

Исследование взаимодействия наночастиц оксида железа, полученных в акустоплазменном разряде с кавитацией, с фибриногеном плазмы крови с помощью методов светорассеяния

М.Н. Кириченко¹, Л.Л. Чайков¹, С.В. Кривохижа¹, Н.А. Булычев^{1,2},
М.А. Казарян¹, А.Р. Зарицкий^{1*}

¹Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН
119991, г. Москва, Ленинский пр., 53

²Московский авиационный институт
125993, г. Москва, Волоколамское шоссе, 4

Поступила в редакцию 17.01.2018 г.

С помощью методов динамического светорассеяния исследовано взаимодействие наночастиц оксида железа, полученных в акустоплазменном разряде с кавитацией, с фибриногеном плазмы крови в модельном растворе. Показано, что в зависимости от времени хранения наночастиц их взаимодействие с указанным белком происходит по-разному и проявляется в различной динамике изменений распределений интенсивности рассеянного света по размерам рассеивающих частиц (агрегатов белка с наночастицами), образующихся в результате этого взаимодействия. Биологическое действие наночастиц одинаковое вне зависимости от времени их хранения – они выступают ингибиторами реакции образования фибринового геля.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, акустоплазменный разряд с кавитацией, фибриноген плазмы крови, динамическое светорассеяние, образование фибринового геля; iron oxide nanoparticles, acoustoplasma discharge with cavitation, blood plasma fibrinogen, dynamic light scattering, fibrin gel formation.

Введение

Исследование взаимодействий наночастиц (НЧ) с белками плазмы крови представляет собой актуальную задачу в первую очередь потому, что наночастицы находят все более широкое применение в медицинской практике. Например, наночастицы оксида железа активно используются для визуализации изображений патогенных очагов и их локальной гипертермии. Вне зависимости от способа и целей введения наночастиц в живой организм они попадают в кровяное русло и могут взаимодействовать с белками и форменными элементами крови, что может иметь как желательные, так и негативные последствия. В обзорах [1, 2] представлены эффекты, возникающие в крови в результате взаимодействия наночастиц с ферментами, участвующими в процессах свертывания крови (белками, тромбоцитами и др.). К положительным эффектам авторы относят остановку кровотоков в результате активации коагу-

ляции или, наоборот, ингибирование коагуляции за счет улучшения свойств антикоагуляционных препаратов, растворение тромбов и др.; к негативным эффектам – избыточное образование агрегатов, нежелательное замедление некоторых биологических реакций, адсорбцию белков на поверхности наночастиц и их инактивацию и т.д.

Многообразие перечисленных эффектов обуславливает необходимость тщательного изучения взаимодействия новых наночастиц (полученных акустоплазменным методом с кавитацией) с белками плазмы крови в модельных растворах. Для этого широко используются различные оптические методы, такие как динамическое и статическое светорассеяние [3], спектроскопия ближнего ультрафиолетового и видимого диапазонов, спектроскопия поверхностного плазменного резонанса и пр. [4, 5]. В настоящей работе с помощью методов динамического светорассеяния проводится исследование взаимодействия новых наночастиц оксида железа, полученных акустоплазменным методом с кавитацией, с белком плазмы крови фибриногеном.

Цель работы – анализ динамики изменений распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в модельном растворе фибриногена после добавления в него наночастиц оксида железа, используемых в день изготовления и через пять суток

* Марина Николаевна Кириченко (maslovamarina87@gmail.com); Леонид Леонидович Чайков (chaik@sci.lebedev.ru); Светлана Владимировна Кривохижа (skrivokh@sci.lebedev.ru); Николай Алексеевич Булычев (nbulychev@mail.ru); Мишик Айразатович Казарян (kazarmishik@yahoo.com); Александр Романович Зарицкий (zaritskii@sci.lebedev.ru).

после их получения, а также выяснение влияния присутствия наночастиц в модельном растворе на ферментативную реакцию образования фибринового геля при добавлении в раствор фермента тромбина.

Экспериментальные установки и подготовка образцов

В работе использовалась установка, специально разработанная для получения наночастиц оксида железа в акустоплазменном разряде с кавитацией. Ее схема показана на рис. 1.

