

УДК 577.334

ПЕРОКСИДАЗОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКОВ КРОВИ

© 2023 г. М. Г. Горобец^{1,*}, А. В. Бычкова¹, М. И. Абдуллина¹, М. В. Мотякин^{1,2}

Представлено академиком РАН А.Г. Габировым

Поступило 25.04.2023 г.

После доработки 20.06.2023 г.

Принято к публикации 21.06.2023 г.

Впервые определены особенности генерации гидроксильных радикалов, образующихся из пероксида водорода в водных растворах, содержащих магнитные наночастицы (МНЧ), гемоглобин (Hb), иммуноглобулин G (IgG) и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА). Получены зависимости скорости образования продукта окисления о-фенилендиамина (о-ФДА) от концентрации МНЧ в растворе, а также от концентрации белков. Установлено, что в присутствии ЧСА и IgG пероксидазоподобная активность МНЧ уменьшается, в то время как добавление Hb в реакционную смесь приводит к снижению или увеличению детектируемой генерации радикалов в зависимости от количества белка. Полученные эффекты могут быть использованы при разработке систем на основе МНЧ для тераностики, в частности, подавления роста опухолей, и при прогнозировании способности частиц катализировать генерацию активных форм кислорода (АФК) *in vivo*.

Ключевые слова: активные формы кислорода, магнитные наночастицы, о-фенилендиамин, иммуноглобулин G, человеческий сывороточный альбумин, гемоглобин, пероксидазоподобная активность, 2,3-диаминофеназин, гидроксильный радикал

DOI: 10.31857/S2686738923600322, EDN: OYKFPN

Магнитные наночастицы (МНЧ) оксидов железа в течение последних десятилетий широко применяются в исследованиях, направленных на создание функциональных материалов биомедицинского назначения: материалов для адресной доставки лекарственных веществ, магнитной гипертермии, магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии и др. [1, 2]. Способность МНЧ в физиологических условиях катализировать образование активных форм кислорода (АФК) и обеспечивать ферроптоз клеток используется для подавления роста опухолей [3]. В то же время вопрос применения МНЧ тесно связан с анализом особенностей их токсического воздействия на организм [4–6]. Известно, что физиологическую совместимость и функциональность систем на основе МНЧ могут обеспечивать

белковые покрытия. Среди белков, наиболее часто входящих в состав покрытия, стоит выделить сывороточный альбумин (бычий и человеческий) [7], а также иммуноглобулины G, обеспечивающие возможность нацеливания наночастиц на биологические мишени по механизму “антиген-антитело” *in vivo* [8] и применяющиеся в различных аспектах иммуносорбции, биохимических анализов и т.д. [2]. Наряду с альбумином, имеющим высокое содержание в плазме крови, иммуноглобулины G (8–12 мг/мл в крови) могут участвовать в формировании “белковой короны” на частицах при их введении *in vivo* [9]. Также в настоящее время интерес исследователей привлекает гемоглобин, как белок, с которым частицы могут взаимодействовать при гемолизе [10] и способный в виде конъюгатов с альбумином к обеспечению транспорта кислорода [11]. Вопрос о влиянии белков крови на генерацию АФК, катализируемую поверхностью наночастиц оксидов железа, на сегодняшний день мало изучен, а количество исследований в этой области ограничено [12].

Целью настоящей работы является определение закономерностей влияния белков крови на генерацию гидроксильных радикалов при распаде пероксида водорода, катализируемую поверхностью МНЧ в среде с pH, близкими к нейтральным. Генерацию радикалов контролировали с по-

