

В. В. Сарнацкая

Взаимодействие функционализированных олеиновой кислотой и полиэтиленгликолем наночастиц Fe_3O_4 с альбумином

(Представлено академиком НАН Украины В. Ф. Чехуном)

Изучение взаимодействия наночастиц магнетита Fe_3O_4 с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) показало, что молекула белка оказывает стабилизирующее действие на наночастицы магнетита Fe_3O_4 , предохраняя их от агрегирования в водной среде. Установлено, что функционализированные олеиновой кислотой и ПЭГ наночастицы Fe_3O_4 обладают высоким сродством к альбуминовой молекуле ($K_{\text{асс}} \geq 10^5$ /моль). При взаимодействии магнетита с ЧСА происходят конформационные переходы белковой молекулы, затрагивающие область связывания, расположенную во втором ПА домене, которая совпадает с первым I лекарственным центром (Site I) связывания альбуминовой молекулы. Информация о локализации центров ассоциации и конформационных переходах, возникающих при взаимодействии наночастиц Fe_3O_4 с ЧСА, позволит определить их оптимальное молярное соотношение, обеспечивающее стабилизацию наночастиц в жидкой фазе и максимально сохраняющее транспортную емкость самого альбумина в отношении противоопухолевых препаратов, что является актуальным при разработке векторной лекарственной терапии онкологических больных.

Определение возможных сайтов связывания наночастиц на молекуле белка является важнейшей задачей как при изучении их токсичности, так и при разработке, создании и внедрении функциональных и безопасных нанобиогибридных материалов. Слои адсорбированных белков на поверхности частиц, проникающих в биологические системы, сохраняют биоотпечаток самого наноматериала и оказывают влияние на его поглощение, распределение и выведение из организма [1]. Сам процесс адсорбции протеинов вызывает изменение их нативной конформации и функции, что, в свою очередь, может привести к возникновению нежелательных побочных эффектов. Поэтому, зная локализацию мест связывания наночастиц на молекуле белка, можно прогнозировать вероятные биологические последствия и тем самым предотвращать их потенциальную токсичность.

В настоящее время нанобиогибридные системы, основанные на взаимодействии белков с наноматериалами, специально разрабатываются для производства различных зондов, предназначенных для биомедицинской визуализации и сепарации, а также для таргетной доставки лекарственных препаратов [2–4]. Поэтому процесс взаимодействия наноматериалов с белками сыворотки или плазмы крови должен быть стратегически контролируемым для предотвращения негативных последствий каких-либо вмешательств в функциональную систему протеинов, а также способствовать эффективному переносу и естественному распознаванию транспортируемых лекарственных препаратов клетками и тканями организма. Следовательно, тактика соединения наноматериалов с белками требует глубоких знаний о соотношении свойств конкретного наноматериала и связывающего его эпитопа.

Альбумин является основным транспортным белком, на долю которого приходится более 50% всех протеинов плазмы крови. Кристаллическая структура альбумина, по форме напоминающая сердце, имеет размер $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$. В водных растворах молекула белка принимает форму сигары размером $40 \times 140 \text{ \AA}$. Альбумин способен связывать разные по химической природе наночастицы включая частицы магнетита, которые в настоящее время имеют большой потенциал в области биомедицинского использования [5]. Исследования, касающиеся связывания наночастиц Fe_3O_4 размером $8,02 \pm 1,26 \text{ нм}$ с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), базируются на информации о ЧСА как об основном транспортере метаболитов и токсинов эндо- и экзогенной природы, в том числе ксенобиотиков, проникающих через мембранные структуры клеток [6, 7].