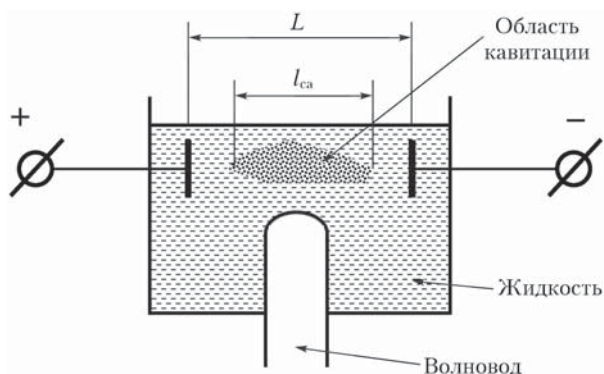


Рис. 1. Схема плазменного разряда в кавитирующей жидкости (L – расстояние между электродами; $l_{ка}$ – размер области кавитации)

Разряд инициируется в бидистиллированной воде между железными электродами с постоянным током 4 А и напряжением 40 В. Ультразвуковой генератор с пьезокерамическим преобразователем обеспечивает выходную акустическую мощность до 2 кВт в диапазоне частот 27–44 кГц. Интенсивность ультразвукового поля в объеме жидкости достигает 10 Вт/см². В результате получают наночастицы с относительно узким распределением частиц по размерам со специфическими свойствами поверхности [6, 7]. Технология получения наночастиц подробно описана в [8].

Измерения проводились на традиционной установке по динамическому рассеянию света [9]. Источником света служил He–Ne-лазер с длиной волны 633 нм и мощностью 5–30 мВт. В качестве приемника рассеянного излучения использовался малошумящий лавинный фотодиод с катодом диаметром 30 мкм фирмы «Фотокор». Сигнал с фотодиода поступал на усилитель-дискриминатор, с выхода которого он подавался на вход коррелятора со сдвиговым регистром. Все эксперименты с модельными растворами белков проводились при температуре 37 °С в кювете, установленной в термостат. Распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц получены для угла рассеяния 30°.

Модельный раствор фибриногена готовили из человеческого фибриногена, полученного из SigmaAldrich (свертываемость белка $\geq 80\%$), разведением его в Tris-HCl-буфере (7,4 рН). Конечная концентрация фибриногена составляла 2 мг/мл. Для избавления от естественных сгустков фибрино-

гена проводили фильтрацию раствора через фильтр SuperPurePVDF 0,2 мкм.

Наночастицы оксида железа после получения хранились в специальной закрытой емкости в бидистиллированной воде. В процессе хранения наночастиц в водном растворе имела место их агрегация. Для разрушения крупных агрегатов раствор обрабатывали в ультразвуковой ванне при мощности генератора 60 Вт и фильтровали через фильтр 1,2 мкм. Конечная объемная концентрация наночастиц оксида железа в исследуемом растворе составляла $C_v \approx 0,5 \cdot 10^{-7}$, а числовая $n_p \approx 4 \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$. Средние гидродинамические радиусы агрегатов наночастиц в растворе после всех манипуляций составляли 183 и 7900 нм.

Результаты и обсуждение

На рис. 2, 3 представлена динамика распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц в модельном растворе фибриногена с добавлением наночастиц оксида железа, время хранения которых составляло 1 день и 5 дней после их получения. Видно, что при добавлении свежесинтезированных и используемых для экспериментов в день их приготовления наночастиц (рис. 2, б) начальное распределение, представленное на рис. 2, а, существенным образом изменяется – появляются частицы (агрегаты наночастиц с белком) со средним размером 404 нм, а частицы со средним размером 14 нм, соответствующие мономерам фибриногена, исчезают. Указанная на рис. 2 величина полной интенсивности светорассеяния I/I_L (I – интенсивность светорассеяния; I_L – интенсивность возбуждающего излучения, измеряется в относительных единицах; в таких же единицах измеряется интенсивность при проведении тарировочных измерений в толуоле для определения абсолютной интенсивности рассеяния) увеличивается на порядок, что также свидетельствует об образовании агрегатов наночастиц с белком. На следующий день (рис. 2, д) в том же самом образце наблюдается появление частиц со средними размерами 14 и 132 нм, что близко к начальным размерам молекул и агрегатов фибриногена в растворе. Такое изменение распределений свидетельствует, по-видимому, о том, что агрегация наночастиц с фибриногеном – обратимый процесс.

