

03:05

Новый подход к управлению биохимическими реакциями в магнитной наносуспензии с помощью низкочастотного магнитного поля

© Ю.И. Головин, Н.Л. Клячко, Д.Ю. Головин, М.В. Ефремова,
А.А. Самодуров, М. Сокольски-Папков, А.В. Кабанов

Наноцентр, Тамбовский государственный университет
им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия
Center for Drug Delivery and Nanomedicine, University of Nebraska,
Medical Center, Omaha, NE, 68198–5830
E-mail: golovin@tsu.tmb.ru

Поступило в Редакцию 18 октября 2012 г.

Описан новый подход к управлению биохимическими реакциями в магнитных наносуспензиях посредством приложения низкочастотного (не греющего) магнитного поля, вызывающего наномеханическое воздействие на макромолекулы, химически пришитые к магнитным наночастицам (МНЧ). В процессе экспериментальной верификации этого подхода обнаружен эффект влияния магнитного поля напряженностью H от 15 до 220 кА/м, частотой 50 Hz на кинетику химической реакции, проводимой в водном растворе, содержащем взвешенные МНЧ магнетита ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) и пришитые к ним через полимерные мостики молекулы фермента химотрипсина. Представлена полевая зависимость эффекта и дана его интерпретация в рамках наномеханической модели, принимающей во внимание деформации, изменение конформации и разрушение слабых связей в белковой макромолекуле фермента под действием сил, прикладываемых к ней в процессе ориентации МНЧ по полю.

Однодоменные магнитные и супермагнитные наночастицы (МНЧ) широко используются в биомедицинских исследованиях, диагностике и терапии тяжелых заболеваний [1,2]. Наиболее освоенные области применения МНЧ в наномедицине — селективное повышение контрастности изображения при магнитно-резонансной томографии [3,4], адресная доставка лекарств [1–4], контролируемое освобождение лекарств из

наноконтейнеров и гелей [5–7] и абляция раковых опухолей методом гипертермии в радиочастотном магнитном поле [8–11].

В работе предложено и апробировано новое направление использования МНЧ — как посредников для наномеханического управления топологией и каталитическими свойствами биоактивных макромолекул (ММ), например специфических белков, катализаторов биохимических процессов — ферментов. Деформирующая сила прикладывается к ММ в результате поворотов МНЧ под действием внешнего магнитного поля (МП). В отсутствие МП в ансамбле изолированных МНЧ устанавливается хаотическая ориентация магнитных моментов m_i . Характерное время τ_r ориентационной релаксации (упорядочения магнитных моментов МНЧ в МП или их хаотизации при его отключении) определяется гидродинамическим радиусом частицы R_{hd} , вязкостью η и температурой T окружающей среды:

$$\tau_r = \frac{4\eta R_{hd}^3}{k_B T}, \quad (1)$$

здесь k_B — постоянная Больцмана.

Для водных суспензий МНЧ с $R_{hd} = 10–20$ nm при $T = 300$ K величина τ_r составляет $1–10$ μ s. Внешнее МП стремится сориентировать вектора намагниченности МНЧ в одном направлении, что приводит к повороту последних на угол от 0 до 180°. Смещение конца ММ, прикрепленной к МНЧ, достигает максимума $\Delta l = \pi R_{hd}$ при $\mu_0 H m_1 \gg k_B T$ и $\tau_f \gg \tau_r$, где μ_0 — магнитная постоянная, τ_f — характерное время изменения МП (для гармонического поля частотой f величина $\tau_f = 1/2\pi f$).

В зависимости от того, прикреплена ли ММ к одной или двум/нескольким МНЧ (что определяется концентрацией МНЧ в суспензии, а также физико-химическими свойствами ММ оболочки на МНЧ), может реализоваться два различных механизма действия МП на ММ — гидродинамический и контактный (рис. 1). Первый аналогичен гидродинамическому вытягиванию ММ в потоке жидкости (например, ДНК перед секвенированием). Приложенная к ММ сила при этом пропорциональна f , η и R_{hd} . В модели сферической глобулы радиусом R_{hd} , прикрепленной полимерным линкером к МНЧ, сила F_{hd} по закону Стокса равна

$$F_{hd} = 6\pi\eta R_{hd}v = 12\pi^2\eta R_{hd}^2 f. \quad (2)$$

Здесь $v = 2\pi f R_{hd}$ — линейная скорость движения центра глобулы ММ фермента относительно неподвижной жидкости.

