

СУПЕРПАРАМАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ФЕРРИТА КОБАЛЬТА «ВЗРЫВАЮТ» УПОРЯДОЧЕННУЮ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ УПАКОВКУ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК

© 2015 г. Ю.М. Евдокимов, А.Г. Першина*, В.И. Салянов, А.А. Магаева**,
В.И. Попенко, Э.В. Штыкова***, Л.А. Дадинова***, С.Г. Скуридин

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

E-mail: yevdokim@imb.ru

**Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2;*

E-mail: allysyz@mail.ru

***Томский научный Центр Сибирского отделения РАН, 6340216 Томск, Академический просп. 10/3;*

****Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59;*

E-mail: viwopix@yachoo.ru

Поступила в редакцию 11.02.15 г.

Рассмотрено формирование холестерических жидкокристаллических дисперсий из двухцепочечных молекул ДНК, обработанных положительно заряженными суперпарамагнитными наночастицами феррита кобальта, а также действие этих наночастиц на жидкокристаллические дисперсии ДНК. Связывание магнитных наночастиц с линейными двухцепочечными молекулами ДНК в растворе высокой ионной силы (0,3 М NaCl) и последующее фазовое исключение таких комплексов из полиэтиленгликольсодержащего раствора приводит к тому, что формирование дисперсии, для частиц которой характерно пространственное спиральное расположение соседних двухцепочечных молекул ДНК, становится невозможным. При действии магнитных наночастиц на холестерическую жидкокристаллическую дисперсию ДНК (1 магнитная наночастица на 1 молекулу ДНК) происходит такое «возмущение» структуры молекул ДНК в местах связывания магнитных наночастиц, при котором упорядоченная пространственная структура частиц дисперсии ДНК «взрывается»; этот процесс сопровождается исчезновением как аномальной оптической активности, так и брэгговского пика на кривой малоуглового рассеяния. С учетом того, что физико-химические свойства частиц жидкокристаллических дисперсий двухцепочечной ДНК отражают особенности пространственной организации этих молекул в составе хромосом простейших, не исключено, что обнаруженный эффект может иметь важные биологические последствия.

Ключевые слова: жидкокристаллические дисперсии ДНК, суперпарамагнитные наночастицы феррита кобальта, круговой дихроизм, малоугловое рентгеновское рассеяние.

Ряд недавно опубликованных обзорных работ [1–7] посвящен анализу свойств гибридных материалов, образованных в результате диспергирования наночастиц в жидкокристаллических фазах низкомолекулярных соединений. Изучение таких материалов находится в фокусе интенсивных исследований в разных лабораториях; они обусловлены возможностями практического применения этих материалов (создание экранов для компьютеров, устройств для хра-

нения информации и т.д., и даже доставка лекарственных препаратов).

Нужно отметить, что хотя многие из этих работ посвящены анализу свойств жидких кристаллов низкомолекулярных соединений, обработанных наночастицами серебра или золота [8,9], начаты работы по действию таких наночастиц на жидкие кристаллы, образованные высокомолекулярными ДНК [10,11]. Результаты этих работ вызывают большой интерес с разных точек зрения. Этот интерес основан, прежде всего, на том, что в настоящее время установлены многие параметры, характеризующие физико-химические свойства и структуру частиц дисперсий ДНК [12]. В частности, показано, что частицы жидкокристаллических дисперсий

Сокращения: ЖКД ДНК – жидкокристаллическая дисперсия ДНК, ПЭГ – полиэтиленгликоль, КД – круговой дихроизм, МНЧ – магнитные наночастицы, УЗ – ультразвук, ХЖКД ДНК – холестерическая жидкокристаллическая дисперсия ДНК, МУР – малоугловое рентгеновское рассеяние.

(ЖКД) двухцепочечной ДНК (молекулярная масса $\sim (0,6-0,8) \cdot 10^6$ Да), образующиеся при фазовом исключении этих молекул из водно-полимерных растворов (в частности, раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ)) имеют размер около 500 нм, в состав каждой частицы входят $\sim 10^4$ молекул ДНК. Частицы дисперсии ДНК существуют в растворах ПЭГ, имеющих определенное осмотическое давление. Частицы характеризуются периодической структурой, расстояние между слоями которой может меняться в пределах от 2,9 до 5,0 нм в зависимости от осмотического давления раствора. Анизотропия молекул двухцепочечной ДНК приводит к тому, что каждый следующий слой из молекул ДНК в частице дисперсии повернут на определенный ($\sim 0,5^\circ$) угол по отношению к предыдущему. Такая закрутка приводит к формированию пространственно закрученной (холестерической) структуры частицы дисперсии ДНК, характерной особенностью которой является появление очень интенсивной (аномальной) полосы в спектре кругового дихроизма (КД) в области поглощения азотистых оснований ДНК [13]. С биологической точки зрения интерес к этим частицам обусловлен тем, что физико-химические свойства частиц ЖКД двухцепочечной ДНК отражают некоторые особенности пространственной организации этих макромолекул в составе хромосом Protozoa (например, хромосом Dinoflagellate), ДНК-содержащих бактерий и головок спермиев.

В результате проведенных исследований было показано, что наночастицы золота при низкой концентрации не только «запрещают» упорядоченную упаковку молекул двухцепочечной ДНК, но и нарушают спиральную структуру частиц ЖКД ДНК [15,16]. Этот эффект может быть одной из причин генотоксического действия этих наночастиц [17].

