

УДК 577.15

УПРАВЛЕНИЕ БИОКАТАЛИЗОМ ПАРЫ α -ХИМОТРИПСИН – ИНГИБИТОР БАУМАНА–БИРКА, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ГИБРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ МАГNETИТ-ЗОЛОТО, С ПОМОЩЬЮ НЕГРЕЮЩЕГО НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

М.М. Веселов^{1*}, Н.И. Коломоец¹, А.Р. Блинова¹, М.В. Ефремова^{1,2}, Ю. Чудосай¹,
А.Н. Прусов³, А.О. Жигачев⁴, Ю.И. Головин^{1,4}, Н.Л. Клячко^{1,4*}

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; ² Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва; ³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова; ⁴ Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина; *e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru; veselov.mac@gmail.com)

Гибридные магнитные наночастицы магнетит-золото типа гантель были использованы для иммобилизации двух белков: α -химотрипсина и ингибитора Баумана–Бирка. Показано, что под влиянием низкочастотного магнитного поля (50 Гц) активность химотрипсина, связанного в комплекс с ингибитором, резко снижается в зависимости от индукции магнитного поля. Нами высказано предположение, что этот эффект связан с агрегацией магнитных наночастиц под действием магнитного поля.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, иммобилизация ферментов, низкочастотное магнитное поле, агрегация наночастиц, управление биокатализом.

Используемые сокращения: МНЧ – магнитные наночастицы, ПМП – переменное магнитное поле, НЧ – низкочастотное, N-DOPA – нитро-дофамин, EDC – N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид, S-NHS – 4-сульфо-N-гидроксисукцинимид; СТ – α -химотрипсин; ВБИ – ингибитор Баумана–Бирка, NSAAP-FPNA – N-сукцинил-аланил-аланил-пролил-фенилаланил-паранитроанилид, PDAM – пиринилдиазометан, PEG – полиэтиленгликоль, NTA – анализ траектории наночастиц, TEM – просвечивающая электронная микроскопия.

Магнитные наночастицы крайне интересны в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Они обладают большой удельной поверхностью, легко осуществляют массоперенос субстрата к поверхности (что свойственно большинству наноразмерных носителей для иммобилизации ферментов), а кроме того, реагируют на внешнее магнитное поле. Благодаря перечисленным свойствам их можно использовать для выделения ферментов из культуральной среды [1], создания биосенсоров [2] и управления процессами биокатализа [3–5]. Магнитные наночастицы трансформируют энергию внешнего переменного магнитного поля в физические или химические изменения, которые происходят в биомолекулярных структурах, взаимодействующих с ними. Эти изменения могут быть активированы магнитной гипертермией [3, 6], колебательно-вращательными движениями МНЧ [7–9], а также процессами их агрегации-

деагрегации [4, 10]. Магнитная гипертермия, основанная на трансформации энергии высокочастотного магнитного поля ($f = 200\text{--}600$ кГц) в тепловую энергию вследствие релаксации магнитных моментов МНЧ в ПМП, обычно приводит к частичной или полной инактивации ферментов ввиду их крайне низкой температурной стабильности. С помощью магнито-наномеханического подхода, основанного на приведении МНЧ в колебательно-вращательное движение под действием ПМП, удалось увеличить активность химотрипсина, связанного в комплекс с ингибитором трипсина [11]. Однако в качестве примеров управления биокаталитическими процессами в присутствии МНЧ наиболее интересны работы, в которых магнитное поле приводит к агрегации или деагрегации МНЧ, в результате чего происходит увеличение скорости ферментативной реакции. Так, в [4] было показано, что стимулируемая магнитным полем агрегация

двух популяций МНЧ, на поверхности одной из которых был иммобилизован фермент, а на поверхности другой – субстрат, приводит к их колокализации и активации ферментативной реакции. В работе [10] продемонстрировано, что во вращающемся магнитном поле активность липазы, иммобилизованной на агрегатах МНЧ, увеличивается в зависимости от его частоты. Авторы [10] связывают данный эффект с дезагрегацией наночастиц, в результате чего активный центр фермента становится более доступным для субстрата. Однако не следует исключать и того, что в результате вращения наночастиц увеличивается частота столкновений фермента с субстратом.

В настоящей работе представлена биокаталитическая система, управляемая с помощью низкочастотного ПМП ($f < 1$ кГц). Мы синтезировали два типа гибридных наночастиц магнетит-золото типа гантель с иммобилизованным α -химотрипсином или ингибитором Баумана-Бирка на их поверхности.

Цель работы – изучение влияния НЧ ПМП на эффективность работы фермента в составе комплекса с ингибитором в наночастицах.

