

Л. В. Иванов, член-корреспондент НАН Украины Н. Т. Картель

Оценка микровязкости клеточных мембран различной природы методом спиновых зондов

С использованием метода спиновых зондов проведена оценка микровязкости мембран изолированных клеток и клеток тканей сосудов различной природы. По данным спектров ЭПР определяли время корреляции вращательной диффузии зондов в мембранах, пропорциональное вязкости их липидного слоя. Согласно полученным результатам, доказано, что клеточные мембраны артерии обладают наибольшей вязкостью, а вены — наименьшей; расхождение в показателях их вязкости достигает трехкратного значения. Отмеченный факт, несомненно, играет определяющую роль в механизме токсического действия наночастиц уже на стадии трансмембранной диффузии из крови в прилегающие органы и ткани.

Среди особых свойств наночастиц, в частности углеродных нанотрубок, следует отметить их агрессивный характер к клеткам живых организмов, являющийся следствием способности проникновения через мембраны клеток, а также их ядер и митохондрий [1]. В литературе рассматриваются несколько возможных вариантов такого проникновения во внутриклеточное пространство:

механическое повреждение (прокол) мембраны;

диффузия через липидный бислой цитоплазматической мембраны;

эндоцитоз (захват клеткой и перемещение во внутриклеточное пространство наночастицы, воспринимаемой как родственный объект).

При этом как диффузия, так и эндоцитоз характеризуются достаточно затяжным характером, длительность которого безусловно зависит от микровязкости клеточных мембран. Это означает, что токсичность (цитотоксичность) наночастиц помимо таких факторов, как их концентрация, размеры, наличие примесей, химическое модифицирование поверхности и др., должна определяться также и реологическими свойствами самой мембраны клетки. Так, например, в работе [2] с помощью сканирующей лазерной микроскопии показано, что углеродные нанотрубки способны медленно диффундировать через липиды цитоплазматической мембраны внутрь клетки (трансмембранная диффузия), связываться с внутриклеточными органеллами, взаимодействовать с ядром, ДНК, в результате чего через несколько дней клетка погибает. Логичным было бы предположить, что трансмембранная диффузия нанотрубок внутрь изолированных клеток и клеток тканей сосудов (и, следовательно, их токсичность) зависит от вязкости мембран, определяемой плотностью упаковки липидов в мембране [2].

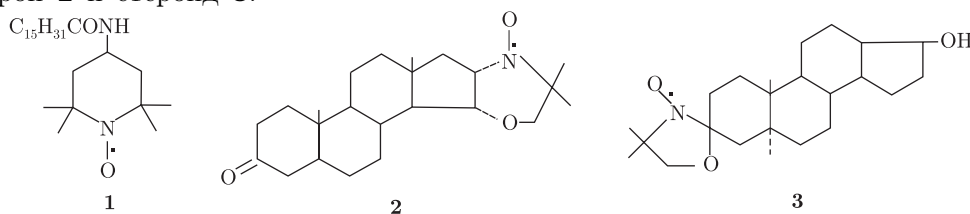
В научных публикациях [1, 3] констатирована способность однослойных углеродных нанотрубок небольшой длины диффундировать из кровотока в большинство внутренних органов, преодолевая мембраны и ткани стенки сосудов. С нашей точки зрения, оценить вероятность такой “транссосудистой” диффузии нанотрубок можно с помощью фактора вязкости (текучести) липидов клеток ткани различных сосудов.

Таким образом, вязкость мембран клеток может являться одним из основных факторов, определяющих как цитотоксичность наночастиц, так и их токсичность для тканей органов.

В работах [4, 5] нами впервые был использован высокочувствительный биофизический метод спиновых зондов для исследования цитотоксичности углеродных нанотрубок. Было показано, что введение этих наночастиц во взвесь эритроцитов приводит со временем к уменьшению количества целых клеток на 25%, а их введение в гомогенат печени крыс — к уменьшению в несколько раз митохондриальной активности ткани печени. Однако более информативным методом следует, с нашей точки зрения, считать введение липофильных спиновых зондов во взвесь клеток или образцы тканей органов. Это открывает возможность по данным спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) судить о вращательной броуновской подвижности липофильных зондов в липидах мембран различных клеток, которая напрямую связана с вязкостью мембран изучаемых клеток [6].

Цель работы — провести сравнительную оценку вязкости мембран ряда изолированных клеток и клеток тканей сосудов с помощью метода спиновых зондов.

Материалы и методы исследований. Для изучения микровязкости (текучести) липидов мембран использовали спин-меченые соединения — амид пальмитиновой кислоты **1**, прогестерон **2** и стероид **3**:



Липофильные спиновые зонды вводили во взвесь клеток или образцы тканей сосудов из их спиртовых растворов таким образом, чтобы конечная концентрация спирта в растворе не превышала 2%.