Цель настоящей работы – определение эффектов, которые могут быть вызваны действием другого типа наночастиц, а именно суперпарамагнитных наночастиц (МНЧ) феррита кобальта, на формирование и свойства ЖКД ДНК. Следует отметить, что, несмотря на целый ряд обзоров и обзорных статей [18–22], в которых анализируются свойства МНЧ, механизмы их взаимодействия с молекулами ДНК остаются малоизученными, а вопрос о возможности потенциального токсического (генотоксического) действия этих наночастиц остается практически без ответа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МНЧ получали методом механохимического синтеза с использованием кристаллогидратов солей. Детали метода подробно описаны в работе [23].

Оценка показывает, что в 1 мг порошка МНЧ содержится $1,32 \cdot 10^{15}$ наночастиц. Перед использованием исходную суспензию МНЧ разбавляли 0,3 М NaCl до концентрации 1,5 мг/мл ($1,98 \cdot 10^{15}$ МНЧ/мл) и готовили серию растворов с разным содержанием МНЧ (суспензии А). Поскольку МНЧ обладают склонностью к агрегации [19,21], агрегаты в суспензиях А разрушали с помощью ультразвукового (УЗ) диспергатора «УЗДН-2Т» (Россия; частота 22 кГц, температура $\sim 0^\circ\text{C}$, время УЗ-обработки 5 мин). Известная степень разбавления серии суспензий А и измерение их поглощения при 400 нм использовано для построения зависимости оптической плотности суспензий от концентрации МНЧ. Сохранение прямолинейной зависимости свидетельствует о том, что при разбавлении суспензий в них меняется лишь концентрация МНЧ (без существенного изменения размера или формы самих наночастиц). После низкоскоростного центрифугирования серии растворов А (центрифуга MPW-251 (Польша); 6000 об/мин, температура 22°C , 4 мин) отбирали супернатанты (суспензии Б) и регистрировали оптическую плотность этих суспензий. Для суспензий серии Б также наблюдается прямолинейная зависимость оптической плотности от разбавления, что подтверждает постоянство размера и формы МНЧ в суспензиях серии Б. Поэтому данные, полученные для суспензий серии А, можно использовать для определения концентрации МНЧ в суспензиях серии Б. В результате описанной процедуры приготовления в полученных супернатантах (серия Б) остается 5% исходного (серия А) количества МНЧ.

При помощи электронного микроскопа Jem-100CX (Jeol, Япония) оценивали средний размер МНЧ в суспензиях серии А и Б. На рис. 1а,б, в качестве примера, показан вид МНЧ, а на рис. 1в – гистограмма размеров МНЧ, приготовленных в разных условиях. Согласно оценкам, в суспензиях А и Б диаметр сферических МНЧ лежит в пределах от 4 до 6,5 нм, что вполне соответствует результатам, полученным ранее [20]. На пленке-подложке, используемой для электронной микроскопии, эти наночастицы образуют агрегаты, которые (при использованной процедуре приготовления) состоят из разного числа МНЧ (в зависимости от их концентрации).

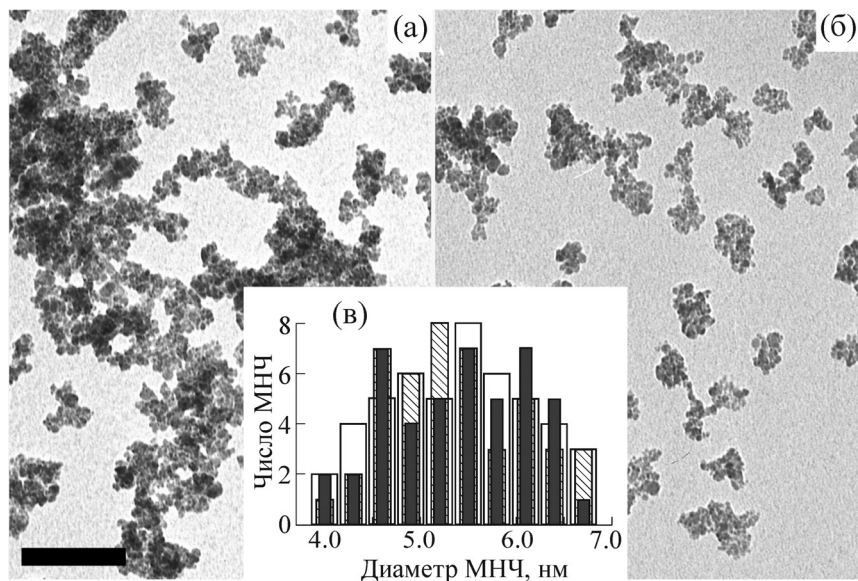


Рис. 1. Электронные микрофотографии магнитных наночастиц (а, б), использованных в работе, и распределение МНЧ по размеру (в). (а) – Концентрация МНЧ $1,32 \cdot 10^{15}$ частиц/мл (1 мг/мл). Раствор А после приготовления подвергли УЗ-обработке, но не центрифугировали. (б) – Концентрация МНЧ $0,462 \cdot 10^{14}$ частиц/мл (0,035 мг/мл). Супернатант получен после центрифугирования раствора А. (в) – Разные столбики соответствуют разным сериям определения размера МНЧ. Отметка на рисунке соответствует 100 нм.

