а с другой, "сопротивлением" системы оказываемому ими возмущению. Вместе с тем близость соседних молекул ДНК значительно упрощает образование сшивок – при высоких концентрациях ПЭГ даже весьма небольшие количества НЧЗ могут стабилизировать внутреннюю структуру частиц ЖКД. Возможности появления дополнительных центров связывания НЧЗ, равно как и существования стерических ограничений на проникновение НЧЗ в частицы дисперсии из-за уже сформировавшихся межмолекулярных сшивок, пока не определены. В целом, полученные данные подтверждают существующие представления о том, что введение НЧЗ в холестерическую ЖКД ДНК приводит к потере ее частицами оптической активности при сохранении самой дисперсной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по заданию Министерства науки и высшего образования РФ. Авторы выражают благодарность М. С. Стальцову (НИЯУ МИФИ) за помощь в исследовании характеристик синтезированных наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hegmann T., Qi H., Marx V.M.* Nanoparticles in liquid crystals: Synthesis, self-assembly, defect formation and potential applications // Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. 2007. V. 17. P. 483–508. https://doi.org/10.1007/s10904-007-9140-5
2. *Stamatoiu O., Mirzaei J., Feng X. et al.* Nanoparticles in liquid crystals and liquid crystalline nanoparticles. In: Tschierske C. (eds) Liquid Crystals. Topics in Current Chemistry, vol 318. Berlin: Springer, 2012. https://doi.org/10.1007/128_2011_233
3. *Smaisim G.F., Mohammed K.J., Hadrawi S.K. et al.* Properties and application of nanostructure in liquid crystals: Review // BioNanoScience. 2023. V. 13. P. 819–839. https://doi.org/10.1007/s12668-023-01082-5
4. *Knight D.P., Vollrath F.* Biological liquid crystal elastomers // Philosophical Transactions of the Royal Society B. 2002. V. 357. № 1418. P. 155–163. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1030
5. *Saleem S., Muhammad G., Iqbal M.M. et al.* Polysaccharide-based liquid crystals. In: Inamuddin, Ahamed M.I., Boddula R., Altalhi T. (eds) Polysaccharides: Properties and applications. Hoboken: Wiley, 2021. https://doi.org/10.1002/9781119711414.ch27
6. *Brandes R., Kearns D.R.* Magnetic ordering of DNA liquid crystals // Biochemistry. 1986. V. 25. № 20. P. 5890–5895. https://doi.org/10.1021/bi00368a008
7. *Strzelecka T.E., Davidson M.W., Rill R.L.* Multiple liquid crystal phases of DNA at high concentrations // Nature. 1998. V. 331. P. 457–460. https://doi.org/10.1038/331457a0
8. *Livolant F., Maestre M.F.* Circular dichroism microscopy of compact forms of DNA and chromatin in vivo and in vitro: Cholesteric liquid-crystalline phases of DNA and single dinoflagellate nuclei // Biochemistry. 1988. V. 27. № 8. P. 3056–3068. https://doi.org/10.1021/bi00408a058
9. *Zakharova S.S., Jesse W., Backendorf C. et al.* Liquid crystal formation in supercoiled DNA solutions // Biophysical Journal. 2002. V. 83. № 2. P. 1119–1129. https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75235-1
10. *Nakata M., Zanchetta G., Chapman B.D. at el.* End-to-end stacking and liquid crystal condensation of 6 to 20 base pair DNA duplexes // Science. 2007. V. 318. № 5854. P. 1276–1279. https://doi.org/10.1126/science.1143826
11. *Olesiak-Banska J., Gordel M., Matczyszyn K. et al.* Gold nanorods as multifunctional probes in a liquid crystalline DNA matrix // Nanoscale. 2013. V. 5. P. 10975–10981. https://doi.org/10.1039/c3nr03319h
12. *De Sio L., Annesi F., Placido T. et al.* Templating gold nanorods with liquid crystalline DNA // Journal of Optics. 2015. V. 17. № 2. P. 025001. https://doi.org/10.1088/2040-8978/17/2/025001
13. *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
14. *Brach K., Olesiak-Banska J., Waszkielewicz M. et al.* DNA liquid crystals doped with AuAg nanoclusters: One-photon and two-photon imaging // Journal of Molecular Liquids. 2018. V. 259. P. 82–87. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.108
15. *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
16. *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
17. *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
18. *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
19. *Попенко В.И., Леонова О.Г., Салянов В.И. и др.* Динамика проникновения “твердых” наноконструкций на основе комплексов двухцепочечной ДНК с гадолинием в клетки CHO // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 5. С. 853–860. https://doi.org/10.7868/s0026898413050170
20. *Скуридин С.Г., Верещагин Ф.В., Гусев В.М. и др.* Использование частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК в качестве биодатчика для определения наличия и концентрации доксорубицина в растворах и плазме крови // Жидкие кристаллы и их практическое использование. 2020. Т. 20. № 3. С. 80–91. https://doi.org/10.18083/lcappl.2020.3.80
21. *Колыванова М.А., Лифановский Н.С., Никитин Е.А. и др.* О новом подходе к изучению и оценке эффективности ДНК-специфичных радиопротекторов // Химия высоких энергий. 2024. Т. 58. № 1. В печати
22. *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.

23. *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

24. *Евдокимов Ю.М., Салянов 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.

25. *Евдокимов Ю.М., Штыкова Э.В., Салянов В.И. и др.* Линейные кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК // Биофизика. 2013. Т. 58. № 2. С. 210–220.

