

14 Наномеханическое управление активностью ферментов, иммобилизованных на однодоменных магнитных наночастицах

© Ю.И. Головин,^{1,2} С.Л. Грибановский,¹ Н.Л. Клячко,² А.В. Кабанов^{2,3}

¹ Наноцентр, Тамбовский государственный университет им. Г.П. Державина, 392000 Тамбов, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Center for Nanotechnology in Drug Delivery, UNC Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA
e-mail: golovin@tsu.tmb.ru

(Поступило в Редакцию 11 ноября 2013 г.)

Аналитически и численно проанализированы основные закономерности деформации биоактивных макромолекул, вызванные действием негреющего низкочастотного магнитного поля на однодоменные магнитные наночастицы, к поверхностям которых макромолекулы прикреплены химически.

В последнее десятилетие предприняты большие усилия в направлении оптимизации характеристик однодоменных магнитных наночастиц (ОМНЧ), предназначенных для использования в терапии раковых заболеваний методом гипертермии в радиочастотном ($\omega = 10^6 - 10^7 \text{ s}^{-1}$) магнитном поле [1–3]. ОМНЧ при этом играют роль центров диссипации энергии переменного магнитного поля (ПМП), что вызывает разогрев опухолевой ткани до температуры $T \approx 43 - 45^\circ\text{C}$, апоптоз клеток и их последующую абляцию. Трудности дозирования и локализации перегрева, опасность повреждения и некроза здоровых тканей (при $T \geq 45^\circ\text{C}$) затрудняют широкое клиническое применение магнитной гипертермии [4,5].

В [6,7] предложен и описан новый подход к дистанционному воздействию на клеточные мембраны и управлению химической активностью биомолекул (в частности, ферментов), иммобилизованных на ОМНЧ. Он основан на приведении ОМНЧ, входящих в состав наносуспензии, во вращательно-колебательное движение путем наложения ПМП низкой частоты ($\omega = 10^1 - 10^4 \text{ s}^{-1}$). Это вызывает деформацию прикрепленных к ОМНЧ макромолекул (ММ) и, как следствие, изменение их функциональных свойств в отсутствие какого-либо нагрева. Обсуждаемый подход обладает большим инновационным потенциалом в приложениях адресной доставки и дистанционного контроля активности лекарств [8–11], а также их регулируемого высвобождения из носителей [12–14], что имеет широкие перспективы практического применения в терапии различных заболеваний, в том числе раковых. Ключевая идея этого подхода восходит к представлениям о том, что деформация может привести к существенному изменению межатомных расстояний в активных центрах ММ и при достаточных приложенных силах к изменению ее вторичной и третичной структур [15,16]. Подобно влиянию света, температуры, давления, рН и т.п. деформация ММ способна вызвать радикальные перемены в биохимических

функциях биокатализаторов и ингибиторов [17–19], что многократно было доказано экспериментально методами силовой спектроскопии одиночных молекул [20–22]. В этой связи актуальной становится оптимизация параметров как внешнего поля, так и управляемых им структур с целью обеспечения наиболее эффективного преобразования действия ПМП в деформацию биоактивных ММ, а не в теплоту.

В работе представлены результаты анализа закономерностей продольной деформации растяжения ММ ферментов на основе численного и аналитического решений уравнений движения ОМНЧ в ПМП. В частности, рассмотрена динамика агрегатов, состоящих из двух ОМНЧ и белковой ММ, которая соединена с ними двумя линкерами (рис. 1). Эта простейшая система, способная вызвать растяжение молекулы фермента за счет вращения ОМНЧ с первоначально хаотически ори-