МНЧ имели положительный заряд; их ξ -потенциал при нейтральных значениях рН составлял около 15 мВ.

Суспензии серии Б использовали для приготовления комплексов с двухцепочечной ДНК, смешивая фиксированные объемы суспензии Б с определенным объемом водно-солевого раствора ПЭГ, содержащего холестерическую жидкокристаллическую дисперсию ДНК (ХЖКД ДНК).

Использовали дополнительно очищенный от примесей и деполимеризованный препарат ДНК из тимуса крупного рогатого скота (Sigma, США) с молекулярной массой $(0,6-0,8) \cdot 10^6$ Да. Концентрацию ДНК в водно-солевых растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением молярного коэффициента поглощения ($\lambda = 258,4$ нм, $\epsilon_{\max} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Препарат ПЭГ (Serva, Германия; молекулярная масса 4000 Да) использовали без дополнительной очистки.

ХЖКД ДНК в ПЭГ-содержащих водно-солевых растворах формировали в соответствии с методикой, описанной ранее [12].

Магнитными наночастицами (суспензии серии Б), полученными описанным выше способом, обрабатывали как исходные линейные молекулы двухцепочечной ДНК, так и ХЖКД ДНК.

Спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали при помощи спектрофотометра Cary 100 Scan (Varian, США), а спектры кругового дихроизма – при помощи портативного дихрометра СКД-2 (разработка Института спектроскопии РАН, г. Троицк). Спектры КД представляли в виде зависимости разности интенсивности поглощения лево- и правополяризованного света (ΔA ; $\Delta A = (A_L - A_R)$) от длины волны (λ) [13]

Для структурного анализа использовали осадок фазы ДНК ($\sim 1,5$ мг), полученный при помощи низкоскоростного центрифугирования (центрифуга К-23, Германия; 6000 об/мин, температура 4°C , 40 мин) частиц ХЖКД ДНК, обработанных МНЧ. Измерения проводили методом традиционного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУР) на усовершенствованном лабораторном дифрактометре АМУР-К (разработка СКБ Института кристаллографии РАН, Москва) при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0,1542 нм, с применением геометрии Кратки [24] в области значений волновых векторов в интервале $0,12 < s < 10,0 \text{ nm}^{-1}$ (где: $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, 2θ – угол рассеяния). Полученные экспериментальные данные нормировали на интенсивность падающего пучка, после чего в них вводили поправку на коллимационные искажения в соответствии со стандартной процедурой [25].

Первичную обработку экспериментальных данных МУР проводили при помощи программы PRIMUS, а анализ брэгговских пиков на кривых малоуглового рассеяния – при помощи программы PEAK [26].

Для анализа распределений по размерам структурных неоднородностей в исследуемых образцах использовалась диалоговая программа GNOM [27] в соответствующей моде (для полидисперсных рассеивающих объектов).

Детали всех использованных программ, приемов обработки данных МУР и использованные при этом параметры (d – период структуры (межплоскостное расстояние), L – размер кристаллитов, Δ/d – степень разупорядоченности) подробно описаны в работе [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

КД-спектры дисперсий, образованных из линейных двухцепочечных молекул ДНК, обработанных магнитными наночастицами. Как было отмечено выше, фазовое исключение линейных, жестких, двухцепочечных молекул ДНК из водно-солевого раствора ПЭГ сопровождается формированием ХЖКД, имеющей аномальную полосу в спектре КД.

С учетом возможности взаимодействия между положительно заряженными МНЧ и линейными двухцепочечными молекулами ДНК [20,21,29], а также с учетом возможного изменения аномальных оптических свойств ХЖКД при таком взаимодействии ХЖКД были сформированы из молекул ДНК, обработанных МНЧ.

На рис. 2 сопоставлены КД-спектры ХЖКД, сформированной из исходных линейных двухцепочечных молекул ДНК (кривая 1) в водно-солевом (0,3 М NaCl) растворе ПЭГ, и дисперсий, сформированных в этих же условиях из линейных двухцепочечных молекул ДНК, обработанных МНЧ (кривые 2–7). На врезке на рис. 2 показана зависимость амплитуды (ΔA при $\lambda = 270$ нм) аномальной отрицательной полосы в спектре кругового дихроизма ХЖКД ДНК от концентрации МНЧ. Видно, что уменьшение величины ΔA начинается при концентрации МНЧ, соответствующей величине $R \sim 0,02$. (R – число МНЧ, приходящихся на 1 молекулу ДНК.) Чем выше содержание МНЧ в растворе, т.е. чем большее число МНЧ приходится на 1 молекулу ДНК, тем меньше величина ΔA в спектре КД. «Критическая» величина R , начиная с которой величина ΔA практически не меняется, составляет 0,5, т.е. 5 МНЧ приходится на 10 молекул двухцепочечной ДНК