Численные значения параметров, характеризующих распределения рассеянного света по гидродинамическим радиусам частиц исследуемых растворов, приведены в таблице.

При добавлении к раствору фибриногена наночастиц, срок хранения которых составлял 5 дней, распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц остаются практически неизменными (относительно фибриногена без добавления наночастиц) (рис. 3); не наблюдается и увеличения полной интенсивности светорассеяния. Такое поведение параметров светорассеяния свидетельствует о том, что молекулы фибриногена не образуют большого количества крупных агрегатов с «выдержанными» наночастицами (как в случае, представленном на рис. 2).

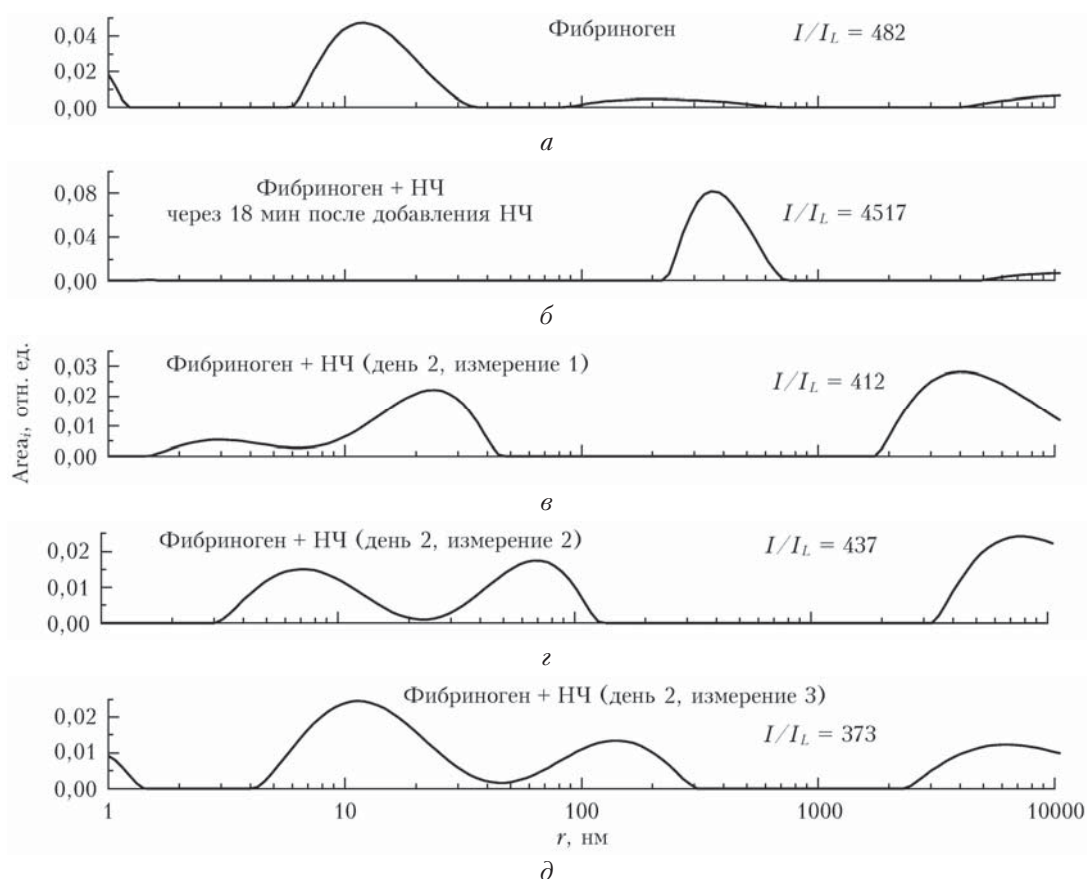


Рис. 2. Динамика распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц в модельном растворе фибриногена с добавлением наночастиц оксида железа (время хранения наночастиц ~ 1 день): чистый фибриноген (*a*), раствор фибриногена с наночастицами через 18 мин (*b*), через ~ 20 ч (*в*–*д*) после добавления наночастиц

