

DOI: <u>https://doi.org/10.30898/1684-1719.2023.12.5</u> УДК: 577.352.26

# НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТА УВЕЛИЧИВАЮТ ПРОВОДИМОСТЬ АЗОЛЕКТИНОВОГО БИСЛОЯ В НЕОДНОРОДНОМ МАГНИТНОМ ПОЛЕ

А. А. Аносов, Е. Д. Борисова, И. В. Таранов, И. В. Григорян, В. А. Черепенин, Г.Б. Хомутов

Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН 125009 Москва, ул. Моховая, 11/7

Статья поступила в редакцию 28 ноября 2023 г.

магнитофекции Аннотация. В методе магнитные поля И магнитные наночастицы используются для повышения эффективности доставки генов в клетки. Магнитофекция усиливает внедрение в клетки генных векторов, с которыми связаны магнитные наночастицы, за счет действия магнитного поля, которое удерживает наночастицы в области их применения. При этом считается, что само магнитное поле не меняет механизм поглощения (эндоцитоза) наночастиц. Как полезный эффект магнитофекции – доставка вектора в клетку, так и ее побочный эффект - цитотоксичность связаны с взаимодействием частиц с клеточными мембранами и, в частности, с липидными бислоями. В нашей работе исследовано влияние приложенного стационарного неоднородного магнитного поля и сферических суперпарамагнитных наночастиц магнетита диаметром около 4 нм на проводимость азолектиновых бислойных липидных мембран. Мембраны формировали в стационарном магнитном поле с магнитной индукцией до 26 мТл. Магнитное поле никак не влияло на проводимость мембраны. После контроля мембранной проводимости в окружающий мембрану раствор добавляли магнитные наночастицы. Добавка проводилась с одной стороны мембраны таким образом, чтобы магнитное поле притягивало наночастицы к поверхности мембраны. После добавления наночастиц в магнитном поле проводимость мембран увеличивалась на один-два порядка. Этот эффект проявлялся для всех мембран. Плавное увеличение проводимости сопровождалось в ряде случаев (для 25 % мембран) появлением скачков тока, что можно связать с образованием сквозных проводящих пор радиусом около 0.5 нм. Проводимость увеличивалась с увеличением градиента магнитного поля.

Ключевые слова: магнитофекция, наночастицы магнетита, стационарное магнитное поле, проводимость мембран.

Финансирование: работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда No 23-12-00125, https://rscf.ru/project/23-12-00125.

Автор для переписки: Таранов Игорь Владимирович, i.v.t@bk.ru

#### Введение

При магнитофекции магнитные поля и магнитные наночастицы (МНЧ) используются для повышения эффективности доставки генов в клетки. Магнитофекция усиливает внедрение генных векторов в клетки за счет связывания этих векторов с МНЧ и использования магнитных полей, способствующих накоплению и удержанию МНЧ в области их применения [1, 2]. Считается, что при этом используются естественные механизмы поглощения (эндоцитоз) без значительного разрушения клеточной мембраны, что приводит к высокой жизнеспособности клеток после трансфекции. Последние достижения и проблемы, связанные с использованием магнитных наночастиц для доставки лекарств и магнитофекции, описаны в обзорах [3-6]. Токсичность наночастиц часто связана с разрушением ими структуры биомембран. Проникновение наночастиц в клетки, а также нежелательное повреждение клеток зависят от многих взаимосвязанных факторов, таких как заряд, форма, размер или состав поверхности МНЧ.

Проницаемость бислойных липидных мембран и оболочек полиэлектролитных микрокапсул может изменяться в зависимости от величины рН окружающей среды [7, 8], а также под действием оптического излучения [9], переменного магнитного поля [10] и микроволнового излучения [11-13].