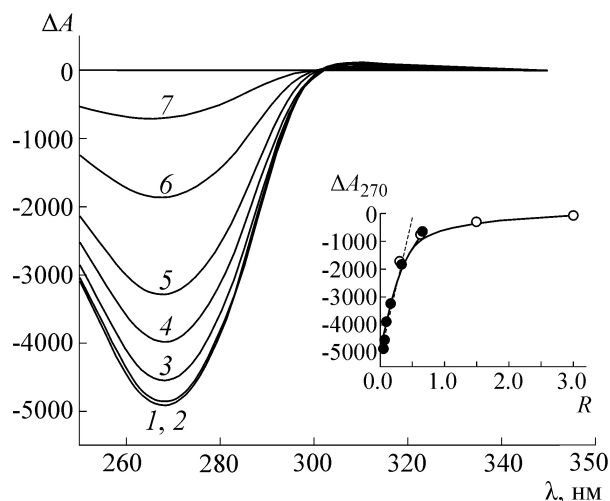


Рис. 2. КД-спектры ХЖКД, сформированных из линейных молекул двухцепочечной ДНК, предварительно обработанных разными концентрациями магнитных наночастиц: 1 – $C_{\text{МНЧ}} = 0$ ($R = 0$); 2 – $C_{\text{МНЧ}} = 0,025 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 0,0325$); 3 – $C_{\text{МНЧ}} = 0,05 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 0,065$); 4 – $C_{\text{МНЧ}} = 0,075 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 0,098$); 5 – $C_{\text{МНЧ}} = 0,125 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 0,165$); 6 – $C_{\text{МНЧ}} = 0,25 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 0,330$); 7 – $C_{\text{МНЧ}} = 0,5 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 0,659$). R – отношение числа МНЧ к числу молекул ДНК в растворе. $C_{\text{ДНК}} = 10$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг/мл; 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер. $\Delta A = (A_L - A_R) \cdot 10^{-6}$ опт. ед.; $l = 1$ см. На врезке: зависимость амплитуды полосы в КД-спектре ХЖКД ДНК ($\lambda = 270$ нм) от величины R .

(или одна наночастица связывает две молекулы двухцепочечной ДНК).

Существует ряд причин уменьшения амплитуды аномальной полосы в КД-спектре ХЖКД ДНК.

Во-первых, пользуясь разными методами, в работе [20] показано, что ионы кобальта и железа на поверхности МНЧ, образующих слабосвязанные агрегаты, взаимодействуют с атомами кислорода фосфатных групп ДНК. Связывание МНЧ с молекулами двухцепочечной ДНК зависит от нуклеотидного состава этих макромолекул [21]. Возможное преимущественное связывание МНЧ с ГЦ-парами двухцепочечной ДНК может сопровождаться искажением вторичной структуры этой молекулы [21]. Поэтому фиксация МНЧ вблизи поверхности фрагментов молекул двухцепочечной ДНК, имеющих специфическую последовательность оснований [20,21], может приводить к тому, что число линейных молекул двухцепочечной ДНК с ненарушенной вторичной структурой и, следовательно, способных к упорядоченной пространственной упаковке, может уменьшаться.

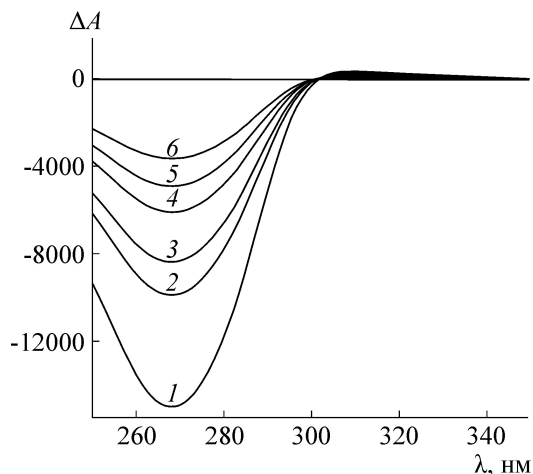


Рис. 3. КД-спектры ХЖКД ДНК, зарегистрированные через разные промежутки времени после ее обработки магнитными наночастицами (мин): 1 – 0; 2 – 3; 3 – 15; 4 – 60; 5 – 140; 6 – 210. $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл; $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг/мл; $0,3 \text{ M NaCl} + 0,002 \text{ M Na}^+$ -фосфатный буфер; $C_{\text{МНЧ}} = 2,258 \cdot 10^{13}$ частиц/мл ($R = 1,0$). R – отношение числа МНЧ к числу молекул ДНК в растворе. $\Delta A = (A_L - A_R) \cdot 10^{-6}$ опт. ед.; $l = 1$ см.

Во-вторых, известно, что величина ΔA связана с углом закрутки пространственной структуры частиц ХЖКД ДНК. Такая закрутка определяется в момент «узнавания» молекул двухцепочечной ДНК при их сближении. Энергетический вклад, связанный с закруткой соседних молекул ДНК («хиральное взаимодействие»), – достаточно малый вклад в электростатическое или ван-дер-ваальсово взаимодействие этих молекул, при этом хиральное взаимодействие крайне чувствительно к наличию наночастиц, связанных с молекулами ДНК [29–32]. Поэтому связывание даже небольшого числа МНЧ с молекулами ДНК или наличие агрегатов МНЧ между молекулами двухцепочечной ДНК, сближающимися в процессе фазового исключения, может оказаться достаточным для того, чтобы эти молекулы образовывали не спирально закрученную (холестерическую), а нематическую структуру, т.е. структуру, в которой соседние молекулы в квазинематическом слое ориентируются просто вдоль «директора». (Нематическая структура аномальной оптической активностью не обладает [12,13].)