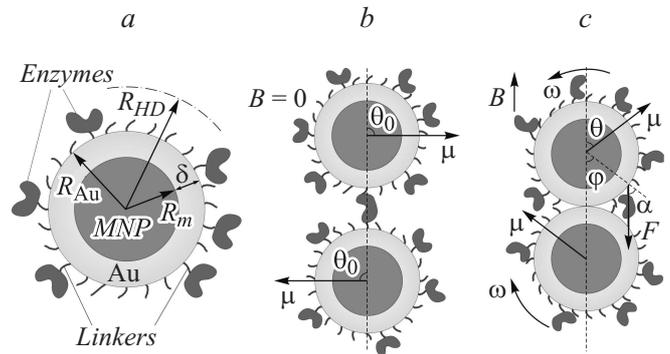


Рис. 1. ОМНЧ с присоединенными макромолекулами фермента через молекулярные линкеры: *a* — вид одиночной частицы; *b* — вариант расположения агрегата из двух ОМНЧ, связанных мостиком „линкер-энзим-линкер“ с антипараллельными магнитными моментами в отсутствие внешнего магнитного поля; *c* — агрегат в движении при появлении внешнего поля **B**, относительно силовых линий которого магнитные моменты ОМНЧ ориентированы симметрично.

ентированными магнитными моментами, вызываемого стремлением к магнитному упорядочению среды во внешнем ПМП. Анализ динамики этой системы также позволяет понять на качественном уровне закономерности, справедливые для более сложных агрегатов, содержащих три и более связанных магнитных частиц. В расчетах принято, что ОМНЧ содержат магнитное ядро радиусом R_m и удельной намагниченностью J_s , покрытое золотой оболочкой толщиной δ , к которой ковалентно пришиты линкеры длиной l_B . Система уравнений, описывающих движение каждой ОМНЧ под действием внешнего ПМП, имеет следующий вид:

$$m\dot{\mathbf{r}} = \mathbf{F} - 6\pi\eta R_{HD}\dot{\mathbf{r}}, \quad (1)$$

$$I\dot{\varphi} = \mu B \sin(\omega t) \sin \theta - M - 8\pi\eta \cdot \frac{4}{3}\pi R_{HD}^3 \cdot \dot{\varphi}. \quad (2)$$

Здесь \mathbf{r} — радиус-вектор центра частицы, φ — угол ее поворота относительно первоначального положения, $\theta = \theta_0 - \varphi$ — угол между векторами магнитной индукции \mathbf{B} и магнитного момента частицы $\boldsymbol{\mu}$, $R_{Au} = R_m + \delta$ — радиус золотой оболочки частицы, $R_{HD} = R_m + \delta + l_B$ — ее гидродинамический радиус, $m = \frac{4}{3}\pi (R_m^3 \cdot \rho_m + (R_{Au}^3 - R_m^3) \cdot \rho_{Au})$ — масса ОМНЧ, $I = \frac{2}{5} \cdot \frac{4}{3}\pi (R_m^5 \cdot \rho_m + (R_{Au}^5 - R_m^5) \cdot \rho_{Au})$ — момент инерции, $\boldsymbol{\mu} = J_s \cdot \rho_m \cdot \frac{4}{3}\pi R_m^3$ — магнитный момент частицы, ρ_m и ρ_{Au} — плотности соответственно магнитного ядра и золотой оболочки, J_s — удельная намагниченность магнитного ядра ОМНЧ, B_a — амплитудное значение индукции магнитного поля, ν — вязкость окружающей жидкости, $F = c\Delta l$ — сила реакции связи, где $\frac{1}{c} = \frac{2}{c_B} + \frac{1}{c_E}$ (c_B и c_E — жесткости молекул-линкеров и белковой молекулы соответственно), $\Delta l = l - l_0$ — полное удлинение связи (если $\Delta l \leq 0$, то принимается, что $F = 0$), M — момент силы, действующей на частицу со стороны связи. Если имеет место наматывание связи на частицу, то $M = FR_{Au}$, в ином случае $M = FR_{Au} \sin \alpha$ (α — угол между вектором \mathbf{F} и радиус-вектором из центра частицы к точке приложения этой силы).