Характеристика интерфейса комплекса магнетит–альбумин является важным аспектом в конструировании биопереносчиков для таргетной доставки лекарственных препаратов. Исследования показывают, что структура и функции ЧСА зависят от размера комплексируемых с ним наночастиц, их химического состава, а также локализации связывающего сайта на белке и природы самой связи (ковалентная или нековалентная). Весьма актуальной является информация о константах ассоциации и стехиометрии различных комбинаций белков плазмы крови, в том числе и альбумина, с наночастицами Fe_3O_4 , а также сведения о рейтинге тропности этих белков к магнетиту. Биологические эффекты взаимодействия наночастиц с клеточными рецепторами разнятся в зависимости от относительных скоростей обмена протеинов. Скорость ассоциации и диссоциации может существенно варьировать в зависимости от природы той или иной наночастицы и белковой молекулы. Константа скорости ассоциации представляет собой определенную диффузионно-контролируемую величину, однако конформационные изменения, вызванные взаимодействием протеина с наночастицей, могут снижать ее на несколько порядков. Прочно связанный белок, медленно обменивающийся с другими в комплексе со связанной наночастицей, может участвовать в эндоцитозе, переходя из экстрацеллюлярного пространства в интрацеллюлярное, в то время как слабо связанный или быстро обменивающийся протеин во время переноса может быть вытеснен из комплекса другим внутриклеточным белком. Оценка уровня ассоциации и диссоциации белков и наночастиц, определение временных рамок процессов обмена связанных протеинов со свободными, изучение взаимодействия комплексов белок–наночастица с соответствующими рецепторами и их последующие биологические эффекты являются важной фундаментальной задачей.

Таким образом, изучение специфики взаимодействия функционализированных наночастиц магнетита Fe_3O_4 с лекарственными центрами связывания альбумина позволяет предсказать характер клеточной интернализации полученных комплексов и их дальнейшее биораспределение в организме. Понимание механизма образования комплексов белок–магнетит открывает реальные перспективы их дальнейшего использования в процедурах гипертермии и таргетной лекарственной терапии онкологических больных.

Нами методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии оценивалось комплексообразование наночастиц Fe_3O_4 с молекулами сывороточного альбумина.

Материалы и методы. В работе были использованы: V фракция обезжиренного человеческого сывороточного альбумина, варфарин, диазепам (“Sigma”, США), магнитная жидкость наночастиц Fe_3O_4 (Институт химии поверхности НАН Украины, Киев).

Для термодинамической оценки структурных переходов альбуминовой молекулы при взаимодействии с наночастицами магнетита Fe_3O_4 образцы исходного и нагруженного белка были подвергнуты процессу плавления на приборе ДАСМ-4 (Пушино, Россия) при ско-

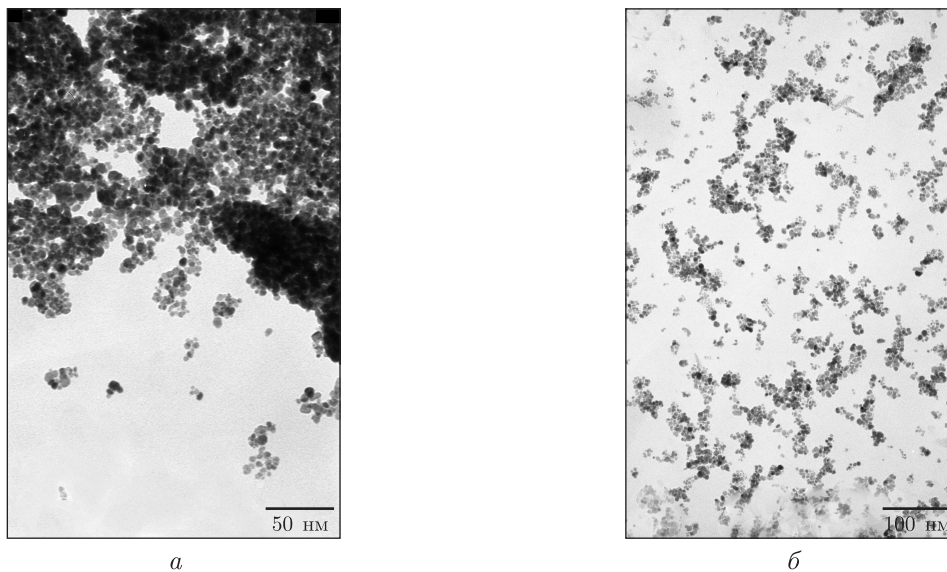


Рис. 1. Трансмиссионная электронная микроскопия: иллюстрация нативных наночастиц Fe_3O_4 до их модификации олеиновой кислотой и ПЭГ (*a*) и наночастиц Fe_3O_4 , стабилизированных ЧСА (*б*)