Наконец, не исключено, что при фазовом исключении линейных двухцепочечных молекул ДНК, связанных с поверхностью МНЧ, образуются просто неупорядоченные в пространстве агрегаты из молекул ДНК, также не обладающие аномальной оптической активностью.

Тот факт, что уменьшение аномальной полосы в спектре КД начинается при низкой концентрации МНЧ, свидетельствует, прежде всего, о том, что МНЧ должны быть каким-то образом связаны с молекулами двухцепочечной ДНК с тем, чтобы оказать воздействие на их упорядочение при фазовом исключении.

Таким образом, в результате связывания достаточно небольшого числа положительно заряженных МНЧ с линейными молекулами двухцепочечной ДНК становится невозможным (независимо от причин, вызывающих уменьшение амплитуды аномальной полосы в спектре КД) формирование из комплексов (двухцепочечная ДНК–МНЧ) дисперсии, для частиц которой характерно пространственно закрученное (спиральное) расположение соседних молекул двухцепочечной ДНК.

Действие магнитных наночастиц на предварительно сформированную ХЖКД двухцепочечной ДНК. На рис. 3 показаны КД-спектры ХЖКД, сформированной в водно-солевом ($0,3 \text{ M NaCl}$) растворе ПЭГ из исходных линейных молекул двухцепочечной ДНК (кривая 1), и этой же ХЖКД, обработанной суспензией МНЧ (кривые 2–6). Концентрация МНЧ выбрана такой, что она соответствует условиям, при которых 1 МНЧ приходится на 1 молекулу двухцепочечной ДНК (см. врезку на рис. 2, «звездочка»). Видно, что амплитуда аномальной отрицательной полосы в КД-спектре ХЖКД ДНК, обработанной МНЧ, уменьшается со временем. Оптический эффект достигает своего насыщения приблизительно через 4 ч.

Поскольку амплитуда аномальной полосы в КД-спектре ХЖКД двухцепочечной ДНК связана со спиральной закруткой пространственной структуры холестерика, наблюдаемое уменьшение амплитуды аномальной полосы во времени подтверждает факт связывания положительно заряженных МНЧ с молекулами двухцепочечной ДНК, образующими квазинематические слои в структуре частиц дисперсии, и свидетельствует о нарушении спиральной пространственной упаковки комплексов (ДНК–МНЧ).

Действительно, как было отмечено выше, связывание даже небольшого числа МНЧ с молекулами ДНК может приводить к уменьшению угла спиральной закрутки соседних молекул ДНК до нулевого значения. Раскрутка пространственной спиральной структуры частиц ХЖКД ДНК, т.е. нематизация структуры этих частиц, приводит, согласно теории [13], к уменьшению их аномальной оптической активности.

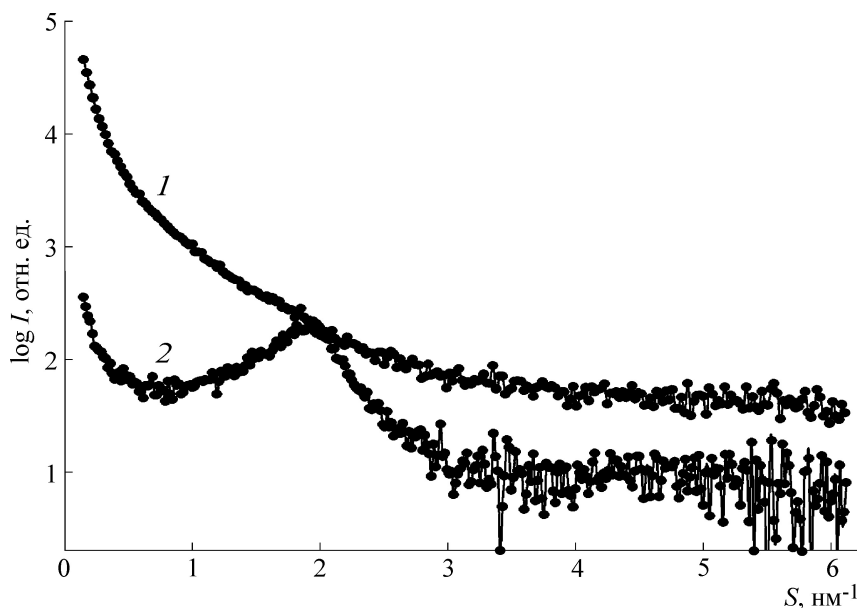


Рис. 4. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния на фазах, сформированных из частиц ХЖКД ДНК, обработанной магнитными наночастицами (кривая 1, $R = 1,0$), и частиц исходной ХЖКД ДНК (кривая 2, контроль ($R = 0$)).

Кроме того, не исключено, что связывание МНЧ с частицами ХЖКД ДНК (при условии, что 1 МНЧ приходится на 1 молекулу ДНК) вызывает столь сильное «возмущение» вторичной структуры этих молекул, что регулярная, упорядоченная упаковка соседних комплексов (двухцепочечная ДНК–МНЧ) становится стерически невозможной и пространственная спиральная структура частиц ХЖКД ДНК «взрывается» [1,5–7]. Этот процесс сопровождается исчезновением аномальной оптической активности.