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук”, Москва, Россия

*e-mail: maria.g.gorobets@gmail.com

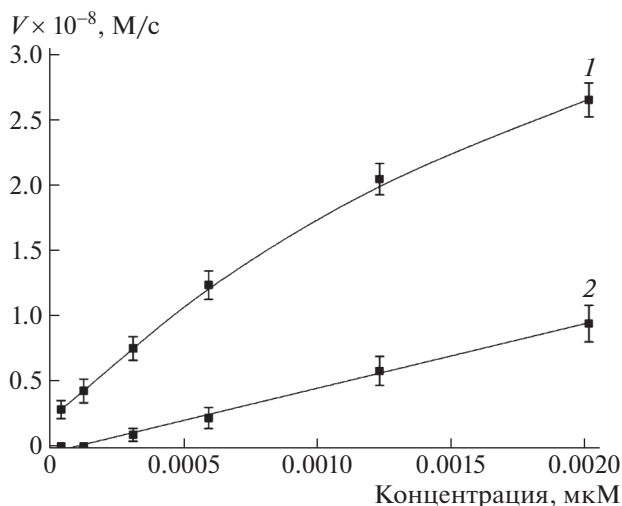


Рис. 1. Зависимость скорости образования 2,3-диаминофеназина (окФДА) от концентрации магнитных наночастиц (1) и пероксидазы хрена (2). $[\text{H}_2\text{O}_2] = 9.8 \text{ mM}$, $[\text{o-ФДА}] = 0.075 \text{ mM}$, температура 37°C .

мощью процесса окисления о-фенилендиамина (о-ФДА), приводящего к образованию продукта 2,3-диаминофеназина (окФДА) с максимумом поглощения при 415–455 нм [13, 14].

В работе использовали МНЧ оксидов железа, синтезированные и электростатически стабилизированные по описанной ранее методике [15]. Частицы, имеющие наибольший вклад в объемное распределение частиц по размерам, полученное методом динамического светорассеяния (ДСР), определенного на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern, Великобритания), характеризовались эффективными диаметрами 38–44 нм. Расчетная исходная массовая концентрация МНЧ в золе составляла 40 мг/мл, мольная концентрация магнитных частиц — около $1.33 \times 10^{-3} \text{ mM}$ [16]. Золи разбавляли водой непосредственно перед экспериментом. После разбавления золя детектируемые методом ДСР размеры частиц сохранялись неизменными не менее 24 ч. о-Фенилендиамин (о-ФДА) (P9029, Sigma-Aldrich), пероксид водорода (95321, Sigma-Aldrich), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (A1653, Sigma-Aldrich), пероксидазу хрена (HRP) (3329.00001, Диаэм, Россия) и гемоглобин (Hb) (ГМ-4, НПО “Ренам”, Россия) использовали без предварительной очистки. Иммуноглобулин G (IgG) (НПО “Микроген”, Россия) подвергали очистке, как описано в [17]. Перед добавлением пероксида водорода и о-ФДА в исследуемые образцы (содержащие МНЧ и/или белки) образцы инкубировались в течение 30 мин. Значение pH в реакционных системах было постоянным в диапазоне 6.7 ± 0.2 . Измерения оптической плотности (OD) исследуемых растворов проводились на спектро-

фотометре SPECTROstar NANO (BMG, Германия) при 37°C на длине волны ($\lambda_{\text{max}} = 418 \text{ нм}$). Скорость образования 2,3-диаминофеназина (окФДА), V [М/с], которая пропорциональна скорости генерации гидроксильных радикалов, была определена по тангенсу угла наклона начального участка изменения OD с использованием коэффициента экстинкции $13\,000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, представленного в работе [18]. Значение скоростей определялось как минимум в трех независимых экспериментах.

Одним из объяснений способности к генерации гидроксильных радикалов магнитными наночастицами является наличие на их поверхности остаточных ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} [19]. На рис. 1 представлена зависимость скорости образования окФДА от концентрации МНЧ (кривая 1) в растворе. При высоких концентрациях МНЧ данная зависимость перестает быть линейной, что, по-видимому, обусловлено агломерацией наночастиц в растворе. На рис. 1, также, представлена зависимость скорости образования окФДА от концентрации пероксидазы хрена (кривая 2). Отметим, что скорость генерации гидроксильных радикалов пероксидазой хрена заметно ниже, чем магнитными наночастицами (например, при концентрациях менее 3 нМ — ниже более, чем на порядок). Данный результат возможен вследствие наличия на поверхности наночастицы некоторого количества ионов железа, способных катализировать образование гидроксильных радикалов, тогда как молекула пероксидазы хрена имеет только один ион железа.