Значения параметров, характеризующих пики в распределении интенсивности рассеянного света по размерам частиц, в растворе фибриногена с добавлением наночастиц оксида железа: время после добавления наночастиц к раствору фибриногена (t), площадь пика в распределении интенсивности рассеянного света по радиусам частиц ($Area_i$), средний гидродинамический радиус частиц (r_i), полная интенсивность рассеяния (I/I_L)

Исследуемый раствор	t	$Area_1$, отн. ед.	r_1 , нм	$Area_2$, отн. ед.	r_2 , нм	$Area_3$, отн. ед.	r_3 , нм	I/I_L , отн. ед.
Фибриноген (рис. 2, <i>a</i>)	0	0,7	14,6	0,85	264	0,195	$2,2 \cdot 10^4$	482
Фибриноген + НЧ	12 мин	—	—	0,861	492,2	0,14	$2,2 \cdot 10^4$	3087
Фибриноген + НЧ	18 мин	—	—	0,8	404,5	0,19	$3,1 \cdot 10^4$	4517
Фибриноген + НЧ	21 мин	—	—	0,64	351,5	0,36	3879	2673
<i>День 2</i>								
Фибриноген + НЧ	19 ч 55 мин	0,073	3,9	0,352	22,12	0,575	5799	412
Фибриноген + НЧ	19 ч 59 мин	0,26	8,87	0,23	71,4	0,52	$1,2 \cdot 10^4$	437
Фибриноген + НЧ	20 ч 7 мин	0,47	13,7	0,222	132,0	0,292	8490	373

Таким образом, данные, представленные на рис. 2 и 3, показывают, что в зависимости от времени, прошедшего с момента получения частиц до момента их использования, их взаимодействие с фибриногеном происходит по-разному: в одном случае с образованием крупных агрегатов, а в другом — без.

Интерес представляет вопрос об изменении взаимодействия фибриногена с тромбином в присутствии в растворе наночастиц оксида железа. После добавления к раствору фибриногена наночастиц оксида железа и инкубации их с белком в течение некоторого времени к модельному раствору добавлялся фермент —