Таким образом, приведенные выше результаты, отражающие разные варианты действия МНЧ на линейные или конденсированные молекулы двухцепочечной ДНК, показывают, что в ПЭГ-содержащем растворе высокой ионной силы (0,3 М NaCl) МНЧ, несущие положительный заряд, не только взаимодействуют с двухцепочечной ДНК [29], но и «запрещают» спиральное расположение соседних молекул ДНК.

Структурный анализ фазы, образованной из частиц ХЖКД ДНК, обработанной магнитными наночастицами. Для анализа использовали фазу, приготовленную из ХЖКД ДНК, обработанную магнитными наночастицами в условиях, при которых 1 МНЧ приходится на 1 молекулу двухцепочечной ДНК.

После низкоскоростного центрифугирования (6000 об/мин, температура 4°C, 40 мин) суспензии, полученной после обработки ХЖКД ДНК наночастицами и обладающей низкой ано-

мальной оптической активностью (рис. 3, кривая б), был получен осадок (фаза), от которого была измерена кривая МУР (рис. 4, кривая 1). В качестве контроля измеряли кривую МУР от холестерической жидкокристаллической фазы, полученной в результате низкоскоростного центрифугирования исходных частиц ХЖКД ДНК (рис. 4, кривая 2).

Из рис. 4 видно, что кривая МУР от образца холестерической жидкокристаллической фазы имеет характеристический брэгговский пик и практически не отличается от многократно измеренных ранее [12] образцов (таблица).

Здесь необходимо отметить следующее.

1. Неупорядоченные в пространстве агрегаты из молекул полимеров малоугловыми рентгеновскими рефлексами не обладают [33].

2. При «нематизации» пространственной структуры частиц ХЖКД ДНК, т.е. при переходе от спирально закрученного расположения слоев из молекул ДНК к их параллельному расположению, малоугловой рентгеновский рефлекс сохраняется и его величина практически не меняется [34].

3. Встраивание наночастиц золота (~ 2 нм) в «свободное» пространство между соседними молекулами ДНК, упорядоченными в структуре частиц ХЖКД, и формирование из них линейных кластеров сопровождается лишь незначительным изменением величины малоуглового рентгеновского рефлекса [35].

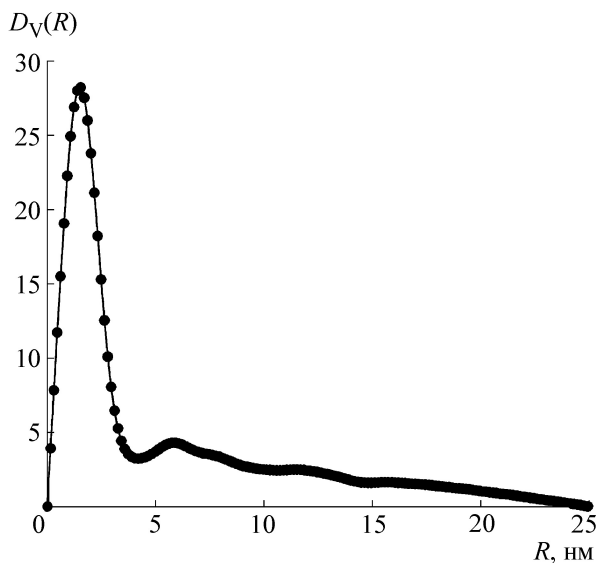


Рис. 5. Распределение магнитных наночастиц по размерам ($D_V(R)$) в составе фазы, полученной после обработки частиц исходной ХЖКД ДНК этими наночастицами ($R = 1,0$).

Следовательно, если бы при обработке ХЖКД ДНК магнитными наночастицами происходила просто «нематизация» пространственной структуры частиц дисперсии, то малоугловой рефлекс должен был сохраниться.

Однако из рис. 4 видно, что после обработки МНЧ исходной ХЖКД ДНК брегговский пик с положением s_{\max} на 1,9 нм исчезает (кривая 2). Это означает, что упорядоченная упаковка квазикристаллических областей в составе частиц ХЖКД двухцепочечной ДНК полностью разрушается. Образец этой фазы, содержащий МНЧ, имеет вид, характерный для полидисперсного вещества [25].

По начальной части кривой МУР в интервале от 0,2 до 2,0 нм⁻¹ было определено распределение МНЧ по размерам в составе фазы, полученной при обработке исходной ХЖКД ДНК этими наночастицами.

Кривая распределения МНЧ по размерам ($D_V(R)$) показана на рис. 5.

Распределение МНЧ по размерам показывает, что в сформированной фазе находятся (в основном) частицы с радиусом порядка 1–4 нм, но имеется также и некоторое количество более крупных частиц с радиусом 5–15 нм, что соответствует размеру слабосвязанных агрегатов из МНЧ. Такая оценка размеров сферических МНЧ и их агрегатов достаточно близка известным литературным данным [36], а также приведенным выше оценкам, основанным на измерении размера МНЧ при помощи электронной микроскопии.

Следовательно, отмеченный выше эффект уменьшения аномальной оптической активности частиц ХЖКД ДНК, наблюдаемый при их обработке МНЧ, в сочетании с отсутствием малоуглового рефлекса на кривой МУР, свидетельствует о практически полном разрушении упорядоченной упаковки комплексов (ДНК–МНЧ) в образованной фазе.