рости нагрева $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$. Данные кривых плавления были применены для расчета термодинамических параметров тепловой денатурации, а именно: температуры плавления ($T_{\text{пл}}$) и энтальпии плавления ($\Delta H_{\text{пл}}$).

Результаты и обсуждение. Благодаря монодисперсности по размерам, форме и составу, магнитные наночастицы Fe_3O_4 являются идеальным объектом для биомедицинского применения. При диаметре остова менее 20 нм и гидродинамическом диаметре <50 нм эти частицы имеют размер, сопоставимый с ядерными пораами (~ 50 нм) и значительно меньший, чем размер клеток (обычно 10–100 нм) [8]. Исходно синтезированные наночастицы Fe_3O_4 имеют тенденцию к образованию больших агрегатов (рис. 1, *a*) из-за сильного магнитного диполь-дипольного взаимодействия, поэтому для улучшения их стабильности и биосовместимости частицы магнетита покрывают сурфактантами или полимерами, например олеиновой кислотой, хитозаном или полиэтиленгликолем (ПЭГ) [5] (рис. 2, *a*).

Олеиновая кислота образует сильные химические связи с аморфными наночастицами оксида железа, адсорбция ее на их поверхности приводит к уменьшению агрегации, однако затрудняет способность диспергироваться в жидких средах. Для перевода частиц магнетита в гидрофильную форму, что необходимо для биологического применения, их поверхность функционализируют путем дополнительной обработки амфифильными веществами, несущими гидрофобные и гидрофильные группы. Гидрофобный сегмент ПЭГ образует бислои своими углеводородными цепями, в то время как его гидрофильные группы экспонируются во внешнюю среду, обеспечивая тем самым стабильную дисперсию в жидкой фазе. Присоединение ПЭГ цепочек к поверхности наночастиц приводит к уменьшению их клиренса ретикулоэндотелиальной системой, снижению токсичности, уменьшению эндоплазматической деградации, усилению стабильности наночастиц, увеличению периода их полураспада [9], а также обеспечивает лучшую коллоидную стабильность и иммобилизацию биомолекул на поверхности магнетита Fe_3O_4 .

Наночастицы с магнитными свойствами можно дополнительно стабилизировать с помощью белка, в частности альбумина (см. рис. 2, *б*). При этом альбумин увеличивает их