Экспериментальная часть

Материалы

В работе использовали следующие реагенты: пентакарбонил железа ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), олеиламин, октадецен-1, олеиновую кислоту, золотохлорводородную кислоту трехводную ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 1,2-гексадекандиол, липоевую кислоту, 4-N-DOPA, EDC, S-NHS, α -химотрипсин из поджелудочной железы быка, BBI, NSAAPFrNA, лимонную кислоту, цитрат натрия, трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS), тетрагидрат тартрата калия-натрия ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), реагент Фолина-Чокальтеу (2 М раствор), PDAM – все производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Применяли также метокси-полиэтиленгликоль-сукцинимид с молекулярной массой 5 кДа («Nanocs», США). Соляную кислоту (HCl) «ос.ч.» («Сигма Тек», Россия). Гидроксид натрия (NaOH) «х.ч.» (Россия), ацетонитрил «ос.ч.» («Химмед», Россия), 1,4-диоксан («Химмед», Россия). Для всех экспериментов использовали деионизованную воду (18.2 М Ω /см Werner EASYpure II).

Методы

Синтез гибридных МНЧ магнетит-золото.

В трехгорлой колбе объемом 250 мл, снабженной обратным холодильником и термометром,

смешивали 20 мл октадецена, 2 мл олеиламина, 1,9 мл олеиновой кислоты и 2,384 г гексадекандиола. Смесь нагревали до 120 °С и выдерживали при этой температуре 30 мин в токе аргона. Затем добавляли 0,3 мл $\text{Fe}(\text{CO})_5$, перемешивали 3 мин и добавляли смесь, содержащую 40 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 5 мл октадецена и 0,5 мл олеиламина. Затем реакционную смесь нагревали до 300 °С и выдерживали при этой температуре 45 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры и перемешивали на воздухе в течение 1 ч. Для очистки синтезированных гибридных МНЧ в колбу добавляли 50 мл изопропилового спирта и центрифугировали 10 мин при 4300 г три раза. Гибридные МНЧ ресуспендировали в гексане.

Функционализация золотой поверхности гибридных МНЧ. Для функционализации поверхности МНЧ был выбран тиолсодержащий лиганд – липоевая кислота. Для этого к суспензии гибридных МНЧ в гексане добавляли раствор липоевой кислоты в *изо*-пропанол (1 мг/мл). Смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре, после чего декантировали с помощью магнита. Осадок дважды промывали гексаном, удаляли растворитель и высушивали в токе аргона.

Получение водорастворимых гибридных МНЧ. Для получения водорастворимых гибридных МНЧ их было необходимо модифицировать гидрофильным полимером. Для этого на первом этапе синтезировали конъюгат N-DOPA-PEG: 33 мг mPEG-NHS, 1,65 мг N-DOPA и 13 мг K_2CO_3 растворили в смеси 2 мл хлороформа и 1 мл дихлорметана. Смесь перемешивали 2 ч, после чего добавляли к сухим функционализированным гибридным МНЧ. Смесь перемешивали 12 ч, после чего проводили трехкратный диализ относительно воды в диализных мешках Spectra/Por с порами 12–14 кДа.

Определение количества карбоксильных групп на поверхности гибридных МНЧ. Для определения числа карбоксильных групп на поверхности гибридных МНЧ использовали флуоресцентный агент PDAM. Эксперимент проводили следующим образом (рис. 1): суспензию гибридных МНЧ смешивали с PDAM, растворенном в смеси воды и диоксана (1:1). Для очистки от непрореагировавшего PDAM через 90 мин МНЧ осаждали с помощью магнита. Затем к ресуспендированному конъюгату МНЧ-PDAM добавляли раствор цианида калия (для того, чтобы растворить золото) и снова осаждали МНЧ с