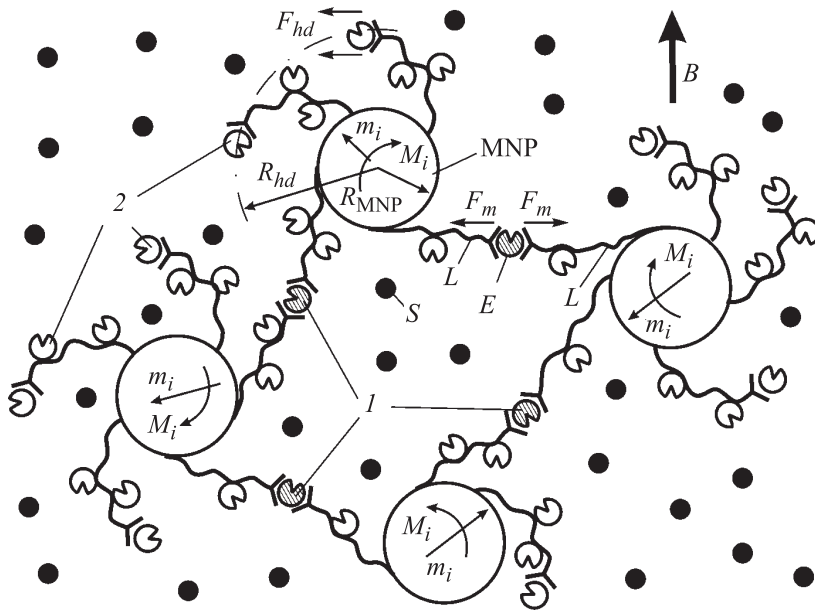


Рис. 1. Структурная схема, поясняющая архитектуру комплексов, содержащих однодоменные магнитные частицы (MNP), молекулы белка — фермента (E), молекулы линкера (L) (ПЕГ-полиметакриловая кислота или ПЕГ-полиакриловая кислота, или ПЕГ-полиаспарагиновая кислота) и субстрата (S). m_i — магнитный момент MNP, M_i — действующий на нее механический момент, F_{hd} и F_m — гидродинамическая и контактная силы, приложенные к молекуле фермента соответственно.

Вторая ситуация аналогична возникающей при деформировании ММ с помощью магнитных пинцетов [12,13]. При этом максимальная деформирующая сила F_c обратно пропорциональна R_{hd} и не зависит от η и f (при условии, что $\tau_f \gg \tau_r$):

$$F_m \approx \frac{m\mu_0 H}{R_{hd}} = \frac{4}{3} \frac{\pi R_m^3 \rho I \mu_0 H}{R_{hd}}, \quad (3)$$

здесь $m = \frac{4}{3} \pi R_m^3 \rho$ — магнитный момент сферической частицы магнетита радиусом R_m , удельной намагниченностью I и плотностью ρ .

Методами одномолекулярной силовой спектроскопии с помощью оптических и магнитных ловушек (пинцетов) получен большой объем экспериментальных данных о влиянии сил в диапазоне от единиц до сотен pN на конформацию и химические свойства различных ММ (белков, сахаридов, ДНК, РНК и др.) [12,13], а также на каталитическую активность ферментов [14]. Следует отметить, что в упомянутых аналогах происходит деформация единичной ММ, а в предлагаемом подходе — ансамбля ММ, что позволяет управлять макрокинетикой биохимических реакций *in vitro* и *in vivo*.

Оценки по формуле (3) показывают, что в умеренных МП порядка десятков–сотен кА/м к молекулам, прикрепленным к наночастицам магнетита с $R_m \approx 10$ nm, можно приложить силы от единиц до сотен пиконьютон. Этого вполне достаточно, чтобы изменить кинетику биохимических реакций, в частности, с участием ферментов, активные центры которых весьма чувствительны к любым внешним воздействиям. Помимо перечисленных выше факторов, под действием приложенных сил могут измениться взаимное положение ММ или отдельных структурных единиц в надмолекулярной структуре ММ, высота активационных барьеров и частота результативных попыток их преодоления, скорость диффузии в окружающей среде и др. Повышение напряженности МП может привести к скачкообразному изменению конформации ММ, изменению ее вторичной и далее структур, а затем и обрыву некоторых связей. Все это вместе взятое неизбежно отразится на макрокинетике.

