

EFFECT OF HYDRATED FULLERENES ON PHASE EQUILIBRIUM IN WATER-BIOPOLYMER-ELECTROLYTE SYSTEM

Rozhkov S.P.*, Goryunov A.S., Sukhanova G.A., Borisova A.G., Rozhkova N.N.¹

Institute of Biology, Karelian Research Center RAS, Pushkinskaja, 11, Petrozavodsk, 185610 Russia

¹Institute of Geology Karelian Research Center RAS, Pushkinskaja, 11, Petrozavodsk, 185610 Russia

Medical/biological use of fullerenes is one of the most promising. This is due to the sphericity of the molecule that is undamaging for a living organism, and besides water-soluble fullerene derivatives bearing specific functionally active groups.

The technique developed to prepare water colloid solution of the native hydrated fullerenes [1] has made it possible to study the mechanism of their proper biological activity in model systems as well as applied to specific macromolecules and biosystems.

In this way we have studied the effect of hydrated fullerenes in 5 μM concentration on ESR spectra of spin-labeled spectrin-actin complexes of erythrocyte membrane in water suspension. The changes observed indicate the weakening of protein-protein interactions and intensification of segmental mobility of protein structure in presence of fullerenes. At the same time feebly marked changes in the spectra of spin-labeled fatty acids introduced to membrane can be an evidence of strengthening of integral membrane protein-protein interaction in presence of fullerenes in 0.1-20 μM concentration.

In solutions of water-soluble globular proteins ESR spin labeling and differential scanning calorimetry data show [2] that there is no immediate interaction or association between fullerenes (5-20 μM) and protein surface, although their addition to protein-salt solutions increase long-range interaction between serum albumin macromolecules (molar ratio protein/fullerenes was about 100). It results in protein cluster formation in physiological electrolyte concentration range specifically. Dynamic parameters of water-protein matrix caused by fullerene-mediated influence on specific surface energy of protein molecules also change. These effects can be interrelated with phase equilibrium and critical phase transitions in biopolymer solutions and alterations of transition parameters on addition of fullerenes. In this

connection a question arises about the mechanism of fullerenes effect on phase transitions.

It appears [3] that properties of solvated fullerene molecules in organic solutions have much in common with that of protein macromolecules in water solutions. Namely, the range of the second virial coefficient for solutions of fullerene in carbon bisulfide and protein lysozyme in water are practically equal. At the same time, this range corresponds to the interaction of protein macromolecules characteristic of liquid-liquid critical type phase transitions, i.e. of interaction between microphases with different concentration of macromolecules. Probably analogous interactions are the nature of fullerenes. Water molecular-colloidal C60 solutions have been prepared and shown [4] to form hydrated fullerene clusters with C60 molecules separated by water layers. Hence, the properties of hydration of fullerenes and biopolymers cause structural similarity of their molecular-colloidal solutions made of the hydrated monomers and their clusters thus stimulating their interference and effect over phase transitions and phase equilibrium in solution.

Meanwhile, phase equilibrium conditions and after-effects of the phase transitions for specific biopolymer systems are scantily explored. To this end we have analysed thermodynamically stability of the three-component model system water-biopolymer-electrolyte with respect to macromolecule diffusion against the concentration gradient in order to find out conditions of protein cluster formation. An analytic expression for stability coefficient has been derived using Scatchard thermodynamic theory of multicomponent systems: $(\partial\mu_1/\partial m_2)_{m_3}$, where μ_1 is the water chemical potential, m_2 and m_3 are molar concentrations of biopolymer and electrolyte. Equations of spinodal and two quasispinodals are calculated from the condition: $(\partial\mu_1/\partial m_2)=0$ and $(\partial^2\mu_1/\partial m_2^2)=0$. Critical and supercritical phase transitions accompanied by intensification of macromolecule concentration fluctuations occur on

* Fax 07(8142)769810; Email: rozhkov@krc.karelia.ru

reaching the spinodal zone by the system. This leads to different morphological solution structures. Spinodal and quasispinodal equations relate the system critical content $(m_2/m_3)_{cr}$, with biopolymer specific characteristics: $(m_2/m_3)_{cr} = f(v, z, \phi)$, where v is the number of electrolyte ions associated with biopolymer, z is the biopolymer electric charge, ϕ is the function of activity coefficient change with concentration. Spinodal and quasispinodal intersect in the phase diagram point $(m_2/m_3)_{cr} = 2/v$, that corresponds to the salt critical concentration of the biopolymer “salting-out” from solution. Most favorable conditions for protein crystal nucleating center formation arise in one of the quasispinodal zones in the narrow range of electrolyte concentrations. Monomer-cluster quasiequilibrium is observed at (quasi)binodals that are the curves of phase equilibrium and side with (quasi)spinodals.