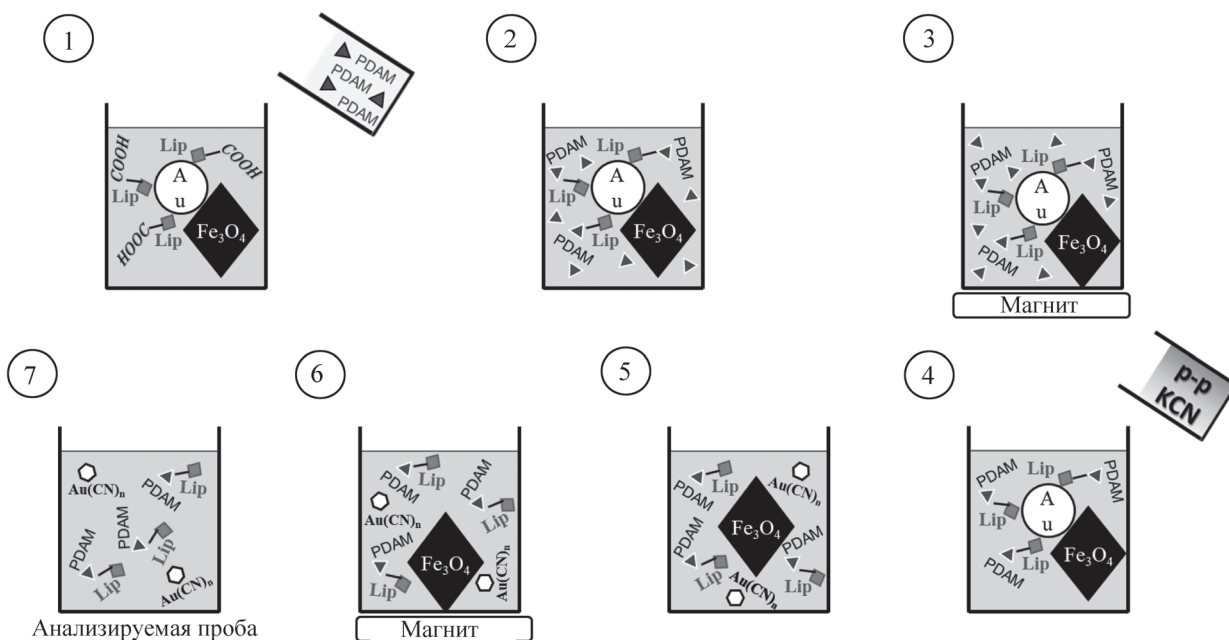


Рис. 1. Схема определения карбоксильных групп на поверхности гибридных МНЧ

помощью магнита. После этого измеряли интенсивность флуоресценции оставшегося в растворе пиренилметилового эфира липоевой кислоты ($\lambda_{\text{возб.}} = 340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм.}} = 395 \text{ нм}$). Концентрацию карбоксильных групп определяли по градуировочной кривой стандартных образцов липоевой кислоты в концентрации 0,1–1,0 мкМ.

Иммобилизация СТ и ВВИ на поверхности МНЧ. Для иммобилизации белков на поверхности МНЧ использовали карбодиимидный метод. Для этого функционализированные наночастицы смешивали с цитратным буфером (20 мМ, рН 4,5), добавляли EDC, S-NHS и белок (количество добавляемых веществ приведено в таблице). Смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Очистку от «непришитого» фермента и низкомолекулярных соединений проводили трехкратной магнитной декантацией. Полученные наночастицы растворяли в цитратном буфере. В результате были синтезированы образцы наночастиц МНЧ-СТ и МНЧ-ВВИ с иммобилизованными на их поверхности СТ и ВВИ соответственно.

Определение концентрации иммобилизованных белков. Концентрацию иммобилизованных на поверхности гибридных МНЧ белков определяли с помощью метода Лоури. Для этого к 1 мл реактива Лоури (49 мл 2%-го Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH; 0,5 мл 1%-го водного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,5 мл 2%-го водного раствора $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) добавляли 0,1 мл стандартных растворов или исследуемых образцов. Смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 0,1 мл реактива Фолина–Чокальтеу (1 М). Смесь перемешивали 40 мин при комнатной температуре, после чего переносили в лунки микропланшета и регистрировали оптическую плотность на длине волны 750 нм. Измерения проводили в трех повторах. Концентрацию исследуемых образцов определяли по калибровочной кривой стандартных образцов

Влияние НЧ ПМП на кинетику ферментативной реакции иммобилизованного СТ. За ферментативной активностью иммобилизо-

Условия иммобилизации СТ и ВВИ на поверхности гибридных МНЧ

Образец	МНЧ, мл	Цитратный буфер, мл	EDC, мг	S-NHS, мг	СТ, мг	ВВИ, мкг
МНЧ-СТ	1,0	1,50	0,250	0,250	0,5	–
МНЧ-ВВИ	0,3	0,45	0,125	0,125	–	43

ванного СТ следили спектрофотометрически, изучая реакцию ферментативного гидролиза субстрата NSAAPFPNA по образованию окрашенного продукта (*para*-нитроанилина) на длине волны 405 нм. Для этого в кювету на 0,5 мл добавляли буферный раствор TRIS-HCl (20 мМ, pH 8,2) и суспензии МНЧ-СТ и МНЧ-ВВИ. Смесь инкубировали 5 мин до полного связывания фермента с ингибитором. Реакцию запускали добавлением раствора субстрата в смеси ацетонитрила и диоксиана (1:1). Конечная концентрация субстрата в кювете составляла 80 мкМ. Кювету помещали в генератор «НЧ ПМП AstraM-Sp» (ООО «Нанодиагностика», Тамбов, Россия), снабженный спектрофотометром «AvaSpec 2048» («Avantes», Нидерланды), что позволило регистрировать кинетические кривые реакции *in situ* при периодическом включении и выключении магнитного поля. Регулируемый по частоте и величине индуктивности генератор ПМП позволял создавать в термостатируемом рабочем объеме поле частотой от 20 до 400 Гц с индукцией от 5 до 300 мТл.

Характеризация образцов. Образцы функционализированных МНЧ и образцов с иммобилизованными белками были охарактеризованы методами NTA и TEM. Анализ NTA проводили на приборе «NanoSight NS500» («Malvern», Великобритания), оснащенный лазером с длиной волны 532 нм и мощностью 80 мВт. Образцы для NTA растворяли в деионизованной воде, предварительно профильтрованной через фильтр 0,22 мкм. Распределение МНЧ по размерам определяли по пяти видео длительностью 90 с, TEM проводили на приборе «JEM-2010» («JEOL», Япония) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Образцы для TEM были приготовлены высушиванием капли образца на медной сетке (200 mesh). Средний диаметр МНЧ определяли по фотографиям TEM, анализируя не менее 300 частиц с помощью прибора «ImageJ software» («National Institutes of Health», США).