При добавлении к исследуемому раствору (о-ФДА, МНЧ, H_2O_2) альбумина или иммуноглобулина G наблюдается понижение скорости V (рис. 2), связанное, на наш взгляд, с уменьшением детектируемой пероксидазоподобной активности МНЧ. Полученный результат может объясняться одним или несколькими явлениями: (1) перехватом гидроксильных радикалов, генерируемых на поверхности МНЧ из пероксида водорода, молекулами белка; (2) взаимодействием белков с молекулами о-ФДА и/или окФДА, влияющим на окислительную реакцию; (3) экранированием поверхности МНЧ адсорбированными молекулами белка.

Отметим разницу в зависимостях снижения скорости реакции для разных белков, которая, по-видимому, обусловлена различиями в структуре белков, определяющей особенности их взаимодействия с поверхностью МНЧ, и в их молекулярных массах.

На рис. 3 показана зависимость скорости окисления о-ФДА от концентрации гемоглобина в растворе МНЧ (кривая 1). При концентрациях Hb в образцах, содержащих и не содержащих МНЧ, от 12.5 до 37.0 нМ отмечено увеличение

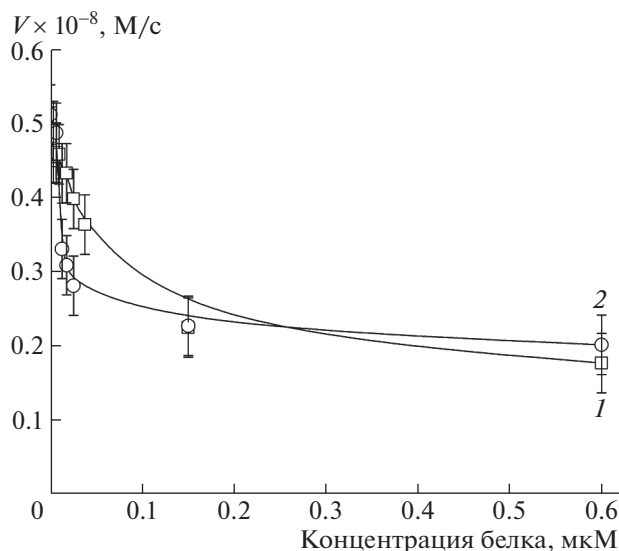


Рис. 2. Зависимость скорости образования окФДА от мольной концентрации альбумина (1) и иммуноглобулина G (2). $[МНЧ] = 0.16$ нМ, $[H_2O_2] = 9.8$ мМ, $[o\text{-ФДА}] = 0.075$ мМ, температура 37°C .

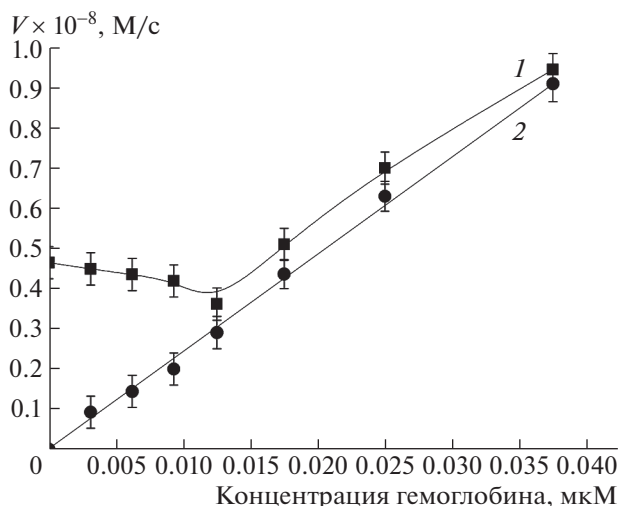


Рис. 3. Зависимость скорости образования окФДА от концентрации гемоглобина в присутствии магнитных наночастиц (1) и их отсутствии (2). $[МНЧ] = 0.16$ нМ, $[H_2O_2] = 9.8$ мМ, $[o\text{-ФДА}] = 0.075$ мМ, температура 37°C .