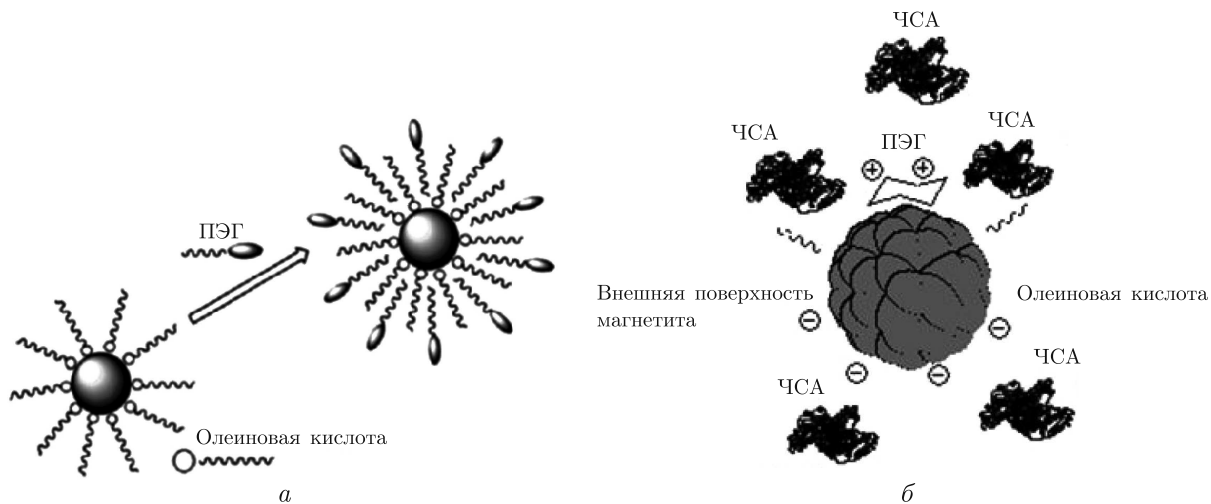


Рис. 2. Модификация наночастиц магнетита Fe_3O_4 олеиновой кислотой и ПЭГ (а) и человеческим сывороточным альбумином (б). Схематическое изображение

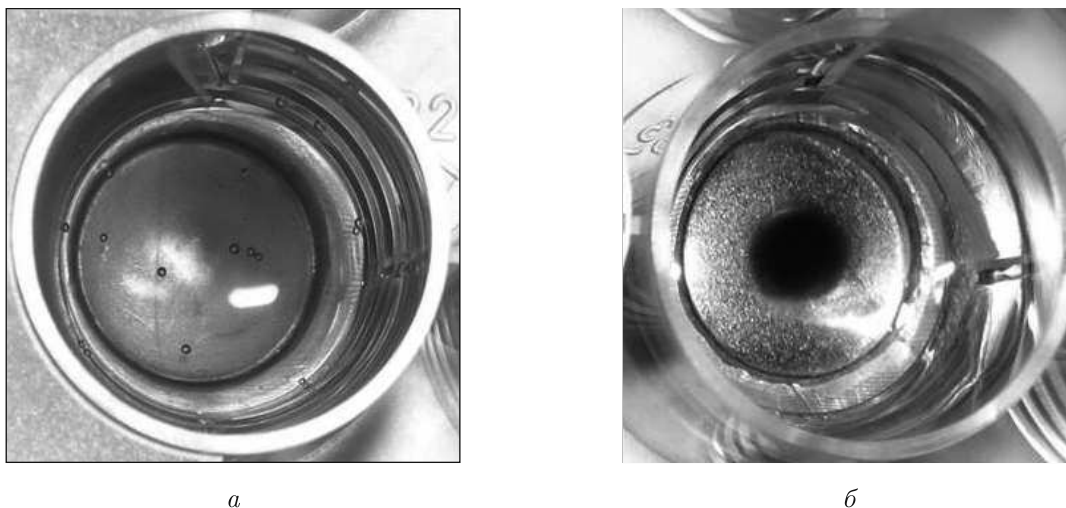


Рис. 3. Поведение наночастиц магнетита Fe_3O_4 в магнитном поле: а — буферный раствор; б — раствор альбумина

функциональность и биосовместимость. В результате получают устойчивые протеин-ферромагнитные жидкости, где белок действует как полиэлектролит. Доказательством тому, что альбуминовая молекула способна обеспечить стабильность наночастиц Fe_3O_4 , служит следующий эксперимент, в котором исходный раствор функционализированного олеиновой кислотой и ПЭГ магнетита был помещен в две лунки на планшете и оставлен на 4 ч в магнитном поле. По истечении этого времени на дне в центре обеих лунок образовался осадок магнетита Fe_3O_4 в виде капли темно-коричневого цвета. Убрав надосадочную жидкость, представляющую собой раствор стабилизирующих веществ, и заменив ее на равный объем буферного раствора в одной лунке или на раствор ЧСА — в другой, планшет оставили еще на 24 ч в магнитном поле. Спустя сутки была обнаружена разница в поведении наночастиц в лунке с буферным раствором (рис. 3, а) и с раствором альбумина (б). На