Результаты и их обсуждение

Гибридные МНЧ (ГМНЧ) типа гантель синтезированы методом высокотемпературного разложения $\text{Fe}(\text{CO})_5$ на поверхности наночастиц золота в высококипящих растворителях с последующим охлаждением и окислением на воздухе согласно нашей методике [12]. При этом наночастицы золота, используемые в качестве зародышей, получены *in situ* в процессе синтеза.

Размер и морфология гибридных МНЧ охарактеризованы методом TEM. На рис. 2, А

показано, что синтезированные МНЧ имеют гибридное строение. Они представляют собой сросшиеся частицы магнетита октаэдрической формы с наибольшим размером 25 ± 2 нм и сферические частицы золота диаметром 9 ± 1 нм. При этом на каждое зерно магнетита приходится лишь один зародыш золота. Такое соотношение достигается в результате того, что предварительно синтезированные наночастицы золота выступают в качестве зародышей для роста кристаллов железа на их гранях.

Модификация поверхности ГМНЧ. На первом этапе работы было необходимо модифицировать поверхность МНЧ в целях придания им водорастворимых свойств и введения функциональных групп для последующей иммобилизации белков. Для этого поверхность золота сначала была функционализована липоевой кислотой. Связывание липоевой кислоты с золотом происходит за счет образования крайне прочной связи S–Au (энергия связи ~ 40 кДж/моль). Кроме того, липоевая кислота содержит в своем составе карбоксильную группу, с помощью которой в дальнейшем можно легко иммобилизовать белки. Чтобы перевести функционализированные МНЧ из органической фазы в водную, поверхность магнетита модифицировали конъюгатом N-DOPA-PEG. Связывание происходит за счет замещения гидроксильных групп на поверхности магнетита гидроксильными группами дофамина. ГМНЧ приобретают водорастворимые свойства благодаря наличию PEG на их поверхности.

Анализ синтезированных водных суспензий ГМНЧ методом NTA показал (рис. 2, Б), что в водном растворе ГМНЧ имеют средний размер 166 ± 5 нм, а концентрация ГМНЧ составляет $1,7 \cdot 10^{13}$ частиц/мл.

Определение числа карбоксильных групп на поверхности гибридных МНЧ. Химическая иммобилизация белков на поверхности носителя подразумевает образование ковалентной связи между функциональными группами на поверхности носителя и группами на поверхности белка. Таким образом, важной характеристикой носителя служит число функциональных групп. Обычно для определения этого показателя используют флуоресцентные метки, которые селективно связываются с функциональными группами на поверхности носителя. Однако рассеяние света наночастицами может мешать правильному определению интенсивности флуоресценции. В связи с этим нами был разработан

модифицированный метод определения карбоксильных групп на поверхности ГМНЧ с помощью флуоресцентной метки PDAM [13]. Он заключается в связывании метки с карбоксильными группами липоевой кислоты на поверхности МНЧ, после чего кристаллы золота переводятся в раствор в присутствии цианид-иона. В результате получается раствор, содержащий конъюгат липоевой кислоты с PDAM и не содержащий наночастицы. Далее мы измеряли флуоресценцию PDAM и определяли число карбоксильных групп по калибровочной кривой. В этих целях использовали PDAM, не модифицированный липоевой кислотой, поскольку образование конъюгата PDAM с липоевой кислотой не приводит к изменению его флуоресценции. Калибровочная кривая имела линейный вид в диапазоне от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ М. Измеренная концентрация карбоксильных групп составила $8,8 \cdot 10^{-5} \pm 0,9$ М.

Проведенная нами теоретическая оценка полученного результата показала следующее. На одну гибридную МНЧ приходится 3200 ± 300 молекул липоевой кислоты. Если принять золотую часть гибридной МНЧ за сферу с диаметром 9 нм, площадь ее поверхности составит 243 нм^2 . Возможны два предельных случая покрытия золотой наночастицы липоевой кислотой, когда одна молекула связана двумя или одним атомом серы. Таким образом, число молекул липоевой кислоты, приходящихся на одну наночастицу, лежит в диапазоне 2000–8000 при условии покрытия поверхности золотой наночастицы монослоем липоевой кислоты. Оцененное нами количество липоевой кислоты на поверхности ГМНЧ укладывается в данный диапазон.