Thermodynamically the mechanism of fullerene influence on protein subsystem can lie in its influence over the electrolyte activity coefficient as it is discussed in [2]. The effect of fullerene on water by means of hydration shell formation in that case leads to alteration of electrolyte ions interaction with each other and with protein globule.

On the other hand, colloid properties of the system allow to presume DLVO stability theory valid when describing the problem in terms of force. Force interaction between the clusters both of proteins and fullerenes is determined by the secondary potential energy minimum. The depth of secondary potential well and barrier will decrease on rising electrolyte concentration thus destabilizing solution cluster organization. At the

same time, kinetic stabilization of colloid solution can result from even arrangement of fullerene hydrated molecules within the range of primary potential energy minimum. This can also lead to stabilization of cluster solution organization at higher electrolyte concentrations as it was reported in [2]. Solubility of fullerenes in water-salt solution will rise as well at that.

References:

1. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1995;12:1281-1282.
2. Rozhkov S.P., Goryunov A.S., Sukhanova G.A., Borisova A.G., Rozhkova N.N., Andrievsky G.V. Protein interaction with hydrated C_{60} fullerene in aqueous solutions. *Biochem.Biophys Res.Comm.* 2003; 303(2): 562-566.
3. Gripon C., Legrand L., Rosenman I., Boue F., Regnaut C. Relation between the solubility and the effective solute-solute interaction for C_{60} solutions and lysozyme solutions: a comparison using the sticky hard-sphere potential. *J.Cryst.Growth* 1998; 183: 258-268.
4. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Bordyuh A.B., Dovbeshko G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C_{60} fullerene with help of FTIR reflectance and Uv-Vis spectroscopy. *Chem.Phys.Lett.* 2002; 364: 8-17.

Acknowledgements

This study was supported by Russian Foundation for Basic Research Grant N03-03-32473

ВЛИЯНИЕ ГИДРАТИРОВАННЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ НА ФАЗОВЫЕ РАВНОВЕСИЯ В СИСТЕМЕ ВОДА-БИОПОЛИМЕР-ЭЛЕКТРОЛИТ

Рожков С.П.,[†] Горюнов А.С., Суханова Г.А., Борисова А.Г., Рожкова Н.Н.⁽¹⁾

Институт биологии Карельского НЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185610 Россия

⁽¹⁾Институт геологии Карельского НЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185610 Россия

В настоящее время одним из перспективных является медико-биологическое применение фуллеренов. Это обусловлено тем, что сферическая форма молекулы наименее опасна для организмов, и к тому же синтезированы водорастворимые производные фуллеренов, несущие специфические функционально-активные группы.

В связи с успешной разработкой способа приготовления водных коллоидных растворов нативных гидратированных фуллеренов [1] стало возможным изучать механизм их собственной биологической активности на модельных системах и применительно к конкретным макромолекулам и биосистемам. Так, мы исследовали изменения, вносимые присутствием гидратированных фуллеренов в концентрации 5 мкМ в спектры ЭПР спин-меченых мембранных белков актин-спектринового комплекса теней эритроцитов в их водной суспензии. Они свидетельствовали об ослаблении белок-белковых взаимодействий в этих комплексах и усилении сегментальной подвижности структуры белков в присутствии фуллеренов. В то же время слабо выраженные изменения в спектрах спин-меченых жирных кислот, введенных в мембрану, могут свидетельствовать об усилении белок-белковых взаимодействий интегральных мембранных белков в присутствии фуллеренов в концентрации 0,1-20 мкМ. Механизм этих эффектов пока не ясен.

В экспериментах с водорастворимыми белками методами ЭПР спиновой метки и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии нами было обнаружено [2], что гидратированные фуллерены (в концентрации 5-20 мкМ) непосредственно не взаимодействуют и не сорбируются на поверхности белка, но в их присутствии в солевых растворах усиливается дальнейшее взаимодействие между макромолекулами сывороточного альбумина. (молярное отношение белок/фуллерен было около 100) Это приводит к образованию

белковых кластеров в том диапазоне концентраций компонентов раствора, в котором ранее кластеры не возникали. В частности, при повышении концентрации электролита до физиологических значений. Также меняются динамические характеристики водно-белковой матрицы, обусловленные опосредованным влиянием фуллеренов на удельную поверхностную энергию молекул белка. Эти эффекты мы связывали с реализацией критических фазовых переходов в растворах биополимеров и влиянием фуллеренов на параметры фазовых переходов. В связи с этим возникает вопрос о механизмах влияния фуллеренов на фазовые равновесия и переходы.