фотографии четко видно, что в ячейке без альбумина частички магнетита Fe_3O_4 расположились на дне, равномерно покрыв всю его площадь, а в ячейке с альбумином — собрались в центре, образовав темно-коричневую каплю (подобную картину мы наблюдали при экспозиции в магнитном поле исходного неразбавленного раствора магнетита). Вероятнее всего, это связано с отсутствием стабилизирующих веществ в буферном растворе, способных оказывать поддерживающее действие на наночастицы. Это предположение было проверено методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, показавшей, что термограмма плавления альбумина, растворенного в буферном растворе, контактировавшем с частицами Fe_3O_4 (см. рис. 3, *а*), по своим характеристикам полностью совпадает с таковой для коммерческого препарата ЧСА, растворенного в исходном натрий-фосфатном буфере (рисунок не представлен).

Добавление в ячейку 2 мл белка обеспечивает им стабильность и предотвращает седиментацию (см. рис. 3, *б*). При этом наблюдается незначительное снижение исходной концентрации ЧСА в лунке после контакта с частицами магнетита Fe_3O_4 , а именно с 5,83 до 5,07 мг/мл. Следовательно, 1,52 мг ЧСА оказалось достаточно для поддержания частиц магнетита Fe_3O_4 в стабильном состоянии. В отличие от нативных наночастиц Fe_3O_4 (см. рис. 1, *а*) наночастицы в комплексе с альбумином практически равномерно распределены в жидкой фазе и не образуют крупных агрегатов (см. рис. 1, *б*).

Процесс взаимодействия наночастиц магнетита с альбумином был проанализирован методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рис. 4, *а* представлены термограммы плавления комплексов обезжиренного ЧСА с наночастицами Fe_3O_4 , приготовленных при разных молярных соотношениях белка и магнетита. Из рисунка видно, что исходная эндотерма денатурации, принадлежащая препарату обезжиренного ЧСА (кривая 1), представляет собой монопик с температурой плавления 61 ± 1 °С, имеет достаточно большую амплитуду подъема кривой над базовой линией и величину энтальпии плавления, равную 257 кДж/моль. Процесс термической денатурации протекает в интервале 54–68 °С и характеризует необратимое разрушение междоменных и внутримолекулярных связей белка, обеспечивающих его нативную конформацию.

Нагрузка альбумина наночастицами магнетита Fe_3O_4 в молярном соотношении 1/1 (см. рис. 4, *а*, кривая 2) приводит к увеличению температуры плавления на 1 °С, уменьшению амплитуды подъема эндотермы и расширению температурного диапазона, в котором происходит процесс термической денатурации комплекса, а именно с 68 до 77 °С. Наблюдаемые изменения можно объяснить следующим образом: при взаимодействии магнетита Fe_3O_4 с молекулой ЧСА конформация последней изменяется, что отражается на форме кривой плавления, а увеличение температуры денатурации свидетельствует о появлении дополнительной связи между альбуминовой молекулой и функционализирующим агентом, в данном случае олеиновой кислотой или ПЭГ. Следует отметить, что, казалось бы, незначительное увеличение температуры плавления на 1 °С при нагрузке альбумина наночастицами Fe_3O_4 по сравнению с таковой, характерной для исходной ненагруженной молекулы обезжиренного ЧСА, тем не менее, говорит о высоком сродстве магнетита к молекуле белка. Похожая тенденция характерна для веществ, имеющих константу ассоциации $K_{\text{асс}} > 10^5$ /моль [10].

При добавлении еще 1 моля магнетита Fe_3O_4 к обезжиренному альбумину (см. рис. 4, *а*, кривая 3) происходит дальнейшее “распластывание” термограммы вдоль температурной оси (диапазон термоденатурации составляет уже 53–84 °С) и появление второго высоко-температурного максимума в области $74 \pm 0,5$ °С, имеющего первоначально небольшую амплитуду подъема над базовой линией. Добавление 3 или 5 молей наночастиц Fe_3O_4 к мо-