#### <u>ЖУРНАЛ РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ, ISSN 1684-1719, №12, 2023</u>

В работе [14] было показано, что само магнитное поле не меняет механизм поглощения (эндоцитоза) магнитных наночастиц. Как полезный эффект магнитофекции - доставка вектора в клетку, так и ее побочный эффект - цитотоксичность связаны с взаимодействием частиц с клеточными мембранами и, в частности, с липидными бислоями. В работе [15] было показано, что магнитные наночастицы в отсутствие внешнего магнитного поля вызывают увеличение проводимости бислойных липидных мембран и появление дискретных скачков тока, что может быть связано с формированием пор в мембранах. Однако этот процесс носил стохастический характер, и в одних и тех же условиях проводимость увеличивалась только у ~50% мембран.

В данной работе изучено влияние внешнего статического неоднородного магнитного поля на изменение электрических характеристик азолектиновых липидных бислойных мембран (БЛМ) при одностороннем добавлении коллоидных наночастиц магнетита. Было обнаружено, что в магнитном поле добавление МНЧ значительно увеличивает проводимость мембраны. Этот эффект зависит от величины магнитного поля, ионной силы раствора и, повидимому, обусловлен магнитоиндуцированной локализацией МНЧ на поверхности мембраны.

# 1. Материалы и методы

Использовался стандартный цилиндрический магнит диаметром 1 см. Зависимости индукции магнитного поля (измеренной магнитометром pce-mfm 3000, Манчестер, Великобритания) и ее градиента от расстояния между магнитом и мембраной представлены на рис. 1. Магнит располагался на разных расстояниях от мембраны: 14 мм, магнитная индукция  $26 \pm 1.5$  мТл, модуль градиента магнитной индукции  $3.5 \pm 0.2$  мТл/мм; 20 мм,  $12 \pm 1$  мТл,  $1.2 \pm 0.1$  мТл/мм; 25 мм,  $8 \pm 0.5$  мТл,  $0.8 \pm 0.1$  мТл/мм; 30 мм,  $5 \pm 0.5$  мТл,  $0.5 \pm 0.05$  мТл/мм. Мембрана находилась на оси магнита.



Рис. 1. Магнитная индукция и модуль градиента магнитной индукции вдоль оси магнита.

Азолектин (Avanti Polar Lipids, США) использовали для формирования плоских БЛМ в 5 и 100 мМ растворах КСІ. В раствор добавляли 5 мМ Трис-HCl буфера при pH = 7. Мембраны формировали на круглом отверстии площадью 0.5 мм2 в вертикальной стенке тефлоновой кюветы по методике [16] при комнатной температуре  $22 \pm 1$  °C. Мембранный раствор содержал азолектин в х. ч. декане в концентрации 25 мг/мл [17, 18].

Приготовленную водную суспензию коллоидных магнитных наночастиц оксида железа подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин. Электрофоретическая подвижность синтезированных наночастиц магнетита, измеренная при pH = 7 в буферном растворе Трис, соответствовала значению электростатического поверхностного  $\zeta$ -потенциала +25 ± 2 мВ. Типичный средний размер синтезированных наночастиц составлял 4 ± 1 нм (по данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), см. рис. 2). Коллоидные наночастицы магнетита гидрофильны, их изоэлектрическая точка находятся в диапазоне pH от 6.5 до 7.0 [19, 20]. Аминные группы, протонированные и положительно заряженные при нейтральных и кислых значениях pH, могут

#### ЖУРНАЛ РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ, ISSN 1684-1719, №12, 2023

связываться с наночастицами магнетита, что приводит к увеличению их положительного поверхностного потенциала [21]. В наших экспериментах электролит содержал буфер Трис (концентрация 5 мМ), молекулы которого содержат аминогруппы. В результате, по данным электрофоретических измерений, коллоидные наночастицы магнетита в таком буфере имели положительное значение ζ-потенциала около +25 мВ. Измерения электрофоретической подвижности наночастиц магнетита проводили с помощью прибора 90 Plus (Brookhaven Instruments Corporation).



Рис. 2. ПЭМ-микрофотография (а) и гистограмма распределения по размерам (б) синтезированных наночастиц магнетита.

Начальная концентрация суспензии наночастиц составляла 5 мг/мл. 10 мкл суспензии добавляли в 2 мл раствора электролита с одной стороны мембраны.