скорости V (рис. 3), связанное, вероятно, со способностью гемового железа в составе гемоглобина катализировать разложение пероксида водорода. При концентрациях Hb ниже 10 нМ и постоянной концентрации МНЧ в растворе не наблюдается роста пероксидазоподобной активности МНЧ в присутствии Hb . Поскольку при концентрациях гемоглобина от 0 до 10 нМ наблюдается рост скорости окисления $o\text{-ФДА}$ от концентрации в отсутствие МНЧ в анализируемом образце (рис. 3, кривая 2), а суперпозиция V для МНЧ и Hb при концентрациях белка ниже 12.5 нМ привела бы к зависящему от концентрации Hb приросту V (так, например, при концентрации Hb около 9 нМ можно было бы ожидать около $0.65 \cdot 10^8$ М/с), которого не происходит для системы, содержащей одновременно МНЧ и Hb , мы предполагаем, что имеет место экранирование поверхности МНЧ молекулами гемоглобина при адсорбции, сопровождаемое снижением их суммарной V до значений, близких к исходным V , характерным для МНЧ. Данное уменьшение скорости обусловлено, на наш взгляд, экранированием поверхности МНЧ молекулами гемоглобина при адсорбции. Хотя отметим, что, как и в случае с ЧСА и IgG, влияют на скорость окисления $o\text{-ФДА}$ могут и другие выше перечисленные факторы.

Таким образом, нами впервые определены особенности генерации гидроксильных радикалов, образующихся из пероксида водорода в водных растворах, содержащих магнитные наночастицы (МНЧ), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), иммуноглобулин G (IgG) и ге-

моглобин (Hb) и получены зависимости скорости образования продукта окисления $o\text{-ФДА}$ от концентрации МНЧ в растворе, а также от концентрации белков. Установлено, что в присутствии всех белков (ЧСА, IgG и Hb) пероксидазоподобная активность МНЧ уменьшается, причем добавление Hb в реакционную смесь приводит к снижению или увеличению детектируемой генерации радикалов в зависимости от количества белка.

В заключение отметим, что выявленный нами эффект экранирования белками поверхности МНЧ (в случае сывороточного альбумина, иммуноглобулина G) и, вследствие этого, снижения активности частиц в реакциях генерации гидроксильных радикалов, может иметь место при создании гибридных белок-содержащих покрытий на МНЧ для тераностики опухолей, а также вследствие адсорбции белков на МНЧ при введении МНЧ *in vivo*, что будет приводить к снижению потенциальной токсичности гибридных материалов на основе МНЧ при их циркуляции по кровотоку. Как при создании покрытий, так и при оценке потенциальной токсичности материалов влияние белков на пероксидазоподобную активность МНЧ определяется структурой этих белков, а дальнейшее изучение активности поверхности МНЧ в присутствии низких концентраций белков может представлять особый интерес, будучи связанным с особенностями формирования адсорбционного слоя из молекул этих белков на поверхности МНЧ.

В случае гемоглобина, как мы предполагаем, требуется дополнительное исследование возможности повышения способности МНЧ катализировать генерацию АФК вследствие адсорбции на их поверхности различных количеств гемоглобина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>, за исключением отдельных работ, описанных ниже. Отдельные работы, связанные с исследованиями взаимодействия гемоглобина с наночастицами, выполнены за счет средств федерального бюджета Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ИБХФ РАН (тема № 122041300210-2).