Для проверки этой концепции были проведены эксперименты по выявлению возможного влияния МП на реакцию $E + S$ (здесь E — молекула фермента химотрипсина, S — молекула субстрата—*p*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина (БТНА)) в магнитной суспензии (наночастицы магнетита Fe_3O_4 , любезно предоставленные J. Riggle, Virginia Tech, со средним радиусом от 8 до 12 nm по данным электронной микроскопии). ММ фермента прикрепляли к МНЧ через промежуточную молекулу — линкер (блок-иономер полиметакриловая кислота — полиэтиленгликоль (ПМА–ПЕГ) длиной 10–20 nm). Гидродинамический радиус наночастиц с шубой из разных блок-иономеров варьировался от 20 до 28 nm (по данным динамического светорассеяния). Затем в магнитную суспензию вводили субстрат и помещали образец в переменное МП частотой $f = 50$ Hz и напряженностью H от 0 до 220 кА/м. Наблюдение за кинетикой реакции осуществляли с помощью спектрофотометра (СА) Beckman с термостатируемым кюветным отделением, который регистрировал наработку продукта реакции гидролиза БТНА,

катализируемой ферментом химотрипсином, по абсорбции света на длине волны 380 nm (ей соответствует резонансное поглощение света в конечном продукте — п-нитроанилине).

Для контроля в каждом эксперименте следили за кинетикой реакции в двух одинаковых светопрозрачных кюветах с одним и тем же раствором исходных реагентов, попеременно помещая их в измерительную ячейку СФ. Одна из кювет подвергалась экспозиции в МП в течение 2.5 min несколько раз (до 4) с перерывами, необходимыми для регистрации отклика в СФ, другая в это время находилась в термостатированном кюветном отделении МФ и устанавливалась в канал измерения на время экспозиции в МП первой кюветы. При не слишком высокой концентрации исходных реагентов и нарабатываемого продукта концентрация последнего росла линейно во времени в течение десятков минут, т.е. скорость реакции была неизменной (рис. 2). В образцах, подвергавшихся действию МП, наблюдалось замедление реакции после каждой экспозиции в поле (рис. 3, *a*). Наибольший эффект замедления реакции давала первая экспозиция в МП. Из полевой зависимости видно, что до $H \approx 100 \text{ kA/m}$ эффект растет с полем, а при экспозиции в более сильных МП — начинает падать (рис. 3, *b*). Это свидетельствует о наличии конкурентных процессов, возникающих под действием МП. Наиболее вероятной причиной ослабления эффекта в полях выше 100 kA/m является, на наш взгляд, обрыв части линкеров, что приводит к прекращению действия деформирующих сил на некоторые ММ фермента. Оценочно максимальная сила F_m , действующая на наиболее крупные МНЧ в распределении, при $H = 200 \text{ kA/m}$ составляет 500–800 pN, что вполне достаточно для этого.

Нагревом суспензии в МП столь низкой частоты ($f = 50 \text{ Hz}$) можно пренебречь (и общий разогрев образца, и локальный нагрев МНЧ за время экспозиции в МП по оценкам не превышал 10^{-4} K). Ячейка с индуктором термостатировалась, и прямые измерения показали, что ее разогрев в результате включения тока в катушках магнитной системы за время экспозиции образца в МП не превышал нескольких десятых долей К. Следует также заметить, что повышение температуры сосуда, в котором протекала изучаемая реакция, даже на несколько кельвин привело бы к росту скорости реакции (что проверено экспериментально), а не к замедлению, как это наблюдалось в описываемых опытах.