Ток через мембрану измеряли с помощью Ag-AgCl-электродов, подключенных к усилителю VA-10X (NPI Electronics GmbH, Тамм, Германия) с сопротивлением обратной связи 5 ГОм и временем интегрирования 20 мс. Токи через мембрану оцифровывали с помощью 16-разрядного АЦП (Е14-440, L-Card, Москва, Россия) с частотой дискретизации 1 кГц и подавали на компьютер, где проводили дальнейшую обработку сигнала [22, 23]. Мембранные токи измеряли в режиме фиксации потенциала.

# 2. Результаты

Были измерены токовые треки 12 мембран: шесть мембран при концентрации электролита 5 мМ КСІ и шесть мембран при концентрации 100 мМ KCl. Все мембраны формировались в магнитном поле. В отсутствие МНЧ электрические характеристики мембран не зависели от магнитного поля. После контрольных измерений проводимости мембраны в электролит добавляли Примеры токовых треков, полученных при постоянном наночастицы. напряжении -25 мВ, показаны на рис. 3. Треки показывают изменение мембранного тока после добавки наночастиц в магнитных полях 8 (а), 12 (б) и 26 (в) мТл в 5 мМ КСІ. Разрыв в записи соответствует моменту добавки наночастиц, что приводило к значительным наводкам. Видно, что после добавки отрицательный мембранный ток увеличивался (по абсолютной величине). Проводимость мембран зависела от градиента приложенного магнитного поля. При минимальном магнитном поле 5 мТл с градиентом 0.5 мТл/мм существенного увеличения проводимости не было зафиксировано.



Рис. 3. Токовые треки азолектиновых мембран в различных магнитных полях: 8 (а), 12 (б) и 26 (в) мТл. Наночастицы добавляли в нулевой момент времени.

На рис. 4 представлены зависимости проводимости мембран от магнитной индукции для двух значений ионной силы электролита 5 и 100 мМ КСІ.



Рис. 4. Зависимость проводимости мембран в 5 и 100 мМ КС1 от приложенного магнитного поля. Показаны стандартные ошибки.

Как видно из рис. 4, проводимость мембран в среднем увеличивалась с увеличением внешнего магнитного поля (и его градиента). Следует отметить, что проводимость мембраны зависела от ионной силы: проводимость мембран при 100 мМ больше, чем при 5 мМ в среднем в 14 ± 11 (ste) раз.

На рис. 5 показаны дискретные ступени мембранного тока, когда мембрана находилась в 100 мМ КС1 в магнитном поле 12 мТл. Если предположить, что ступени связаны с открытием/закрытием пор, и принять высоту ступени 5 пА, то простейшая модель (при толщине мембраны 5 нм, проводимости 1,2 См/м для 100 мМ при 22°С) дает оценки радиусов пор 0.5 нм [24, 25], что меньше диаметра наночастиц ~4 нм. Отметим, что ступени тока наблюдались только в 25% исследованных мембран.



Рис. 5. Дискретные колебания мембранного тока после добавления наночастиц. МНЧ добавляли в нулевой момент времени.

### 3. Обсуждение

Локализация положительно заряженных МНЧ на поверхности мембраны зависит как от электростатического взаимодействия МНЧ с кислыми липидами азолектиновой мембраны [26], так и от притяжения МНЧ к мембране внешним магнитным полем. Независимо от характера локализации присутствие частиц на поверхности мембраны приводит к изменению свойств мембраны, в частности к уменьшению параметра порядка и увеличению текучести мембраны [27]. Изменения в структуре мембраны, вызванные магнитными наночастицами, могут приводить к увеличению ее проницаемости за счет образования мембранных пор [15, 28]. Значительный градиент приложенного магнитного поля способствовал увеличению концентрации магнитных наночастиц вблизи мембраны и усиливал эффект электростатического взаимодействия наночастиц с поверхностью мембраны. Как показали результаты, при приближении магнита к мембране проводимость мембран увеличивалась. Из рис. 4 видно, что изменение проводимости под действием приложенного магнитного поля зависит от ионной силы раствора. Если магнитная индукция была менее 5 мТл, то магнитное поле не могло обеспечить достаточную концентрацию тяжелых наночастиц магнетита вблизи поверхности мембраны. При этом проводимость

в обоих растворах практически не менялась (рис. 4). В диапазоне магнитной индукции от 8 до 12 мТл проводимость увеличивалась, а при 23 мТл в 100 мМ КСl проводимость значительно выросла, а в 5 мМ КСl практически не изменилась.