Роль вязкого сопротивления среды при вращательном движении становится существенной, лишь когда момент сил трения и момент сил от действия ПМП, т.е. первый и третий члены в уравнении (2), становятся сопоставимыми. Отсюда для типичных размеров ОМНЧ магнетита ($R_m = 5-10$ nm, $J_s = 80$ A · m²/kg), золотой оболочки ($\delta \sim 5$ nm) и линкеров ($l_B = 0.5-2$ nm), а также ПМП с индукцией $B_a = 0.1-1$ Т следует характерное значение частоты $\omega_{HD} \sim (10^2-10^3)\eta^{-1}$ s⁻¹, выше которой магнитомеханическое преобразование становится неэффективным. Для растворов с вязкостью, близкой к вязкости воды $\eta_{H_2O} \sim 10^{-3}$ Pa · s, $\omega_{HD} \sim 10^5-10^6$ s⁻¹. Если концентрация ОМНЧ в суспензии высока и они находятся в агрегированном состоянии, эффективная вязкость среды $\eta_{\text{эф}}$ может существенно превышать вязкость воды, а ω_{HD} при этом уменьшится в $\eta_{\text{эф}}/\eta_{H_2O}$ раз.

Для оценки роли инерционных сил при вращательном движении ОМНЧ найдем характерную частоту ω_1 , при

которой левая часть уравнения (2) станет соизмерима с активным действующим моментом $I\dot{\varphi} \approx \mu B_a$. С учетом того, что $\dot{\varphi} \cong \omega^2$, получим для типичных параметров системы $\omega_1 \sim \sqrt{\mu B_a/I} \approx 10^5-10^6$ s⁻¹. Таким образом, инертными свойствами частиц, так же как и вязким сопротивлением среды, в диапазоне частот $\omega \lesssim 10^4$ s⁻¹ можно пренебречь.

Анализ уравнений (1), (2) показывает, что при любой разумной длине линкеров ($l_B \leq R_{Au}$) ОМНЧ при появлении внешнего поля быстро приходят в соприкосновение под действием сил реакции связей. Время их сближения зависит от основных параметров системы следующим образом:

$$\tau \sim \sqrt{\frac{\eta \cdot R_{Au} \cdot R_{HD} \cdot s}{\omega \cdot \mu \cdot B_a \sin \theta}}, \quad (3)$$

где $s \approx l_E + 2l_B$ — начальное расстояние между ОМНЧ. Величина τ , нормированная на период колебаний внешнего ПМП ($T = 2\pi/\omega$), пропорциональна $\sqrt{\omega}$. При $\omega \sim 10^4$ s⁻¹ $\tau/T \sim 10^{-2}$. Сила, вызывающая растяжение связи в этом процессе, обусловлена наличием вязкого сопротивления жидкости поступательному движению ОМНЧ. Ее максимальное значение $F_{\text{max}} \sim \eta\omega\tau$ с учетом (2), также растет с частотой как $\sqrt{\omega}$ и составляет ~ 0.1 pN при $\omega \sim 10^4$ s⁻¹.

Из вышесказанного следует, что для расчета возникающих в системе деформаций достаточно рассмотреть задачу, когда две ОМНЧ изначально находятся в соприкосновении друг с другом, а деформирующие силы возникают за счет взаимного отталкивания ОМНЧ при их вращении во внешнем поле. Тогда в пренебрежении силами вязкости и инерции уравнение (2) принимает вид

$$M = \mu B_a \sin(\omega t) \sin(\theta_0 - \varphi). \quad (4)$$

Поскольку $M \sim cR_{Au}^2$, из уравнения (4) напрямую следует, что безразмерный параметр $\lambda = \frac{\mu B_a}{cR_{Au}^2}$, отражающий соотношение характерных значений моментов сил магнитного поля и реакции связи, полностью определяет движение рассматриваемых систем при известной начальной ориентации векторов $\boldsymbol{\mu}$.