Наиболее вероятной причиной обнаруженного эффекта является изменение топологии активного центра молекулы фермента в результате ее необратимой (или, по крайней мере, надолго запоминаемой)

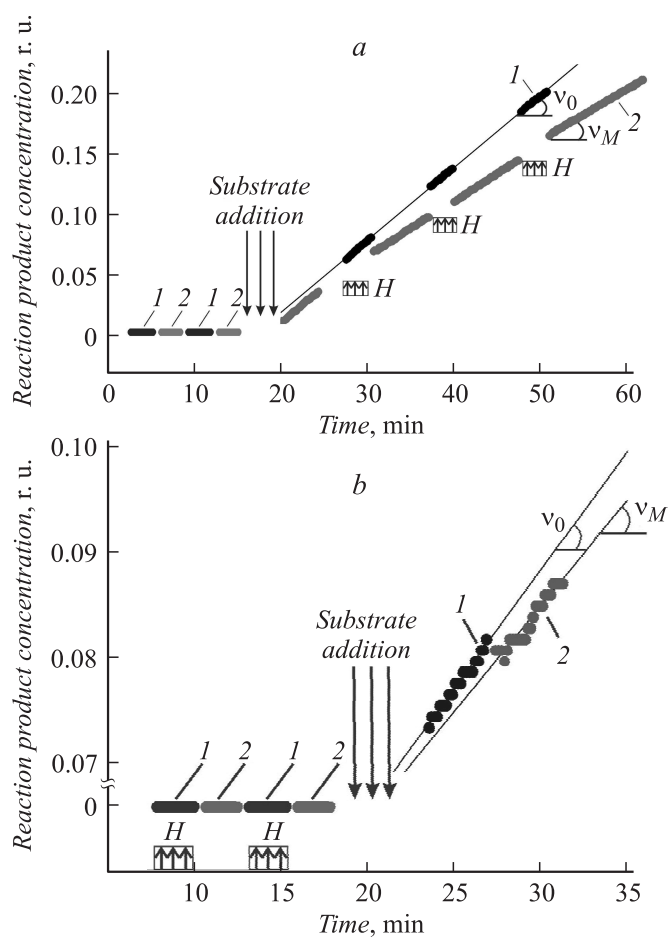


Рис. 2. Кинетика реакции $E + S$ в ПМ $H = 100 \text{ kA/m}$, $f = 50 \text{ Hz}$ на фоне контрольного эксперимента в отсутствие МП; *a* — магнитная обработка суспензии с субстратом; *b* — до введения субстрата. 1 — контрольный образец без обработки МП; 2 — образец суспензии, обработанный МП; v_0 — скорость реакции в контрольном эксперименте без обработки реагентов в МП; v_M — скорость реакции после обработки реагентов в МП.

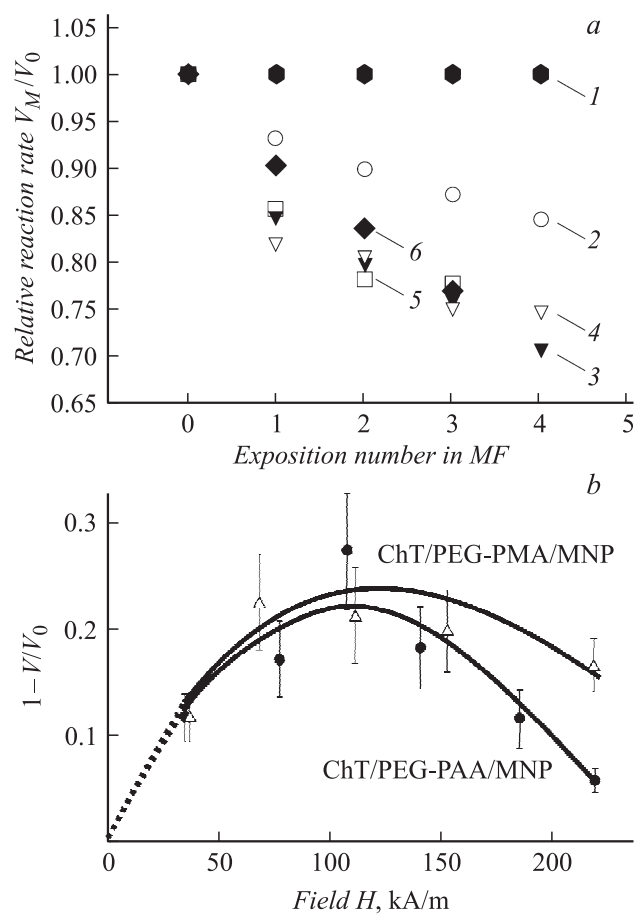


Рис. 3. Зависимость эффекта торможения реакции $E + S$ вследствие магнитной обработки суспензии с предварительно введенным субстратом; a — от числа экспозиций в МП; b — от напряженности МП. Напряженность МП: 1 — 0, 2 — 34, 3 — 66, 4 — 110, 5 — 152, 6 — 220 kA/m.