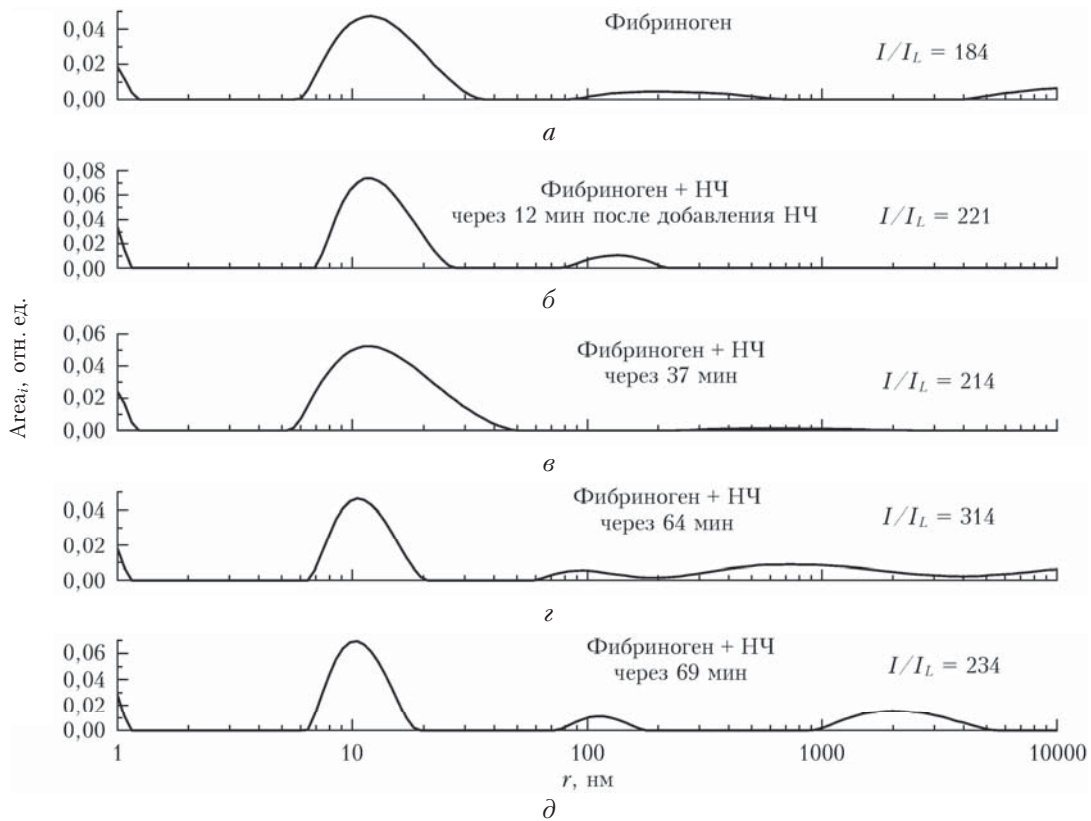


Рис. 3. Динамика распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц в модельном растворе фибриногена с добавлением наночастиц оксида железа (время хранения наночастиц 5 дней): чистый фибриноген (а), раствор через 12 (б), 37 (в), 64 (г) и 69 мин (д) после добавления наночастиц

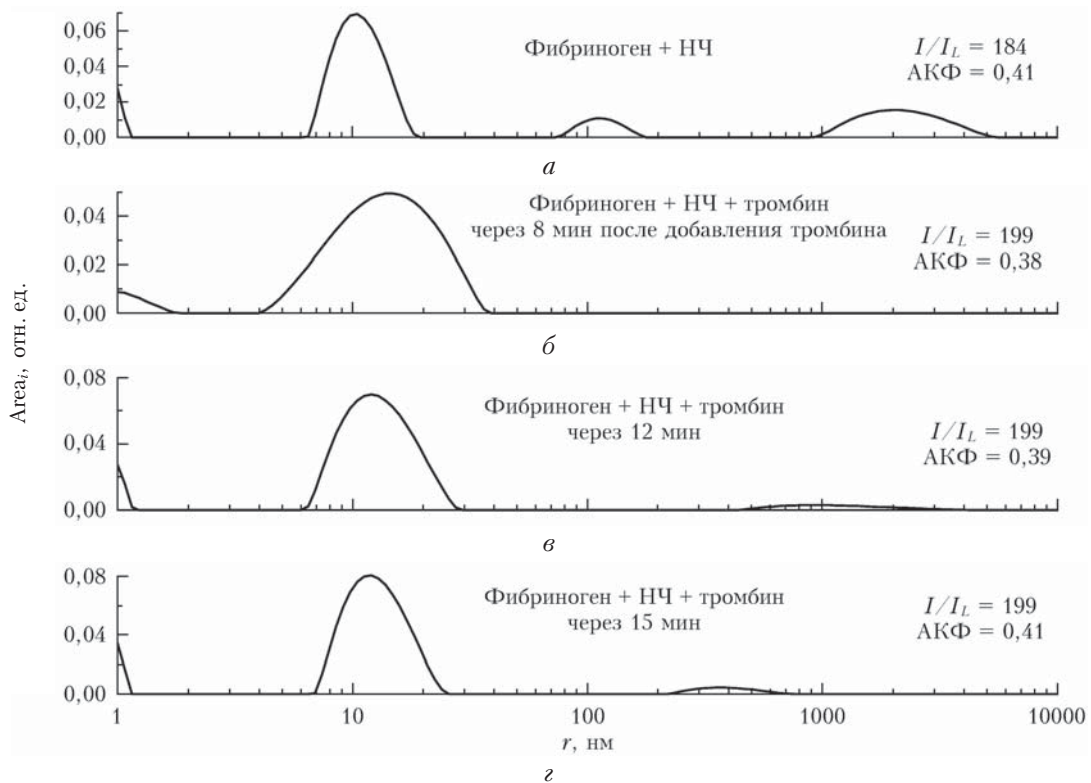


Рис. 4. Динамика распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц в модельном растворе фибриногена с наночастицами оксида железа (а); в растворе через 8 (б), 12 (в) и 15 мин (д) после добавления фермента – тромбина