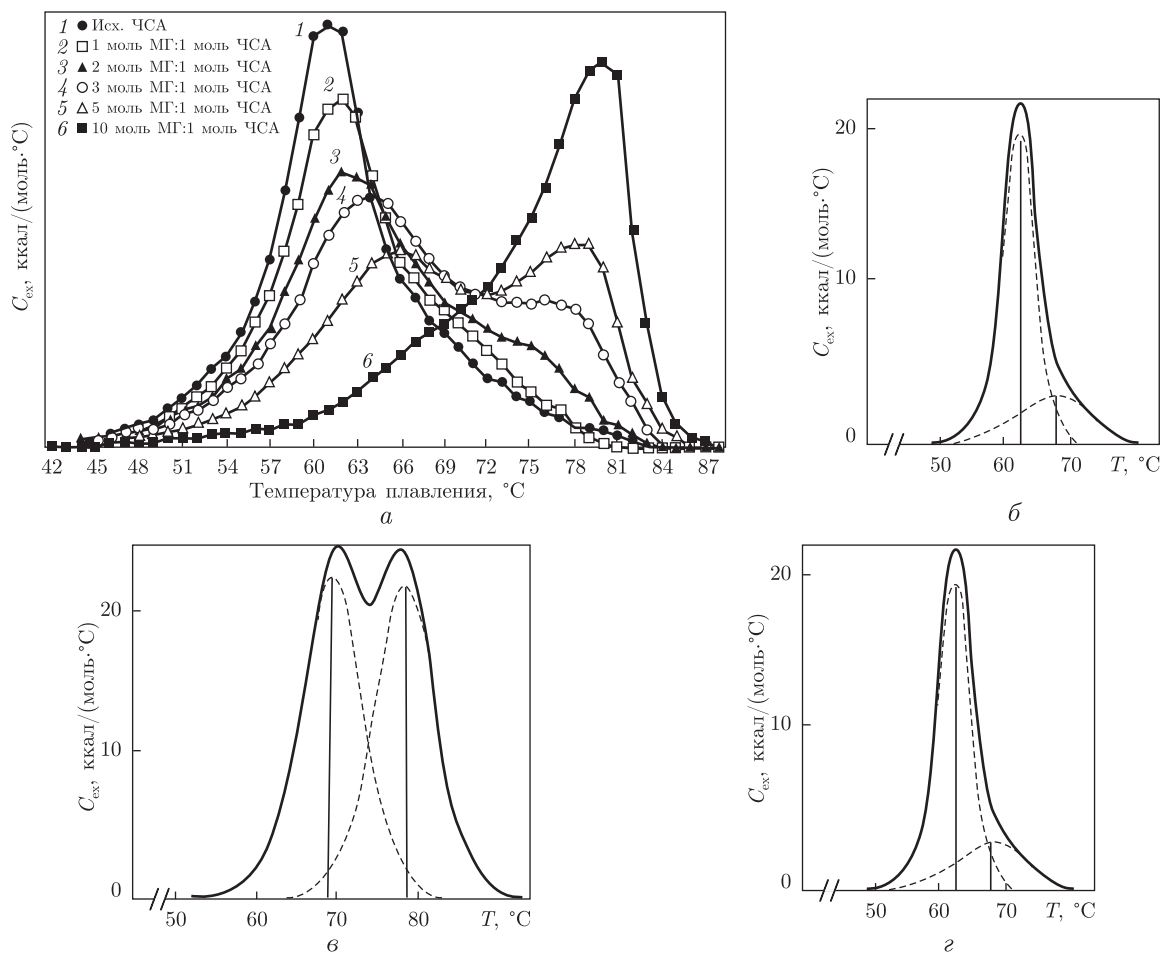


Рис. 4. Термограммы плавления комплексов человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с наночастицами магнетита (МГ) Fe_3O_4 (а) и человеческого сывороточного альбумина до (б) и после нагрузки двумя молями: варфарина (в) и диазепамом (г)

лекуле ЧСА (см. рис. 4, а, кривые 4 и 5) вызывает, помимо сдвига диапазона плавления в область высоких температур, также увеличение вклада второго высокотемпературного максимума в общую эндотерму денатурации. Десятикратная нагрузка молекулы альбумина магнетитом (см. рис. 4, а, кривая б) приводит к резкому изменению характера термограммы плавления по сравнению с таковой для исходной ненагруженной молекулы ЧСА (см. рис. 4, б). В данном случае наблюдается доминирующий второй высокотемпературный максимум с температурой плавления 80 ± 1 °C и энтальпией плавления 430 кДж/моль, а также едва определяемый первый максимум с температурой плавления 70 ± 1 °C.