В [22] было показано, что проводимость мембраны увеличивалась с увеличением концентрации добавленных наночастиц феррита кобальта с гидрофильным покрытием в отсутствие магнитного поля и достигала 500 пСм при добавлении в 2 мл раствора 200 мкл наночастиц. При этом наблюдалось возникновение дискретных скачков тока, связанных c появлением метастабильных пор в мембране. Однако эти эффекты наблюдались не для всех мембран, а лишь примерно в 50% случаев. В нашем исследовании в приложенном магнитном поле увеличение проводимости наблюдалось для всех мембран. Магнитное поле 8 мТл вызывало МНЧ-индуцированное увеличение проводимости мембраны до 500 пСм при добавлении всего лишь 10 мкл МНЧ. Эффект от приложения магнитного поля был таким же, как и от увеличения концентрации МНЧ в 20 раз. Магнитные силы значительно увеличивали концентрацию МНЧ на поверхности мембраны.

Таким образом, мы наблюдали значительное увеличение проводимости мембраны при существенно меньшем количестве добавленных коллоидных магнитных наночастиц. Это означает, что наночастицы, перемещенные неоднородным магнитным полем к поверхности мембраны, взаимодействовали с мембраной, что приводило к увеличению проницаемости мембраны, то есть к ослаблению ее барьерной функции. Повышение эффективности трансфекции биологически значимых структур с использованием магнитных наночастиц и магнитного поля обычно связывают с тем, что магнитное поле вызывает их быстрое накопление на поверхности клеток-мишеней, в результате чего с комплексами вступает в контакт большее количество клеток [21]. Увеличение проводимости мембран отражает процессы разупорядочивания мембраны, которые приводят к побочным эффектам магнитофекции. Эти результаты важны для понимания механизмов взаимодействия коллоидных магнитных наночастиц

с биомембранами и использования таких взаимодействий в биомедицинских приложениях. Одним из таких применений является гипертермия для избирательного термического повреждения раковых клеток. Влияние магнитных наночастиц на проводимость и проницаемость мембран таких клеток может помочь повысить эффективность таких терапевтических процедур подавления рака.

## Заключение

Представленные в нашей работе результаты, с одной стороны, могут объяснить возможные побочные эффекты при магнитофекции, а с другой стороны, могут послужить основой для построения новых методов направленного переноса биологически значимых веществ через клеточную мембрану с использованием специально созданных комплексов, содержащих МНЧ, управляемых внешним магнитным полем.

Финансирование: работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда No 23-12-00125, <u>https://rscf.ru/project/23-12-00125/</u>.

## Литература

- K.J. Widder, A.E. Senyei, D.G. Scarpelli, Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158 (1978) 141-146. <u>https://doi.org/10.3181/00379727-158-40158</u>
- N. Laurent, C. Sapet, L. Le Gourrierec, E. Bertosio, O. Zelphati, (2011). Nucleic acid delivery using magnetic nanoparticles: The Magnetofection<sup>™</sup> technology. Therapeutic delivery, 2(4), 471-482. <u>https://doi.org/10.4155/tde.11.12</u>
- M.V. Tuttolomondo, S. Municoy, M. I. A. Echazú1, L.M. López, G. S. Alvarez, (2023). Magnetic Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Magnetofection, Gene Therapy and Vaccines. Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications, 143, 278-313. <u>https://doi.org/10.21741/9781644902332-10</u>