Иммобилизация СТ и ВВ1 на поверхности гибридных МНЧ. Для иммобилизации белков на поверхности МНЧ был выбран карбодимидный

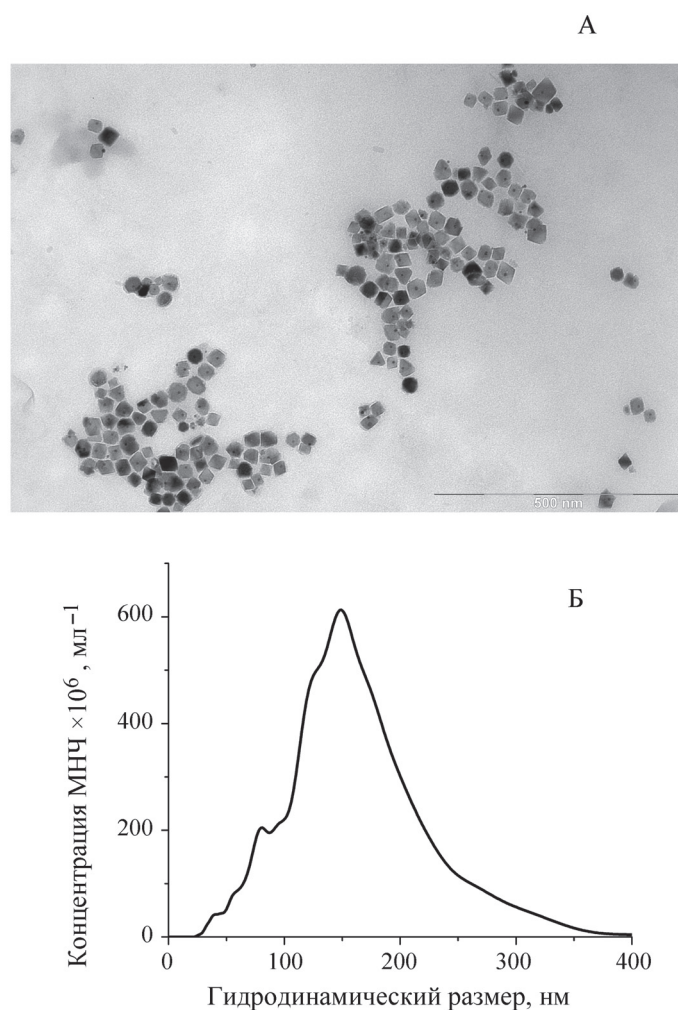


Рис. 2. Микрофотография ТЭМ (А) и анализ распределения по размерам методом NTA (Б) гибридных МНЧ

метод. Карбоксильные группы липоевой кислоты на поверхности ГМНЧ образуют амидную связь с аминокруппами лизинов на поверхности белков (рис. 3). Гидродинамический размер синтезированных наноконъюгатов определяли методом НТА. Из рис. 4, А видно, что в результате иммобилизации размер наночастиц с иммобилизованным белком не меняется, а концентрация частиц уменьшается. Это связано с тем, что в ходе очистки далеко не все ГМНЧ осаждаются магнитом. На микрофотографиях ТЕМ (рис. 4, Б, В) видно, что частицы собраны в агрегаты. Однако это не может свидетельствовать об агрегации образцов, так как при высыхании на медной сетке для микроскопии МНЧ свойственна агрегация.

Мы определили количество иммобилизованных на поверхности МНЧ белков с помощью метода Лоури, где аналитическим сигналом служит светопоглощение на длине волны 750 нм, а в этой области спектра наночастицы меньше всего рассеивают свет. Концентрация иммобили-

зованного СТ составила 102 мкг/мл, а ВВ1 – 25 мкг/мл. Мы исследовали количество белков, оставшихся в надосадочной жидкости после очистки на стадии иммобилизации. Суммарная масса иммобилизованных и неиммобилизованных белков была равна их массе, взятой для иммобилизации.

Влияние НЧ ПМП на кинетику ферментативной реакции иммобилизованного СТ. За активностью иммобилизованного СТ следили, изучая реакцию ферментативного гидролиза субстрата NSAAPFNA, по образованию окрашенного продукта *para*-нитроанилина. На первом этапе мы подобрали оптимальное соотношение ингибитора по отношению к ферменту, для того чтобы остаточная активность СТ составила 10%. На рис. 5, А видно, что при увеличении соотношения СИ/СЕ наблюдается резкое снижение активности фермента и при соотношении 1/6 она достигает 10% от активности фермента без ингибитора. Таким образом, для дальнейшего