Чем объясняется появление бимодальности в характере термограмм плавления? Ранее при изучении взаимодействия различных лекарственных препаратов с молекулой альбумина сыворотки методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии мы обратили внимание на то, что в одних случаях при нагрузке ЧСА появляется бимодальность, а в других — нет. Так, например, при нагрузке лекарственными препаратами варфарином и диазепамом (см. рис. 4, в, г) отмечалось различное поведение термограмм плавления соответствующих комплексов. Из рис. 4, в видно, что при нагрузке белка варфарином ам-

плитуда подъема второго высокотемпературного максимума ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) на кривой плавления возрастает, а сама эндотерма принимает выраженный бимодальный характер. В случае с диазепамом (см. рис. 4, *з*) кривая практически не изменяет свою форму и лишь смещается вправо относительно температурной оси в область высоких температур. Оба эти препарата имеют практически равные и достаточно высокие константы ассоциации с молекулой альбумина — $3,3 \cdot 10^5$ и $3,8 \cdot 10^5$ моль⁻¹ для варфарина и диазепама соответственно, однако первый является специфическим маркерным лигандом лекарственного центра связывания I (Site I), а второй — центра II (Site II) [11]. В молекуле ЧСА Site I расположен во втором ПА домене, а Site II — в третьем. Следовательно, наблюдаемые различия в характере термограмм плавления при титровании варфарином и диазепамом косвенно отражают особенности плавления отдельных доменов ЧСА при нагрузке дискретных центров связывания маркер-специфическими лигандами.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы.

Молекула альбумина оказывает стабилизирующее действие на наночастицы магнетита Fe_3O_4 , предохраняя их от агрегирования. Наночастицы магнетита Fe_3O_4 , обработанные олеиновой кислотой и ПЭГ, обладают высоким сродством к молекуле альбумина (константа ассоциации (K_{acc}) не ниже 10^5 моль⁻¹). В процессе взаимодействия наночастиц Fe_3O_4 с ЧСА происходит изменение конформации белковой молекулы, отражающееся на термограммах плавления. Основной регион связывания наночастиц магнетита Fe_3O_4 , функционализированных олеиновой кислотой и ПЭГ, с ЧСА предположительно расположен во втором ПА домене и соответствует первому (Site I) лекарственному центру связывания альбуминовой молекулы.

Наблюдаемые конформационные переходы, возникающие при взаимодействии наночастиц Fe_3O_4 с альбумином, являются важной информацией при создании ферромагнитных жидкостей, предназначенных для векторной нанотерапии злокачественных новообразований.

Исследования проведены при поддержке целевой комплексной программы фундаментальных исследований НАН Украины “Фундаментальные нанотехнологии” в рамках выполнения научного проекта “Комплексный проект: Взаимодействие наноструктурных материалов с нормальными и опухолевыми клетками, разработка методов доставки, безопасность их использования”.

1. Aggarwal P., Hall J. B., McLeland C. B. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2009. – **61**, No 6. – P. 428–437.
2. Berry C. C., Charles S., Wells S. et al. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture // *Int. J. Pharm.* – 2004. – **269**, No 1. – P. 211–225.
3. Alexiou C., Arnold W., Klein R. J. et al. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting // *Cancer Res.* – 2000. – **60**, No 23. – P. 6641–6648.
4. Jain T. K., Reddy M. K., Morales M. A. et al. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats // *Mol. Pharm.* – 2008. – **5**, No 2. – P. 316–327.
5. Nicolbs P., Saleta M., Troiani H. et al. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues // *Acta Biomater.* – 2013. – **9**, No 1. – P. 4754–4762.
6. Clifffel D. E., Turner B. N., Huffman B. J. Nanoparticle-based biologic mimetics // *Wiley Interdiscip Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* – 2009. – **1**, No 1. – P. 47–59.
7. Nitta S. K., Numata K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – **14**, No 1. – P. 1629–1654.
8. Zhang B., Xing Y., Li Z. et al. Functionalized carbon nanotubes specifically bind to alpha-chymotrypsin’s catalytic site and regulate its enzymatic function // *Nano Lett.* – 2009. – **9**, No 6. – P. 2280–2284.