Для агрегатов с размерами отдельных компонентов, которые приводились выше, наиболее вероятно конфигурация, в которой связывающая цепь закреплена в точках, близких к оси, соединяющей центры ОМНЧ. Рассмотрим частный случай, когда магнитные моменты ОМНЧ одинаковы по абсолютной величине и в исходном состоянии ориентированы симметрично относительно силовых линий поля (рис. 1, b, c). В этом случае частицы при вращении будут катиться по поверхности друг друга без проскальзывания, а их центры останутся неподвижными. На рис. 2 приведены зависимости угла поворота ОМНЧ от времени при различных значениях параметра λ и различных начальных положениях магнитного момента θ_0 . Видно, что при $\lambda \gg 1$, когда жесткость связи можно считать исчезающе малой, ОМНЧ

ведет себя как свободная частица. При этом периодически она совершает скачкообразный поворот на угол, при котором векторы μ и \mathbf{V} становятся коллинеарными. При $\lambda \lesssim 1$ (жесткая связь) поворот ОМНЧ происходит на небольшой угол, пропорциональный мгновенному значению B . Как видно из рис. 3, максимальные силы F_{\max} и деформации Δl_{\max} в системе достаточны для индуцирования конформационных изменений в ММ [21].

Увеличение толщины золотой оболочки δ приводит к падению F_{\max} , а также уменьшению Δl_{\max} при $B_a/c \lesssim 3 \text{ T} \cdot \text{m/N}$ и увеличению Δl_{\max} при $B_a/c \gtrsim 3 \text{ T} \cdot \text{m/N}$.

В более общих случаях, чем описано выше, расчет деформаций усложняется вследствие возникновения вращательного движения системы в целом. Растяжение ММ при этом также будет иметь место, однако его величина и длительность уменьшатся и будут определяться соотношением характерных релаксационных времен системы и отдельных ОМНЧ, входящих в ее состав. При определенных начальных положениях магнитных моментов, когда обе ОМНЧ вращаются в одну сторону, ММ может оказаться зажатой между ними. В этом случае, помимо продольных деформаций растяжения, возможны иные виды деформаций (сжатия, сдвига, кручения), которые также могут привести к существенным изменениям