Как оказывается [3], в поведении сольватированных молекул фуллеренов в органических растворах и макромолекул белков в водных растворах есть много общего. Так, диапазон изменений осмотического второго вириального коэффициента, характеризующего растворимость и взаимодействие молекул, в растворах фуллерена в сероуглероде и белка лизоцима в водном растворе практически совпадают. Вместе с тем для белковых растворов известно, что этот диапазон изменений соответствует взаимодействию между макромолекулами, характерному для критических фазовых переходов типа жидкость-жидкость, т.е. между микрофазами, концентрация макромолекул в которых различна. Возможно, такие явления свойственны и растворам фуллеренов. Действительно, получены и охарактеризованы [4] водные молекулярно-коллоидные растворы C₆₀, в которых, наряду с гидратированными мономерами, существуют гидратированные кластеры фуллеренов, молекулы C₆₀ в которых разделены прослойками воды. Значит, особенности гидратации фуллеренов и биополимеров обеспечивают структурную схожесть их молекулярно-коллоидных растворов, состоящих из гидратированных мономеров и их кластеров, а тем самым обуславливают взаимное влияние на фазовые равновесия и переходы в их растворах.

[†] Факс07(8142)769810; Email:rozhkov@krc.karelia.ru

Между тем причины, условия и последствия фазовых переходов для конкретных биополимерных систем еще сами по себе слабо исследованы. Чтобы разобраться в этом вопросе, был проведен термодинамический анализ устойчивости трехкомпонентной модельной системы вода-биополимер-электролит по отношению к процессам диффузии макромолекул биополимера против градиента концентрации, с целью изучения условий возникновения кластеров биополимеров. С использованием элементов термодинамической теории многокомпонентных систем Скэтчарда получено аналитическое выражение коэффициента устойчивости системы $(\partial\mu_1/\partial m_2)_{m_3}$, где μ_1 – химический потенциал воды, m_2 и m_3 – молярные концентрации биополимера и электролита, соответственно. Из условия $(\partial\mu_1/\partial m_2)=0$ и $(\partial^2\mu_1/\partial m_2^2)=0$ рассчитаны уравнения спинодали и двух квазиспинодалей, при достижении которых в системе имеет место критический и закритические фазовые переходы, ведущие к возникновению различных морфологических структур раствора и сопровождающиеся усилением флуктуаций концентрации макромолекул. Уравнение спинодали и квазиспинодалей связывают критический состав системы $(m_2/m_3)_{кр}$ со специфическими характеристиками биополимера, $(m_2/m_3)_{кр} = f(v, z, \phi)$, где v - число ионов электролита, взаимодействующих с биополимером, z – его заряд, ϕ - функция изменения коэффициента активности электролита от его концентрации. Линии спинодали и квазиспинодалей пересекаются в одной точке фазовой диаграммы $(m_2/m_3)_{кр} = 2/v$, соответствующей критической концентрации электролита, при достижении которой биополимер начинает «высаливаться» из раствора. В области одной из квазиспинодалей в узком диапазоне концентрации электролита создаются наиболее благоприятные условия для возникновения кристаллических зародышей. К (квази)спинодалям примыкают линии равновесия фаз – (квази)бинодали, на которых и наблюдается квазиравновесие мономер \leftrightarrow кластер.

В термодинамическом плане механизм воздействия фуллеренов на белковую подсистему может заключаться в его влиянии на коэффициент активности электролита, как это обсуждается в [2]. В этом случае влияние фуллеренов на воду посредством образования гидратной оболочки приводит к изменению

взаимодействия ионов электролита между собой и с белковой глобулой. С другой стороны, при силовом подходе к проблеме коллоидные особенности системы позволяют предположить справедливость теории ДЛФО устойчивости систем. Между кластерами как белков, так и фуллеренов устанавливается силовое взаимодействие, характеризующееся вторичным минимумом потенциальной энергии. При увеличении концентрации электролита глубина вторичной ямы и величина барьера будут уменьшаться, что дестабилизирует кластерную организацию раствора. Однако в том случае, если на расстоянии первичного минимума потенциальной энергии взаимодействия кластеров белков будут равномерно располагаться гидратированные молекулы фуллеренов, может наступить кинетическая стабилизация коллоидного раствора и кластерная организация раствора биомacroмолекул будет стабильна при больших концентрациях электролита, как это и обнаружено в [2]. Истинная растворимость фуллеренов в водно-солевом растворителе при этом также должна повышаться.

Литература:

1. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. J.Chem.Soc.Chem.Comm. 1995;12:1281-1282.
2. Rozhkov S.P., Goryunov A.S., Sukhanova G.A., Borisova A.G., Rozhkova N.N., Andrievsky G.V. Protein interaction with hydrated C₆₀ fullerene in aqueous solutions. Biochem.Biophys Res.Comm. 2003; 303(2): 562-566.
3. Gripon C., Legrand L., Rosenman I., Boue F., Regnaut C. Relation between the solubility and the effective solute-solute interaction for C₆₀ solutions and lysozyme solutions: a comparison using the sticky hard-sphere potential. J.Cryst.Growth 1998; 183: 258-268.
4. Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Bordyuh A.B., Dovbeshko G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and Uv-Vis spectroscopy. Chem.Phys.Lett. 2002; 364: 8-17.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 03-03-32473