9. Gillich T., Acikgoz C., Isa L. et al. PEG-Stabilized Core-Shell Nanoparticles: Impact of Linear versus Dendritic Polymer Shell Architecture on Colloidal Properties and the Reversibility of Temperature-Induced Aggregation // ACS Nano. – 2012. – 7, No 1. – P. 316–329.
10. Сарнацкая В. В. Структурно-функциональные особенности сывороточного альбумина у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности и разработка методов удаления белок-ассоциированных уремиических токсинов: Дис. ... д-ра биол. наук: 17.06.11. – Киев, 2011. – 289 с.
11. Sudlow G., Birkett D. J., Wade D. N. Spectroscopic techniques in the study of protein binding: the use of 1-anilino-8-naphthalenesulphonate as a fluorescent probe for the study of the binding of iophenoxic and iopanoic acids to human serum albumin // Mol. Pharmacol. – 1975. – 11, No 6. – P. 824–832.

Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 04.04.213

В. В. Сарнацка

Взаємодія функціоналізованих олеїновою кислотою і поліетиленгліколем наночастинок Fe_3O_4 з альбуміном

Вивчення взаємодії наночастинок магнетиту Fe_3O_4 з сироватковим альбуміном людини (САЛ) показало, що молекула білка надає наночастинкам магнетиту стабілізуючу дію, оберігаючи їх від агрегування у водному середовищі. Встановлено, що функціоналізовані олеїновою кислотою і ПЕГ наночастинки Fe_3O_4 мають високу спорідненість до альбумінової молекули ($K_{\text{асс}} \geq 10^5$ /моль). При взаємодії магнетиту з САЛ відбуваються конформаційні переходи білкової молекули, що знаходяться в області зв'язування, розташованій в другому ІІА домені, що збігається з першим І лікарським центром зв'язування (Site I) альбумінової молекули. Інформація про локалізацію центрів асоціації та конформаційні переходи, що виникають при взаємодії наночастинок Fe_3O_4 з ЧСА, дозволить визначити їх оптимальне молярне співвідношення, яке забезпечує стабілізацію наночастинок у рідкій фазі і максимально зберігає транспортну ємність самого альбуміну у відношенні до протипухлинних препаратів, що є актуальним при розробці векторної лікарської терапії онкологічних хворих.

V. V. Sarnatskaya

Interaction of magnetite Fe_3O_4 nanoparticles functionalized with oleic acid and polyethylene glycol with albumin

In the study of the interaction between magnetite Fe_3O_4 nanoparticles with human serum albumin (HSA), it has been established that the protein molecule exerts a stabilizing effect toward magnetite Fe_3O_4 nanoparticles preserving them from aggregation in aqueous medium. It has been shown that Fe_3O_4 nanoparticles functionalized with oleic acid and polyethylene glycol (PEG) possess a high affinity toward albumin molecule ($C_{\text{ass}} \geq 10^5$ /Mole). During the interaction between magnetite and HSA, there occur conformation transitions of the protein molecule related to the binding region, which is located in the II A domain and coincides with the first (Site I) drug binding center of albumin molecule. Information about the localization of association centers and conformation transitions, which emerge during interactions between Fe_3O_4 nanoparticles with HSA, will allow one to determine their optimal molar ratio providing the stabilization of nanoparticles in the liquid phase and maximally restoring the transport capacity of albumin toward anticancer preparations, what is important for the development of targeted chemotherapy of cancer patients.