Размеры частиц определены с использованием оборудования ЦКП “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликты интересов со стороны авторов отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savliwala S., Chiu-Lam A., Unni M., et al. Magnetic nanoparticles. In: Chung E.J., Leon L., Rinaldi C., editors. *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Amsterdam: // Elsevier; 2020. P. 195–221.
2. Бычкова А.В., Сорокина О.Н., Розенфельд М.А., и др. Многофункциональные биосовместимые покрытия на магнитных наночастицах // *Успехи химии*. 2012. Т. 81. № 11. С. 1026–1050.
3. Gao L., Fan K., Yan X. Iron oxide nanozyme: A multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications // *Theranostics*. 2017. V. 7. № 13. P. 3207–3227.
4. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles // *Small*. 2008. Vol. 4. № 1. P. 26–49.
5. Lui M., Lui B., Lui Q., et al. Nanomaterial-induced ferroptosis for cancer specific therapy // *Coordination Chemistry Reviews*. 2019. Vol. 382. P. 160–180.
6. Wang Y., Ding L., Yao C., et al. Toxic effects of metal oxide nanoparticles and their underlying mechanisms // *Science China Materials*. 2017. Vol. 60. № 2. P. 93–108.
7. Chubarov A.S. Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating // *Magnetochemistry* 2022. V. 8. № 2. P. 1–18.
8. Bakhtiary Z., Saei A.A., Hajipour M.J., et al. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: possibilities and challenges // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2016. V. 12. № 2. P. 287–307.
9. Tenzer S., Docter D., Kuharev J., et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology // *Nature nanotechnology*. 2013. V. 8. № 10. P. 772–781.
10. Caño R. del, Mateus L., Sánchez-Obrero G., et al. Hemoglobin bioconjugates with surface-protected gold nanoparticles in aqueous media: the stability depends on solution pH and protein properties // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017. V. 505. P. 1165–1171.
11. Tomita D., Kimura T., Hosaka H. et al. Covalent core-shell architecture of hemoglobin and human serum albumin as an artificial O₂ carrier // *Biomacromolecules*. 2013. V. 14. № 6. P. 1816–1825.
12. Bychkova A.V., Yakunina M.N., Lopukhova M.V., et al. Albumin-functionalized iron oxide nanoparticles for theranostics: engineering and long-term in situ imaging // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. P. 2771.
13. Григоренко Ю.А., Метелица Д.И., Пивень Н.В., и др. Высокоэффективная тест-система для определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови человека // *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55. № 3. С. 350–360.
14. Vetr F., Moradi-Shoeili Z., Özkar S. Oxidation of o-phenylenediamine to 2,3-diaminophenazine in the presence of cubic ferrites MFe₂O₄ (M = Mn, Co, Ni, Zn) and the application in colorimetric detection of H₂O₂ // *Applied Organometallic Chemistry*. 2018. V. 32. № 90. Art. № e4465.
15. Прусаков В.Е., Максимов Ю.В., Нищев К.Н., и др. Гибридные, биodeградируемые нанокомпозиты на основе биополиэфирной матрицы и магнитных наночастиц оксида железа: структурные, магнитные и электронные характеристики // *Химическая физика*. 2018. Т. 37. № 1. С. 83–90.
16. Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., et al. The influence of pH and ionic strength on the interactions between human serum albumin and magnetic iron oxide nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. V. 194. P. 654–665.
17. Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., et al. Interaction between immunoglobulin G and peroxidase-like iron oxide nanoparticles: Physicochemical and structural features of the protein // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2020. V. 1868. № 1. P. 140300.
18. Fu P.K.-L., Abuzakhm S., Turro C. Photoinduced DNA cleavage and cellular damage in human dermal fibroblasts by 2,3-Diaminophenazine // *Photochemistry and Photobiology*. 2005. V. 81. P. 89–95.
19. Gao L., Zhuang J., Nie L., et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles // *Nature Nanotechnology*. 2007. V. 2. P. 577–583.

PEROXIDASE-LIKE ACTIVITY OF MAGNETIC NANOPARTICLES IN THE PRESENCE OF BLOOD PROTEINS

M. G. Gorobets^{a,#}, A. V. Bychkova^a, M. I. Abdullina^a, and M. V. Motyakin^{a,b}

^a*Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: maria.g.gorobets@gmail.com*

The generation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in aqueous solutions containing magnetic nanoparticles (MNPs), hemoglobin (Hb), immunoglobulin G (IgG), and human serum albumin (HSA) has been determined. The dependence of the rate of formation of the oxidized product of o-phenylenediamine (o-PDA) on the concentration of MNPs in solution, as well as on the concentration of proteins, was obtained. The peroxidase-like activity of MNPs was shown to decrease in the presence of HSA and IgG, while the addition of Hb to the reaction mixture was leading to its decrease and increase depending on protein concentration. The obtained effects can be used in the development of systems based on MNPs for theranostics, in particular, for suppression of tumor growth, and in predicting the ability of particles to catalyze the generation of reactive oxygen species (ROS) *in vivo*.

Keywords: reactive oxygen species, magnetic nanoparticles, ortho-phenylenediamine, immunoglobulin G, human serum albumin, hemoglobin, peroxidase-like activity, 2,3-diaminophenazine, hydroxyl radical