Иными словами, можно предполагать, что если даже МНЧ образуют агрегаты, то агрегат из слабосвязанных МНЧ, располагающийся вблизи концевых групп молекул двухцепочечной ДНК или вблизи поверхности этих молекул в составе частиц ХЖКД, выступает в роли «троянского коня», обеспечивая условия для диффузии единичных положительно заряженных МНЧ в «свободное» пространство между соседними молекулами ДНК. В этом случае МНЧ могут находить реакционноспособные группы молекул ДНК, к которым относятся, главным образом, фосфатные группы преимущественно ГЦ-пар, и взаимодействовать с ними [20,21]. Если учесть, что МНЧ могут выступать в качестве «сшивок» между фосфатными группами двухцепочечной ДНК [37], а соседние МНЧ склонны к образованию агрегатов, то можно предполагать, что связывание даже небольшого числа положительно заряженных МНЧ с отдельными фрагментами молекул ДНК приведет к тому, что, прежде всего, будет нарушаться структурный порядок в расположении этих фрагментов ДНК. Сопоставление рис. 3 и рис. 4 показывает, что происходящее во времени связывание МНЧ с молекулами двухце-

Структурные характеристики фазы, полученной из исходной ХЖКД ДНК

Образец	s_{\max} , нм ⁻¹ (± 0,1 нм)	\bar{d} , нм (± 0,1 нм)	L , нм (± 3,0 нм)	Δ/\bar{d}
Фаза ХЖКД ДНК	1,9	3,3	19	0,14

Примечания. s – волновой вектор ($s_{\max} = 4\pi\sin\theta/\lambda$; 2θ – угол рассеяния, λ – длина волны излучения, равная 0,1542 нм); \bar{d} – межплоскостное расстояние; L – размер кристаллитов; Δ/\bar{d} – степень разупорядоченности. Образец получен в результате низкоскоростного центрифугирования частиц ХЖКД ДНК, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ ($C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, $C_{\text{ПЭГ}} = 170$ мг/мл, 0,3 М NaCl + $2 \cdot 10^{-3}$ М Na⁺-фосфатный буфер).

почечной ДНК в составе частиц ХЖКД приводит к исчезновению упорядоченного расположения соседних молекул комплексов (двухцепочечная ДНК–МНЧ), т.е. происходит нарушение дальнего (оптического) порядка в расположении молекул этих комплексов, сопровождаемое их агрегацией и исчезновением как аномальной оптической активности (рис. 3), так и малоуглового рентгеновского рефлекса (рис. 4). Следовательно, в условиях, при которых на одну молекулу ДНК приходится одна МНЧ, формируется фаза, представляющая собой неупорядоченный агрегат из молекул двухцепочечной ДНК, связанных МНЧ.

Таким образом, положительно заряженные МНЧ, независимо от того, взаимодействуют ли они с линейными или с конденсированными молекулами двухцепочечной ДНК, «взрывают» упорядоченное пространственное расположение этих молекул. Если учесть, что физико-химические свойства частиц ЖКД двухцепочечной ДНК отражают особенности пространственной организации этих молекул в составе хромосом, то не исключено, что обнаруженный эффект может иметь важные биологические последствия [38].

ВЫВОДЫ

Связывание суперпарамагнитных положительно заряженных наночастиц феррита кобальта с линейными молекулами двухцепочечной ДНК в растворе высокой ионной силы (0,3 М NaCl) и последующее фазовое исключение таких комплексов из ПЭГ-содержащего раствора «запрещает» формирование дисперсии, для частиц которой характерно пространственно закрученное (спиральное) расположение соседних молекул двухцепочечной ДНК.