- 4. Plank, C., Zelphati, O., & Mykhaylyk, O. (2011). Magnetically enhanced of acid delivery. Ten nucleic years magnetofection-progress reviews, and prospects. Advanced drug delivery 63(14-15), 1300 -1331.https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.002
- 5. A.A. Sizikov, M.V. Kharlamova, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, and E.L. Kolychev. Nonviral Locally Injected Magnetic Vectors for In Vivo Gene Delivery: A Review of Studies on Magnetofection. Nanomaterials 2021, 11, 1078. <u>https://doi.org/10.3390/nano11051078</u>
- 6. Y.A. Koksharov, G.B. Khomutov, I.V. Taranov, Y.V. Gulyaev, S.P. Gubin Magnetic Nanoparticles in Medicine: Progress, Problems, and Advances. Journal of Communications Technology and Electronics. 2022. Vol. 67, No. 2. P. 101-116. <u>https://doi.org/10.1134/S1064226922020073</u>
- Sukhorukov G.B., Antipov A.A., Voigt A., Donath E., Möhwald H. pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules, Macromolecular Rapid Communications, V. 22, I. 1, P. 44-46, https://doi.org/10.1002/1521-3927(20010101)22:1
- G.B. Khomutov, V.P. Kim, K.V. Potapenkov, A.A. Parshintsev, E.S. Soldatov, N.N. Usmanov, A.M. Saletsky, A.V. Sybachin, A.A. Yaroslavov, V.A. Migulin, I.V. Taranov, V.A. Cherepenin, Y.V. Gulyaev, Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films of pH-sensitive lipid, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, V. 532, 2017, P. 150-154, https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.05.070.
- Radt B., Smith T.A., Caruso F., Optically addressable nanostructured capsules, Advanced Materials. 2004. V.16. №23-24. P. 2184.
- Lu Z., Prouty M.D., Guo Z.et al., Magnetic Switch of Permeability for Polyelectrolyte Microcapsules Embedded with Co@Au Nanoparticles, Langmuir. 2005. V.21. №5. P.2042., <u>https://doi.org/10.1021/la047629q</u>

- D.A. Gorin, D.G. Shchukin, A.I. Mikhailov, K. Kohler, S.A. Sergeev, S.A. Portnov, I.V. Taranov, V.V. Kislov, and G.B. Sukhorukov, Effect of microwave radiation on polymer microcapsules containing inorganic nanoparticles. Tech. Phys. Lett. 32, 70–72 (2006). https://doi.org/10.1134/S1063785006010238
- 12. D.A. Gorin, D.G. Shchukin, Yu.A. Koksharov, S.A. Portnov, K. Köhler, I.V. Taranov, V.V. Kislov, G. B. Khomutov, H. Möhwald, and G. B. Sukhorukov, Effect of microwave irradiation on composite iron oxide nanoparticle/polymer microcapsules, Proc. SPIE 6536, Saratov Fall Meeting 2006: Coherent Optics of Ordered and Random Media VII, 653604 (20 June 2007); https://doi.org/10.1117/12.753423
- Yu.V. Gulyaev, V.A. Cherepenin, V.A. Vdovin, I.V. Taranov, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin, and G.B. Khomutov, Decapsulation of polyelectrolyte nanocomposite microcapsules by pulsed microwave effect. J. Commun. Technol. Electron. 60, 1286–1290 (2015). https://doi.org/10.1134/S1064226915110042
- 14. S. Huth, J. Lausier, S.W. Gersting, C. Rudolph, C. Plank, U. Welsch, J. Rosenecker, Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer, J. Gene Med. 6 (2004) 923–936 <u>https://doi.org/10.1002/jgm.577</u>
- Anosov, A., Koplak, O., Smirnova, E., Borisova, E., Korepanova, E., & Derunets, A. (2022). Effect of Cobalt Ferrite Nanoparticles in a Hydrophilic Shell on the Conductance of Bilayer Lipid Membrane. Membranes, 12(11), 1106. <u>https://doi.org/10.3390/membranes12111106</u>
- Mueller, P.; Rudin, D.; Tien, H.; Wescott, W.C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. Nature, 194, 979–980. <u>https://doi.org/10.1038/194979a0</u>
- Anosov, A. A., Smirnova, E. Y., Korepanova, E. A., & Shogenov, I. M. (2019). The effects of SDS at subsolubilizing concentrations on the planar lipid bilayer permeability: Two kinds of current fluctuations. Chemistry and physics of lipids, 218, 10-15.