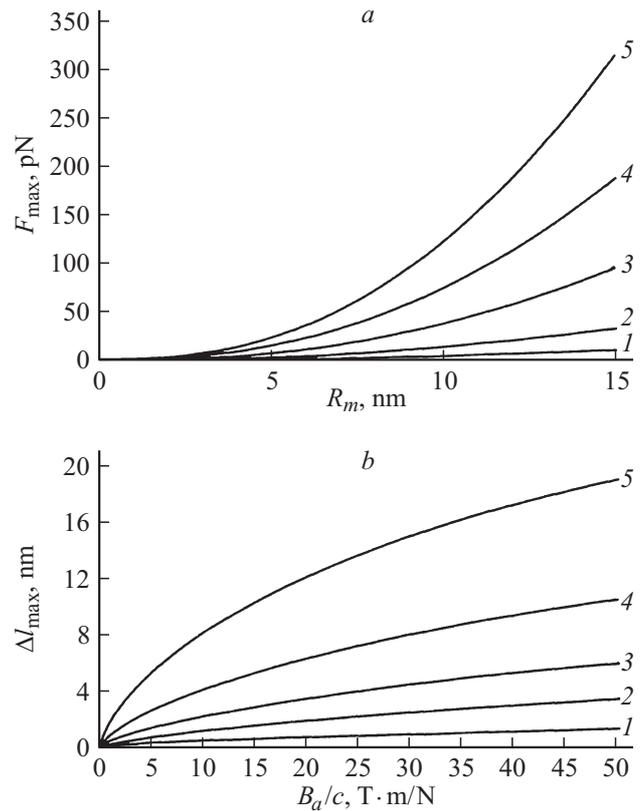


Рис. 3. Сила и деформация связи „линкер-фермент-линкер“, вызванные воздействием ПМП в зависимости от основных параметров системы: *a* — зависимость максимально достижимой силы, приложенной к связи, от магнитного радиуса ОМНЧ при следующих значениях амплитуды магнитного поля, Т: 1 — 0.03, 2 — 0.1, 3 — 0.3, 4 — 0.6, 5 — 1 Т, *b* — зависимость максимальной деформации связи от соотношения B_a/c при значениях магнитного радиуса, нм: 1 — 3, 2 — 5, 3 — 7, 4 — 10, 5 — 15 ($\delta = 5 \text{ nm}$, $\theta_0 = 90^\circ$, $l_B = 0.5 \text{ nm}$).

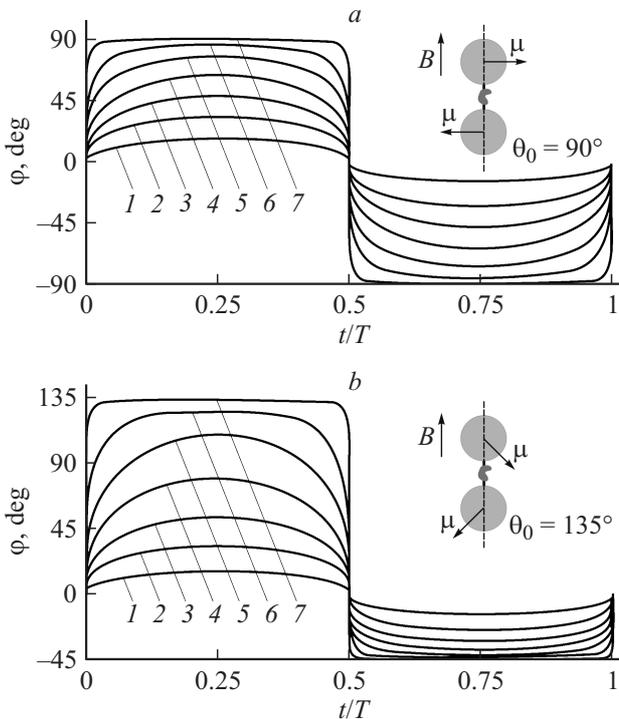


Рис. 2. Зависимость угла поворота одной ОМНЧ в составе агрегата под действием внешнего магнитного поля \mathbf{V} в зависимости от времени при симметричной относительно силовых линий поля начальной ориентации магнитных моментов μ ОМНЧ с начальным углом θ_0 , равным: *a* — 90° , *b* — 135° . Значения параметра λ : 1 — 0.01, 2 — 0.1, 3 — 1/3, 4 — 1, 5 — 3, 6 — 10, 7 — 100.

внутренней структуры ММ, однако рассмотрение таких случаев выходит за рамки нашей работы.

Таким образом, в работе показано, что:

- использование ОМНЧ в качестве преобразователей действия низкочастотного негреющего ПМП в деформацию прикрепленных к их поверхности ММ позволяет при правильном подборе параметров системы получить силы, прикладываемые к ММ, достаточные для изменения топологии ее активных центров и вторичной/третичной структуры [21,22],
- при частотах $\omega \lesssim 10^4 \text{ c}^{-1}$ влиянием инерции и вязкости на динамику процесса растяжения можно пренебречь,
- пара ОМНЧ, связанная цепью „линкер-фермент-линкер“, приходит в контакт за время, не превышающее 10^{-2} периода колебаний внешнего ПМП (при $\omega \lesssim 10^4 \text{ c}^{-1}$),
- общая деформация связи между двумя ОМНЧ полностью определяется безразмерным параметром

$\lambda = \frac{\mu B_a}{c R_{Au}^2}$, отражающим соотношение магнитных сил и сил реакции связи,

• для эффективного деформирования ММ необходимо применять короткие линкеры, жесткость которых значительно превышает жесткость ММ.