деформации приложенными силами. Продолжительность этого запоминания при температуре опыта ($T = 293$ К) превышала длительность опыта (около 1 h). Этот вывод подтверждается данными эксперимента,

в котором магнитная суспензия с пришитыми к МНЧ молекулами фермента подвергалась экспозиции в МП тех же параметров, что были описаны выше, но до введения в суспензию субстрата. При этом фермент демонстрировал „память“ о такой обработке и пониженную активность и через десятки минут после нее (рис. 2, *b*). В отсутствие субстрата (вещества, распад которого катализирует фермент) МП могло повлиять только на вторичную или третичную структуру ММ самого фермента и, следовательно, на состояние его активного центра, а не на сложные многостадийные кинетические процессы, идущие впоследствии при химической реакции.

Выяснение деталей тонких процессов, индуцированных приложением сил к ММ, требуют систематического исследования динамики различных релаксационных явлений в систем, что предполагается сделать путем варьирования частоты МП и длительности экспозиции в каждом цикле обработки образца в поле.

Таким образом, в работе предложен новый подход к управлению биохимическими реакциями и обнаружен эффект влияния слабого низкочастотного (не греющего) МП на кинетику ферментативной реакции в магнитной наносуспензии. Магнитомеханическая спектроскопия релаксационных процессов в системе может дать информацию об элементарных актах и промежуточных состояниях в системе, прояснить атомно-молекулярные механизмы катализа и функционирования активных центров в ММ фермента. С практической точки зрения это может дать способ управления адерсной доставкой лекарств нового поколения, дистанционным дозированием их активности и т. п.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта МОН РФ 11.G34.31.0004 (Постановление правительства РФ № 220).

Список литературы

- [1] *Arruebo M., Fernandez-Pacheco R., Ibarra M.R., Santamaria J.* // Nano Today. 2007. V. 2. N 6. P. 22–32.
- [2] *Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T.* // Advances Drug Delivery Reviews. 2011. V. 63. P. 24–46.
- [3] *Veisheh O., Gunn I.W., Zhang M.* // Advanced Drug Delivery Reviews. 2010. V. 62. P. 284–304.
- [4] *Lacroix L.-M., Ho D., Sun S.* // Current Topics in Medical Chemistry. 2010. V. 10. N 12. P. 1184–1197.

- [5] Hoare T, Timko B.P., Santamaria J, Goya G.F., Irusta S, Lau S, Stefanescu C.F., Lin D., Langer R, Kohane D.S. // Nano Letters. 2011. V. 11. P. 1395–1400.
- [6] Defrus A.M., Maltzahn G. von, Harris T.J., Duza T, Vecchio K.S., Ruoslahti E., Bhatia S.N. // Adv. Mater. 2007. V. 19. P. 3932–3936.
- [7] Thomas C.R., Ferris D.P., Lee J.-H., Choi E., Cho M.Y., Kim E.S., Stoddart J.F., Shin J.-S., Cheon J., Zink J.I. // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 32. P. 10 623–10 625.
- [8] Jeyadevan B. // Ceramic Society Japan. 2010. V. 118. N 6. P. 391–401.
- [9] Hergt R., Dutz S., Müller R., Zeisberger M. // J. Phys.: Condens. Matter. 2006. V. 18. P. S2919–S2934.
- [10] Gaseau F, Levy M, Wilhem C. // Nanomedicine. 2008. V. 3. N 6. P. 831–844.
- [11] Cherukuri P, Glazer E.S., Curley S.A. // Advanced Drug Delivery Reviews. 2010. V. 62. P. 339–345.
- [12] Stigter D., Bustamante C. // Biophysical J. 1998. V. 75. P. 1197–1210.
- [13] Neuman K.E., Nagy A. // Review. Nature Methods. 2008. V. 5. N 6. P. 491–505.
- [14] Conroy R. // Handbook of Molecular Force Spectroscopy / Ed. A. Noy. Springer, 2008. P. 23–96.