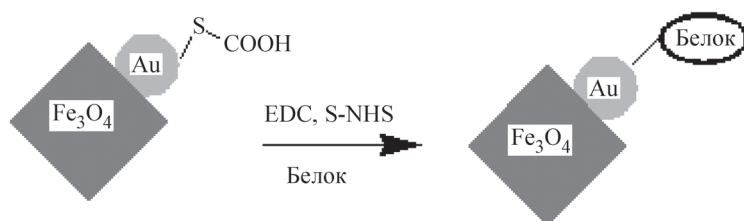


Рис. 3. Схема иммобилизации СТ и ВВ1 на поверхности ГМНЧ

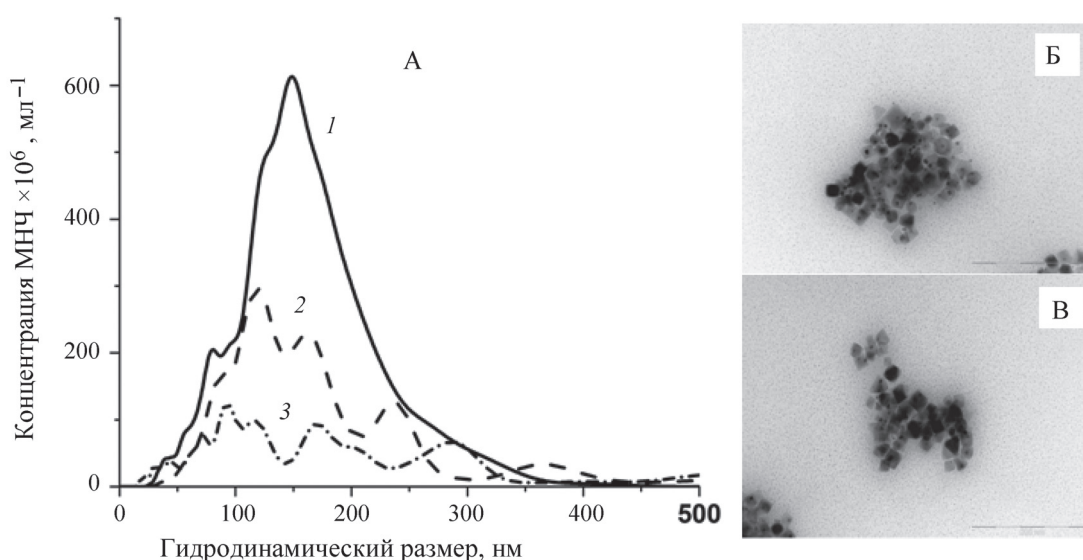


Рис. 4. Характеризация препаратов иммобилизованных ферментов. Гидродинамический размер МНЧ (1), МНЧ-СТ (2) и МНЧ-ВВ1 (3), исследованный методом НТА (А). Микрофотографии ПЭМ МНЧ-СТ (Б) и МНЧ-ВВ1 (В)