Список литературы

- [1] Magnetic Nanoparticles. From Fabrication to Clinical Application (Ed. N.T.K. Thanh). CRC Press, Boca Raton. 2012. 584 p.
- [2] Reddy L., Areas J.L., Nicolas J., Couvreur P. // Chem. Rev. 2012. Vol. 112. P. 5818–5878.
- [3] Yoo D., Jeong H., Preihs C., Choi J., Shin T.-H., Sessler J.L., Cheon J. // Angewand. Chem. Int. Ed. 2012. Vol. 51. P. 12 482–12 485.
- [4] Jayadevan B. // J. Ceram. Societ. J. 2010. Vol. 118. N 6. P. 391–401.
- [5] Milani V., Lorenz M., Weinkauff M., Rieken M., Pastore A., Dreyling M., Issels R. // Int. J. Hyperthermia. 2009. Vol. 25. N 4. P. 262–272.
- [6] Klyachko N.L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N., Efremova M.V., Gulin D.A., Kuznetsov A.A., Majouga A.G., Riffle J.S., Golovin Y.I., Kabanov A.V. // Angewand. Chem. Int. Ed. 2012. Vol. 51. P. 12 016–12 019.
- [7] Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Головин Д.Ю., Ефремова М.В., Самодуров А.А., Сокольски-Папков М., Кабанов А.В. // Письма в ЖТФ. 2013. Т. 39. № 5. С. 24–32.
- [8] Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T. // Advanced Drug Delivery Rev. 2011. Vol. 63. P. 24–46.
- [9] Veisheh O., Gunn I.W., Zhang M. // Advanced Drug Delivery Rev. 2010. Vol. 62. P. 284–304.
- [10] Lacroix L.-M., Ho D., Sun S. // Current Topics in Medical Chem. 2010. Vol. 10. N 12. P. 1184–1197.
- [11] Cherukuri P., Glazer E.S., Curley S.A. // Advanced Drug Delivery Rev. 2010. Vol. 62. P. 339–345.
- [12] Amstad E., Kohlbrecher J., Muller E., Schweizer T., Textor M., Reimhult E. // Nano Lett. 2011. Vol. 11. N 4. P. 1664–1670.
- [13] Domenech M., Marrero-Berrios I., Torres-Lugo M., Rinaldi C. // ACS Nano. 2013. Vol. 7. P. 5091–5101.
- [14] Hanus J., Ullrich M., Dohnal J., Singh M., Stepanek F. // Langmuir. 2013. Vol. 29. N 13. P. 4381–4387.
- [15] Berezin I.V., Klivanov A.M., Martinek K. // Biochim. Biophys. Acta. 1974. Vol. 364. P. 193–198.
- [16] Klivanov A.M., Samokhin G.P., Martinek K., Berezin I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. Vol. 438. N 1. P. 1–12.
- [17] Puchner E.M., Gaub H.E. // Annu. Rev. Biophys. 2012. Vol. 41. P. 497–518.
- [18] Herschlag D., Natarajan A. // Biochemistry. 2013. Vol. 52. P. 2050–2067.
- [19] Danielsson J., Awad W., Saraboji K., Kurnik M., Lang L., Leinartaitė L., Marklund S.L., Derek T., Logan D.T., Oliveberg M. // PNAS. 2013. Vol. 110. P. 3829–3834.
- [20] Single Molecule Dynamics in Life Science / Eds by T. Yanagida, Y. Ishii. Wiley VCH Verlag, Weinheim, 2009. 328 p.
- [21] Handbook of molecular Force Spectroscopy / Ed. by A. Noy. Springer, 2008. 326 p.
- [22] Neuman K.E., Nagy A. // Rev. Nature Methods. 2008. V. 5. N 6. P. 491–505.