тромбин. Динамика распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц после добавления тромбина показана на рис. 4: не наблюдается ни характерного для процесса гелеобразования перераспределения интенсивностей по размерам частиц, ни увеличения полной интенсивности светорассеяния, ни уменьшения амплитуды автокорреляционной функции (АКФ) (данные [10]). Из рис. 4 следует, что присутствующие в растворе наночастицы оксида железа мешают взаимодействию фибриногена с тромбином и процессу гелеобразования. Интересно, что этот эффект имеет место вне зависимости от времени хранения наночастиц до их добавления к раствору фибриногена. Можно предположить, что наночастицы выступают в роли ингибиторов ферментативного процесса.

Заключение

С помощью методов динамического светорассеяния показано, что в зависимости от времени, прошедшего с момента получения наночастиц оксида железа в акустоплазменном разряде с кавитацией до добавления их к модельному раствору фибриногена, взаимодействие наночастиц с белками проявляется по-разному. Так, в случае введения в модельный белковый раствор свежесинтезированных наночастиц оксида железа (время хранения которых составляло меньше суток), наблюдается существенное изменение распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц в модельном белковом растворе, которое на следующий день практически возвращается к исходному. Использование наночастиц, время хранения которых превышает двое суток, не приводит к изменению распределения интенсивности по размерам фибриногена. Интересно, что как в первом, так и во втором случае дальнейшее добавление тромбина к раствору фибриногена наночастицы не запускает реакцию образования фибринового геля, которая без участия наночастиц проходила за 1,5 ч. Похожее явление наблюдали авторы [11]. Они показали, что кластеры золотых наночастиц с защитным поверхностным монослоем угнетают активность α -химотрипсина — протеолитического фермента сока поджелудочной железы. Согласно представленным данным по круговому дихроизму белков, в результате взаимодействия химотрипсина с кластерами наночастиц происходит денатурация фермента, что приводит к угнетению его активности. В то же время представленные в работе данные по динамическому рассеянию света показывают, что взаимодействие этих наночастиц с химотрипсином не приводит к образованию крупных агрегатов, следовательно, агрегация не является фактором, приводящим к инактивации фермента. В нашем эксперименте, особенно при использовании наночастиц оксида железа, хранившихся более двух суток, образования агрегатов также не происходит, но нарушается структура фибриногена в области сайтов связывания их с тромбином. Выяснение механизмов взаимодействия наночастиц, полученных

в акустоплазменном разряде с кавитацией, с белками плазмы крови является предметом дальнейших исследований.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации № МД-3964.2018.8.