- Smirnova, E.Y.; Anosov, A.A. Bilayer Lipid Membrane as Memcapacitance: Capacitance–Voltage Pinched Hysteresis and Negative Insertion Conductance. Membranes 2023, 13, 97. https://doi.org/10.3390/membranes13010097
- A.E. Regazzoni, M.A. Blesa and A.J.G. Maroto, Interfacial properties of zirconium dioxide and magnetite in water, J. Colloid Interface Sci., 1983, 91, 560–570. <u>https://doi.org/10.1016/0021-9797(83)90370-3</u>
- Vidojković, S.M., Rodríguez-Santiago, V., Fedkin, M.V., Wesolowski, D., & Lvov, S.N. (2011). Electrophoretic mobility of magnetite particles in high temperature water. Chemical Engineering Science, 66, 4029-4035. <u>https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.05.021</u>
- Khomutov, G.B., Kim, V.P., Koksharov, Y.A., Potapenkov, K.V., Parshintsev, A.A., Soldatov, E.S., ... & Gulyaev, Y.V. (2017). Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 532, 26-35. <u>https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.035</u>
- Anosov, A.A., Smirnova, E.Y., Ryleeva, E.D., Gligonov, I.A., Korepanova, E.A., & Sharakshane, A.A. (2020). Estimation of the parameters of the Smoluchowski equation describing the occurrence of pores in a bilayer lipid membrane under soft poration. The European Physical Journal E, 43, 1-9.
- Anosov, A.A., Smirnova, E.Y., Korepanova, E.A., Kazamanov, V.A., & Derunets, A.S. (2023). Different effects of two Poloxamers (L61 and F68) on the conductance of bilayer lipid membranes. The European Physical Journal E, 46(3), 14.
- Antonov, V.F., Smirnova, E.Y., Anosov, A.A., Norik, V.P., & Nemchenko, O.Y. (2008). PEG blocking of single pores arising on phase transitions in unmodified lipid bilayers. Biophysics, 53, 390-395.
- 25. Anosov, A.A., Smirnova, E.Y., Sharakshane, A.A., Nikolayeva, E.A., & Zhdankina, Y.S. (2020). Increase in the current variance in bilayer lipid membranes near phase transition as a result of the occurrence of hydrophobic defects. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1862(2), 183147.

- 26. Anosov, A., Borisova, E., Smirnova, E., Korepanova, E., & Osipov, A. (2023). Effect of Cytochrome C on the Conductance of Asolectin Membranes and the Occurrence of Through Pores at Different pHs. Membranes, 13(3), 268.
- Santhosh, P.B., Velikonja, A., Perutkova, Š., Gongadze, E., Kulkarni, M., Genova, J., Eleršič, K., Iglič, A., Kralj-Iglič, V., & Ulrih, N. P. (2014). Influence of nanoparticle-membrane electrostatic interactions on membrane fluidity and bending elasticity. Chemistry and physics of lipids, 178, 52–62. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.009
- Anosov, A., Astanina, P., Proskuryakov, I., Koplak, O., & Morgunov, R. (2022). Surface and Structure of Phosphatidylcholine Membranes Reconstructed with CoFe2O4 Nanoparticles. Langmuir, 38(47), 14517-14526.

# Для цитирования:

Аносов А.А., Борисова Е.Д., Таранов И.В., Григорян И.В., Черепенин В.А., Хомутов Г.Б. Наночастицы магнетита увеличивают проводимость азолектинового бислоя в неоднородном магнитном поле. // Журнал радиоэлектроники. – 2023. – №. 12. <u>https://doi.org/10.30898/1684-1719.2023.12.5</u>