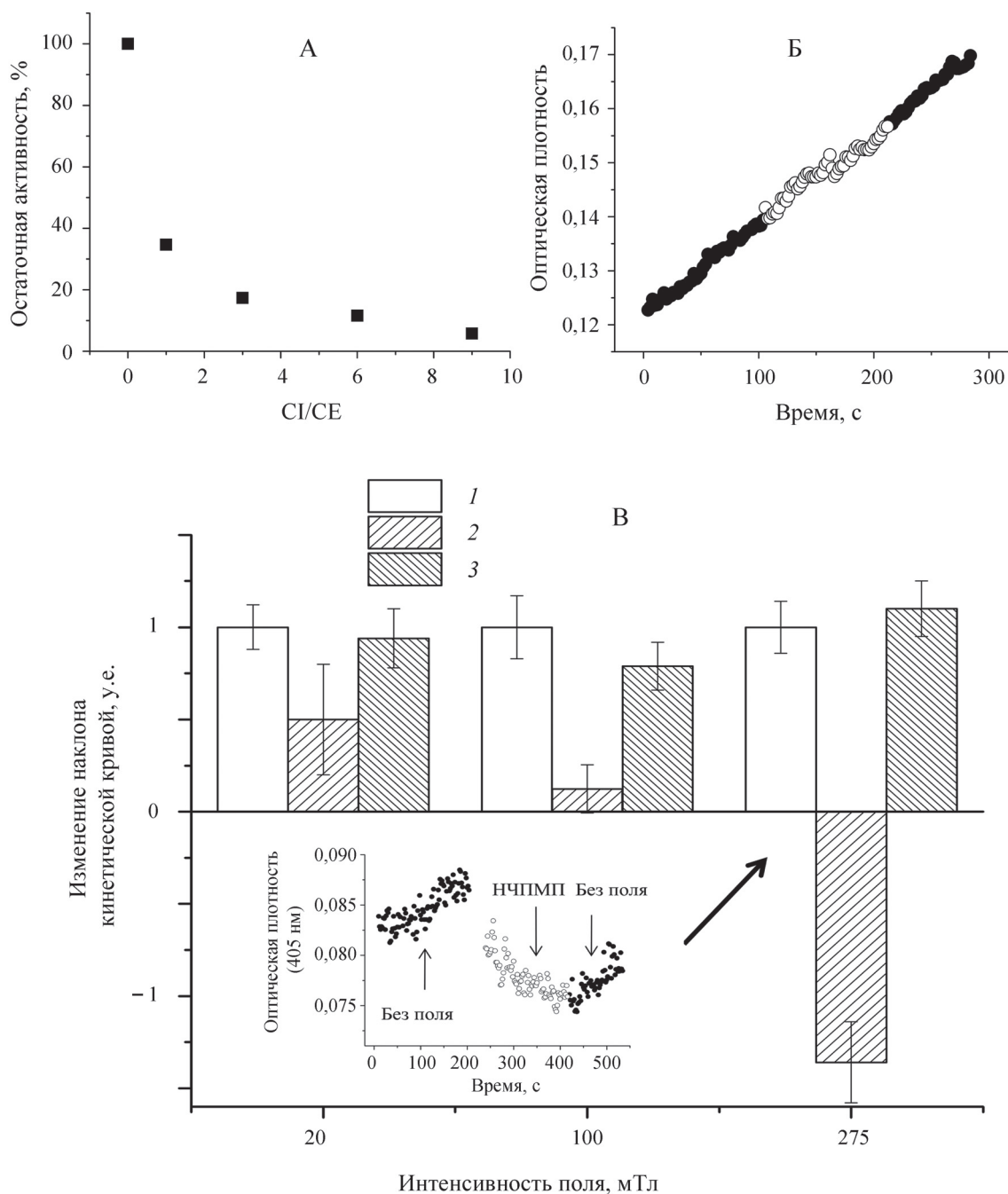


Рис. 5. Кинетика ферментативной реакции гидролиза NSAAPFPNA под действием НЧ ПМП частотой 50 Гц. А – зависимость остаточной активности МНЧ-СТ от соотношения МНЧ-ВВІ/МНЧ-СТ (CI/CE). Б – кинетическая кривая реакции с МНЧ-СТ. В – изменение наклона кинетической кривой при воздействии НЧ ПМП: 1 – до включения, 2 – во время действия, 3 – по окончании действия ($f = 50$ Гц; $B = 20$ мТл, $B = 100$ мТл, $B = 275$ мТл) при CI/CE = 6. Буфер TRIS–HCl (20 мМ; pH 8,2; 25 °C). На кинетических кривых закрашенные кружки соответствуют моментам без действия поля, пустые кружки соответствуют моментам, когда поле включено

эксперимента нами было выбрано соотношение CI/CE, равное 6.

В работе изучено влияние НЧ ПМП ($f = 50$ Гц, $B = 20–275$ мТл) на активность иммобилизован-

ного СТ. Так, активность МНЧ–СТ в отсутствие ингибитора не изменялась в результате воздействия поля (рис. 5, Б). Вместе с тем активность пары МНЧ-СТ – МНЧ-ВВІ резко снижается под

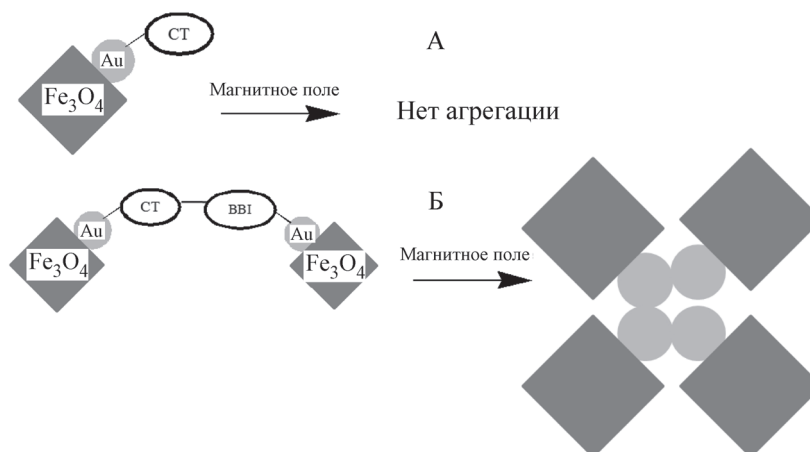


Рис. 6. Схематическое представление влияния НЧ ПМП на МНЧ-СТ (А) и комплекс МНЧ-СТ – МНЧ-ВВИ (Б)

действием НЧ ПМП (рис. 5, В). Степень этого влияния зависит от индукции ПМП. Так, при низкой интенсивности поля, равной 20 мТл, сразу после включения поля уменьшается в два раза тангенс угла наклона на кинетической кривой. При интенсивности поля, равной 100 мТл, тангенс угла наклона становится практически равным нулю, что означает полную остановку ферментативной реакции. При самой высокой интенсивности поля, равной 275 мТл, наблюдается резкое снижение оптической плотности. Этот процесс обратим, и при выключении НЧ ПМП наблюдается мгновенное восстановление тангенса угла наклона до исходных значений. Рассмотренный эффект можно объяснить следующим образом. В результате взаимодействия МНЧ-СТ и МНЧ-ВВИ образуется фермент-ингибиторная пара. В суспензии образуются димерные наночастицы (рис. 6). В магнитном поле МНЧ склонны к агрегации в результате действия магнитостатических сил, величина которых тем больше, чем больше магнитный момент частицы. При образовании димерного комплекса МНЧ-СТ – МНЧ-ВВИ его суммарный магнитный момент возрастает, а следовательно, увеличивается и склонность к агрегации в магнитном

поле. Сила магнитного воздействия также зависит от интенсивности поля и возрастает при его увеличении. При отключении магнитного поля сила магнитного воздействия исчезает и происходит дезагрегация наночастиц.