1. *Ilinskaya A., Dobrovolskaia M.* Nanoparticles and the blood coagulation system. Part I: Benefits of nanotechnology // *Nanomedicine*. 2013. V. 8, N 5. P. 773–784.
2. *Ilinskaya A., Dobrovolskaia M.* Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: Safety concerns // *Nanomedicine*. 2013. V. 8, N 6. P. 969–981.
3. *Bychkova A.V., Sorokina O.N., Kovarskii A.L., Leonova V.B., Rozenfel'd M.A.* Interaction between blood plasma proteins and magnetite nanoparticles // *Colloid J.* 2010. V. 72, N 5. P. 696–702.
4. *Zhang H., Wu P., Zhu Z., Wang Y.* Interaction of γ -Fe₂O₃ nanoparticles with fibrinogen // *Spectrochim. Acta A.* 2015. N 151. P. 40–47.
5. *Canoa P., Simon-Vazquez R., Popplewell J., Gonzalez-Fernandez A.* A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance // *Biosens. Bioelectron.* 2015. N 74. P. 376–383.
6. *Бульчев Н.А., Казарян М.А., Чайков Л.Л., Бурханов И.С., Красовский В.И.* Наноразмерные частицы оксидов металлов, полученные в плазменном разряде в жидкой фазе под действием ультразвуковой кавитации 1. Метод получения частиц. // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. 2014. Т. 41, № 9. С. 33–39; *Bulychev N.A., Kazaryan M.A., Chaikov L.L., Burkhanov I.S., Krasovskii V.I.* Nanoscale metal oxide particles produced in the plasma discharge in the liquid phase upon exposure to ultrasonic cavitation. 1. Method for producing particles // *Bull. Lebedev Phys. Inst.* 2014. V. 41, N 9. P. 264–268.
7. *Бурханов И.С., Чайков Л.Л., Бульчев Н.А., Казарян М.А., Красовский В.И.* Наноразмерные частицы оксидов металлов, полученные в плазменном разряде в жидкой фазе под действием ультразвуковой кавитации 2. Размеры и устойчивость. Исследование методом ДРС // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. 2014. Т. 41, № 10. С. 39–49; *Burkhanov I.S., Chaikov L.L., Bulychev N.A., Kazaryan M.A., Krasovskii V.I.* Nanoscale metal oxide particles produced in the plasma discharge in the liquid phase upon exposure to ultrasonic cavitation. 2. Sizes and stability. Dynamic light scattering study // *Bull. Lebedev Phys. Inst.* 2014. V. 41, N 10. P. 297–304.
8. *Бульчев Н.А., Казарян М.А., Гриднева Е.С., Муравьев Э.Н., Солинов В.Ф., Кошелев К.К., Кошелева О.К., Сачков В.И., Чен С.Г.* Плазменный разряд с объемным свечением в жидкой фазе под действием ультразвука // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. 2012. Т. 39, № 7. С. 39–49; *Bulychev N.A., Kazaryan M.A., Gridneva E.S., Murav'ev E.N., Solinov V.F., Koshelev K.K., Kosheleva O.K., Sachkov V.I., Chen S.G.* Plasma discharge with bulk glow in the liquid phase exposed to ultrasound // *Bull. Lebedev Phys. Inst.* 2012. V. 39, N 7. P. 214–220.
9. *Коваленко К.В., Кривохижа С.В., Масалов А.В., Чайков Л.Л.* Измерение размеров частиц методом корреляционной спектроскопии с помощью световодного шнура // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. 2009. № 4. С. 3–17; *Kovalenko K.V., Krivokhizha S.V., Masalov A.V., Chaikov L.L.* Correlation spectroscopy mea-

surements of particle size using an optical fiber probe // Bull. Lebedev Phys. Inst. 2009. V. 36, N 4. P. 95–103.

10. *Kirichenko M.N., Krivokhiza S.V., Chaikov L.L., Bulychev N.N.* The influence of the sequence of nanoparticles injection to solution on the rate of fibrinogen-

thrombin reaction // J. Phys.: Conf. Ser. 2017. V. 784, N 1. P. 012025–012031.

11. *Fischer N.O., McIntosh C.M., Simard J.M., Rotello V.M.* Inhibition of chymotrypsin through surface binding using nanoparticle-based receptors // Proc. Natl. Acad. Sci. of the USA. 2002. V. 99, N 8. P. 5018–5023.

M.N. Kirichenko, L.L. Chaikov, S.V. Krivokhiza, N.A. Bulychev, M.A. Kazaryan, A.R. Zaritsky.
Study of iron oxide nanoparticles interaction with blood plasma fibrinogen by dynamic light scattering.

The interaction of iron oxide nanoparticles obtained in acoustoplasma discharge with cavitation with blood plasma fibrinogen is studied in a model solution by dynamic light scattering. Depending on the storage time of the nanoparticles, their interaction with the protein shows different dynamics of the size distribution. However, the biological action of the nanoparticles is the same action regardless of the storage time—they act as inhibitors of the fibrin gel formation reaction.