Связывание МНЧ с частицами ХЖКД ДНК (1 наночастица приходится на 1 молекулу ДНК) приводит к такому «возмущению» структуры молекул ДНК в местах связывания МНЧ, при котором упорядоченная пространственная структура частиц ХЖКД ДНК «взрывается»; этот процесс сопровождается исчезновением как аномальной оптической активности, так и характеристического брэгговского пика на кривой МУР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Hegmann, H. Qi, and V. M. Marx, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **17** (3), 483 (2007).
2. T. Kato, Yu. Hirai, S. Nakaso, and M. Moriyama, *Chem. Soc. Rev.* **36** (12), 1857 (2007).
3. H. Qi and T. Hegmann, *Liq. Cryst. Today* **20** (4), 102 (2011).
4. J. P. F. Lagerwall and G. Scalia, *Curr. Appl. Phys.* **12** (6) 1387 (2012).
5. G. L. Nealon, R. Greget, C. Dominguez, et al., *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 349 (2012). doi: 10.3762/bjoc.8.39.
6. O. Stamatoiu, J. Mirzaei, X. Feng, and T. Hegmann, *Top. Curr. Chem.* **318**, 331 (2012). doi: 10.1007/128_2011_233.
7. A. V. Ryzhkova and I. Musevic, *Phys. Rev.* **87** (3), 032501 (2013).
8. Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев, С. Ю. Щёголев и Н. Г. Хлебцов, *Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение* (Наука, М., 2008).
9. C. Louis and O. Pluchery, *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology* (Imperial College Press, London, 2012).
10. С. Г. Скуридин, В. А. Дубинская, В. М. Рудой и др., *Докл. РАН* **432** (6), 838 (2010).
11. Ю. М. Евдокимов, В. И. Сялянов, Е. И. Кац и С. Г. Скуридин, *Acta Naturae* **4** (4), 80 (2012).
12. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. V. Semenov, and S. G. Skuridin, *DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions* (CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton – London – New York, 2011).
13. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. G. Skuridin, et al., *The CD Spectra of Double-Stranded DNA Liquid-Crystalline Dispersions* (Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011).
14. A. Leforestier and F. Livolant, *J. Mol. Biol.* **396** (2), 384 (2010).
15. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, V. I. Salyanov, et al., *Жидкие кристаллы и их практическое применение* **14** (4), 5 (2014).
16. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. G. Skuridin, et al., *Russ. Chem. Rev.* **84** (1), 27 (2015).
17. С. Т. Захидов, Т. Л. Маршак, Е. А. Малонина и др., *Биол. мембраны* **27** (4), 349 (2010).
18. С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов и Г. Ю. Юрков, *Успехи химии* **74** (6), 539 (2005).
19. А. Г. Першина, А. Э. Сазонов и И. В. Мильто, *Бюл. сибирской мед.*, № 2, 70 (2008).
20. A. G. Pershina, A. E. Sazonov, D. V. Novikov, et al., *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11** (3), 2673 (2011).
21. A. G. Pershina, A. E. Sazonov, and V. D. Filimonov, *Russ. Chem. Rev.* **83** (4), 299 (2014).
22. Q. Mu, G. Jiang, L. Chen, et al., *Chem. Rev.* **114** (15), 7740 (2014).
23. Е. П. Найден, В. И. Итин, А. А. Магаева и др., *Изв. вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия*, № 1, 3 (2011).
24. Л. Ю. Могилевский, А. Т. Дембо, Д. И. Свергун и Л. А. Фейгин, *Кристаллография* **29** (3), 587 (1984).
25. L. A. Feigin and D. I. Svergun, *Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering* (Plenum Press, New York, 1987).
26. P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Sokolova, et al., *J. Appl. Cryst.* **36** (5), 1277 (2003).

27. D. I. Svergun, *J. Appl. Cryst.* **25** (Part 4), 495 (1992).
28. Ю. М. Евдокимов, Э. В. Штыкова, В. И. Сялянов и С. Г. Скуридин, *Биофизика* **58** (2), 210 (2013).
29. F. Paillusson, V. Dahirel, M. Jardat, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** (27), 2603 (2011).
30. V. Dahirel, F. Paillusson, M. Jardat, et al., *Phys. Rev. Lett.* **102** (22), 228101 (2009).
31. A. G. Cherstvy, *J. Phys. Chem. B* **112** (40), 12585 (2008).
32. A. A. Kornyshev, S. Leikin, and S. V. Malinin, *Eur. Phys. J. E* **7**, 83 (2002).
33. А. А. Тагер, *Физикохимия полимеров* (Химия, М., 1978).
34. Ю. М. Евдокимов, В. И. Сялянов, С. Г. Скуридин и Н. С. Бадаев, *Молекуляр. биология* **29** (1), 182 (1995).
35. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, V. I. Salyanov, et al., *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2** (5), 461 (2011).
36. Е. П. Найден, В. А. Журавлев, В. И. Итин и др., *Физика твердого тела* **50** (5), 857 (2008).
37. S. J. Byrne, S. A. Corr, Yu. Gun'ko, et al., *Chem. Commun.* 2560 (2004), DOI: 10.1039/B409603G.
38. L. Shang, K. Nienhaus, and G. U. Nienhaus, *J. Nanobiotechnol.* **12** (5), (2014), doi: 10.1186/1477-3155-12-5.

Superparamagnetic Cobalt Ferrite Nanoparticles “Blow up” Spatial Ordering of Double-stranded DNA Molecules

Yu.M. Yevdokimov*, A.G. Pershina**, V.I. Salyanov*, A.A. Magaeva***, V.I. Popenko*, E.V. Shtykova****, L.A. Dadinova****, and S.G. Skuridin*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Siberian State Medical University, Moscovskii Trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

***Tomsk Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademicheskii prosp. 10/3, Tomsk, 634021 Russia

****Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 59, Moscow, 119333 Russia

The formation of cholesteric liquid-crystalline dispersions formed by double-stranded DNA molecules, handled by positively charged superparamagnetic cobalt ferrite nanoparticles, as well as action of these nanoparticles on DNA dispersion, are considered. The binding of magnetic nanoparticles to the linear double-stranded DNA in solution of high ionic strength (0.3 M NaCl) and subsequent phase exclusion of these complexes from polyethylene glycol-containing solutions lead to their inability to form dispersions, whose particles do possess the spatially twisted arrangement of neighboring double-stranded DNA molecules. The action of magnetic nanoparticles on DNA dispersion (one magnetic nanoparticle per one double-stranded DNA molecule) results in such «perturbation» of DNA structure at sites of magnetic nanoparticles binding that the regular spatial structure of DNA dispersion particles “blows up”; this process is accompanied by disappearance of both abnormal optical activity and characteristic Bragg maximum on the small-angle X-ray scattering curve. Allowing with the fact that the physicochemical properties of the DNA liquid-crystalline dispersion particles reflect features of spatial organization of these molecules in chromosomes of primitive organisms, it is possible, that the found effect can have the relevant biological consequences.

Key words: DNA liquid-crystalline dispersions, superparamagnetic cobalt ferrite nanoparticles, circular dichroism, small-angle X-ray scattering