Заключение

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность управления биокатализом за счет агрегации-деагрегации магнитно-золотых наночастиц типа гантель, содержащих фермент и его ингибитор, под действием низкочастотного магнитного поля, что перспективно для использования в разных областях, например в биомедицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-54-33027, № 18-29-09154 и № 18-33-01232 мол_a), Госрегистрационной темы АААА-А16-116052010081-5, Договора с ООО «Наноматериалы», а также с использованием оборудования, закупленного по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова ПНР 5-13.

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Safarik I., Safarikova M. // BioMagnetic Research and Technology. 2004. Vol. 2. P. 1.
2. Katz E., Willner I. // Angew. Chem. Int. Ed. 2004. Vol. 43. N 45. P. 6042.
3. Armenia I., Valeria GrazúBonavia M., de Matteis L., et. al. // J. Colloid Interface Sci. 2018. Vol. 573. P. 615.
4. Zakharchenko A., Guz N., Laradji A. M., et. al. // Nature Catalysis. 2017. 1. N 1. P. 73.
5. Klyachko N. L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N., et. al. // Angew. Chem. Intern. Ed. 2012. Vol. 51. N 48. P. 12016.
6. Seino S., Yoshida K., Watanabe K. // J. Magn. Soc. Jpn. 2014 Vol. 38. P. 98.
7. Golovin Yu.I., Gribanovsky S.L., Golovin D.Y., Klyachko N.L., Majouga A.G., Master A.M., Sokolsky M., Kabanov A.V. // J. Control. Release. 2015. Vol. 219. P. 43.
8. Golovin Yu.I., Klyachko N.L., Majouga A.G., Sokolsky M.,

- Kabanov A.V.* // J. Nanopart. Res. 2017. Vol. 19. P. 63.
9. *Le-Deygen I.M., Vlasova K.Yu., Kutsenok E.O., et.al.* // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2019. Vol. 21. P. 102065.
10. *Mizuki T., Sawai M., Nagaoka Y., et. al.* // PLoS ONE. 2013 Vol. 8. N 6. P. 66528.
11. *Efremova, M. V., Veselov, M. M., Barulin, A. V., et. al.* // ACS Nano. 2018. Vol. 12. N 4. 3. P. 190.
12. *Efremova, M.V., Naumenko, V.A., Spasova, M., et. al.* // Sci. Reports. 2018. Vol. 8. P. 11295.
13. *Nimura N., Kinoshita T., Yoshida T., et. al.* // Anal. Chem. 1988. Vol. 60. P. 2067.

Поступила в редакцию 10.01.2020
Получена после доработки 12.01.2020
Принята к публикации 20.01.2020

BIOCATALYSIS OF α -CHYMOTRYPSIN – BOWMAN–BIRK INHIBITOR PAIR IMMOBILIZED ONTO HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES MANAGEMENT UNDER EXPOSURE OF LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD

M.M. Veselov^{1*}, N.I. Kolomoec¹, A.R. Blinova¹, M.V. Efremova^{1,2}, Yu.V. Chudosay¹,
A.N. Prusov³, A.O. Zhigachev⁴, Y.I. Golovin^{1,4}, N.L. Klyachko^{1,4*}

(¹Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; ²National Research Technical University MISIS, Moscow; ³A.N.Belozersky Research Institute of Physical Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; ⁴G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov; *e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru; veselov.mac@gmail.com)

Dumbbell-like hybrid magnetite-gold magnetic nanoparticles was used to immobilize two proteins: α -chymotrypsin and Bowman–Birk inhibitor. It was shown that under exposure of low-frequency 50 Hz magnetic field the activity of chymotrypsin bounded to inhibitor dramatically decrease depending on magnetic field strength. This effect is supposed to be the consequence of aggregation of magnetic nanoparticles under magnetic field action.

Key words: magnetic nanoparticles, enzyme immobilization, low-frequency magnetic field, nanoparticles aggregation, biocatalysis regulation.

Сведения об авторах: *Веселов Максим Михайлович* – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (veselov.mac@gmail.com); *Коломоец Никита Иванович* – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (xfait1234567890@gmail.com); *Блинова Анастасия Романовна* – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (lady.buka-zluka2016@yandex.ru); *Ефремова Мария Владимировна* – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (efremova33@mail.ru); *Чудосай Юлия Викторовна* – студентка факультета наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова (chudosay@gmail.com); *Прусов Андрей Николаевич* – ст. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (prusov@genebee.msu.ru); *Жигачев Александр Олегович* – аспирант ТГУ (sashazhig@gmail.com); *Головин Юрий Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, директор Центра нанотехнологий и наноматериалов ТГУ, докт. физ-матем. наук (yugolovin@yandex.ru); *Клячко Наталья Львовна* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (klyachko@enzyme.chem.msu.ru).