26. *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

27. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов 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.

28. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов В.И. и др.* Новый нанобиоматериал – частицы жидкокристаллических дисперсий ДНК со встроенными кластерами из наночастиц золота // Российские нанотехнологии. 2014. Т. 9. № 3–4. С. 82–89.

29. *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. https://doi.org/10.31857/s0023119321050089

30. *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

31. *Климович М.А., Колыванова М.А., Дементьева О.В. и др.* Влияние старения ультрамалых наночастиц золота на их взаимодействие с холестерическими микрочастицами ДНК // Коллоидный журнал. 2023. Т. 85. № 5. С. 583–592. https://doi.org/10.31857/s0023291223600542

32. *Morozov V.N., Klimovich M.A., Shibaeva A.V. et al.* Optical polymorphism of liquid–crystalline dispersions of DNA at high concentrations of crowding polymer // International Journal of Molecular Sciences. 2023. V. 24. № 14. P. 11365. https://doi.org/10.3390/ijms241411365

33. *López Zeballos N.C., Gauna G.A., García Vior M.C. et al.* Interaction of cationic phthalocyanines with DNA. Importance of the structure of the substituents // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2014. V. 136. P. 29–33. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.013

34. *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

35. *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

36. *Dragan A.I., Pavlovic R., McGivney J.B. et al.* SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA // Journal of Fluorescence. 2012. V. 22. № 4. P. 1189–1199. https://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8

37. *Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P.* A new hydrosol of gold clusters // Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. 1993. № 1. P. 96–98. https://doi.org/10.1039/c39930000096

38. *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

39. *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

40. *Морозов П.А., Ершов Б.Г., Абхалимов Е.В. и др.* Влияние озона на плазмонное поглощение гидрозолей золота: Квазиметаллические и металлические наночастицы // Коллоидный журнал. 2012. Т. 74. № 4. С. 522–529.

41. *Дементьева О.В., Карцева М.Е., Сухов В.М. и др.* Температурно-временная эволюция ультрамалых затравочных наночастиц золота и синтез плазмонных нанооболочек // Коллоидный журнал. 2017. Т. 79. № 5. С. 562–568. https://doi.org/10.7868/S0023291217050056

42. *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

43. *Zimbone M., Baeri P., Calcagno L. et al.* Dynamic light scattering on bioconjugated laser generated gold

nanoparticles // PLoS One. 2014. V. 9. № 3. P. e89048. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089048

44. *Alba-Molina D., Martín-Romero M.T., Camacho L. et al.* Ion-mediated aggregation of gold nanoparticles for light-induced heating // Applied Sciences. 2017. V. 7. № 9. P. 916. https://doi.org/10.3390/app7090916
45. *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
46. *Евдокимов Ю.М.* Наночастицы золота и жидкие кристаллы ДНК // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2015. Т. 56. № 3. С. 147–157.
47. *Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Семенов С.В. и др.* Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК. Москва: Радиотехника. 2008.
48. *Yevdokimov Y.M., Skuridin S.G., Semenov S.V. et al.* Re-entrant cholesteric phase in DNA liquid-crystalline dispersion particles // Journal of Biological Physics. 2017. V. 43. № 1. P. 45–68. https://doi.org/10.1007/s10867-016-9433-4
49. *Ramos J.E.B., de Vries R., Neto J.R.* DNA psi-condensation and reentrant decondensation: Effect of the PEG degree of polymerization // The Journal of Physical Chemistry B. 2005. V. 109. № 49. P. 23661–23665. https://doi.org/10.1021/jp0527103
50. *Oh Y.S., Park J.H., Han S.W. et al.* Retained binding mode of various DNA-binding molecules under molecular crowding condition // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2018. V. 36. № 12. P. 3035–3046. https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1375992
51. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов В.И. и др.* Множественность "возвратных" холестерических структур в жидкокристаллических дисперсиях ДНК // Успехи физических наук. 2021. Т. 191. № 9. С. 999–1015. https://doi.org/10.3367/ufnr.2020.09.038843
52. *Sakurai S., Jo K., Kinoshita H. et al.* Guanine damage by singlet oxygen from SYBR Green I in liquid crystalline DNA // Organic & Biomolecular Chemistry. 2020. V. 18. P. 7183–7187. https://doi.org/10.1039/d0ob01723j
53. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов В.И. и др.* О пространственной организации двухцепочечных молекул ДНК в холестерической жидкокристаллической фазе и частицах этой фазы // Биофизика. 2015. Т. 60. № 5. С. 861–876.
54. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов В.И. и др.* Температурно-индуцированное изменение упаковки двухцепочечных линейных молекул ДНК в частицах жидкокристаллических дисперсий // Биофизика. 2016. Т. 61. № 3. С. 421–431.
55. *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
56. *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.
57. *Евдокимов Ю.М., Першина А.Г., Салянов В.И. и др.* Суперпарамагнитные наночастицы феррита кобальта "взрывают" упорядоченную пространственную упаковку двухцепочечных молекул ДНК // Биофизика. 2015. Т. 60. № 3. С. 428–436.
58. *Евдокимов Ю.М., Скуридин С.Г., Салянов В.И. и др.* "Возвратная" холестерическая фаза ДНК. Оптика и спектроскопия. 2017. Т. 123. № 1. С. 64–79. https://doi.org/10.7868/80030403417070066