Липосомы получали путем ультразвуковой обработки на частоте 22 кГц многослойных везикул из фосфатидилхолина с концентрацией 0,05% в 0,1 моль/л буферном (ТРИС) растворе с pH 7,2, согласно методике, описанной в [7]. Эритроциты крови человека получали, согласно методике, описанной в [4]. При исследовании сосудов использовали свежеснятые отрезки длиной 5–7 мм бедренной артерии, вены и аорты крыс, которые хранили в физиологическом растворе Рингера. Отрезки сосудов вводили в стеклянный капилляр для дальнейших измерений в резонаторе радиоспектрометра “BRUKER” (Германия).

Липофильные спиновые зонды вводили в мембраны клеток и тканей сосудов, и по спектрам ЭПР определяли время корреляции τ_c вращательной диффузии зондов в липидах мембран, пропорциональное вязкости липидов мембран клеток [6].

Базовым уравнением для оценки вязкости в мембранах клеток (в любых средах) является уравнение Стокса–Эйнштейна:

$$\tau_c = 4\pi a^3 \eta / 3kT, \quad (1)$$

где η — вязкость среды; a — эффективный радиус спинового зонда; τ_c — время корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (время, за которое зонд оборачивается на угол в 1 рад — 57°). Время корреляции спинового зонда определяется из спектров ЭПР по следующим формулам [6]:

$$\nu_{(+1)} = 1/\tau_{c+1} = 2 \cdot 10^8 / [(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1] H_0, \quad (2)$$

$$\nu_{(-1)} = 1/\tau_{c-1} = 3,6 \cdot 10^9 / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] H_0, \quad (3)$$

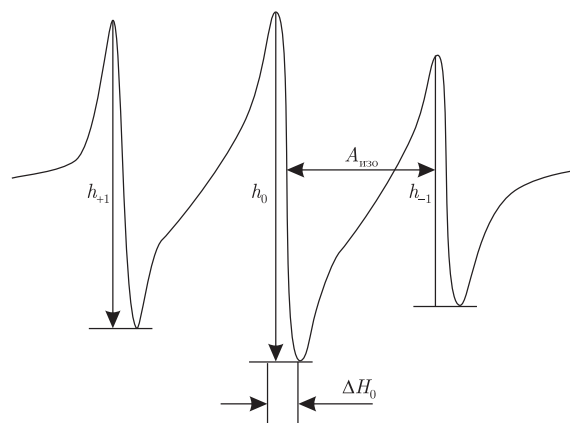


Рис. 1. Спектр ЭПР спинового зонда в водно-глицериновой смеси: H_0 — ширина центральной компоненты, Гс; h_0 , h_{+1} и h_{-1} — интенсивности компонентов спектра ЭПР с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N : 0, +1 и -1; $A_{\text{изо}}$ — изотропная константа сверхтонкой структуры (СТС) [6]

где $\nu = 1/\tau$ — величина, с^{-1} , условно названная “частотой вращения” радикала, пропорциональна текучести среды. На практике для оценки вращательной подвижности спинового зонда в мембране используют параметры h_0/h_{+1} и h_0/h_{-1} спектров ЭПР, которые пропорциональны τ_c [6]. Эти соотношения следуют из рассмотрения модели несферического ротатора, в которой длинные спиновые зонды аппроксимированы эллипсоидом вращения (рис. 1).

Детально разработаны также представления о влиянии анизотропии тензора вращательной диффузии иминоксильных радикалов на параметры их спектров ЭПР. Считается, что радикал вращается подобно волчку с аксиальной симметрией и что вращение радикала осуществляется путем непрерывной диффузии.

Теория спектров ЭПР связывает экспериментальный параметр анизотропии спектров ε с величиной анизотропии вращательной диффузии радикала d_1 , которая равна D_{\perp}/D_{\parallel} . Значение ε вычисляется с помощью формулы

$$\varepsilon = \frac{(h_0/h_{+1})^{1/2} - 1}{(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1}. \quad (4)$$

Параметр ε можно использовать при оценке смены ориентации спин-меченых жирных кислот либо стероидов в липидном слое мембраны при влиянии разных факторов на мембрану.

Результаты и их обсуждение. На рис. 2 представлены спектры ЭПР спин-меченого амида пальмитиновой кислоты — зонда (1) в ткани отрезков сосудов крысы. Введение в раствор с отрезком изучаемых сосудов парамагнитного уширителя-феррицианида калия (0,1 моль/л) показал отсутствие уширения линий ЭПР зонда (1) в липидах мембран клеток сосудов. Это свидетельствует о недоступности спин-меченой пальмитиновой кислоты молекулам внеклеточной воды и о расположении спинового зонда в липидах внутри мембран клеток сосудов [6].

В спектрах ЭПР меченой пальмитиновой кислоты в мембранах ткани изучаемых сосудов отсутствует суперпозиция спектров с медленным и быстрым вращением зонда (спектр ЭПР гомогенный), что говорит об одинаковой вязкости мембран ткани сосудов. В то же время для этого зонда в тканях сосудов наблюдается сильная анизотропия спектров ЭПР. Невысокие значения ε (0,13 для артерии и вены и 0,14 для аорты) обусловлены анизо-

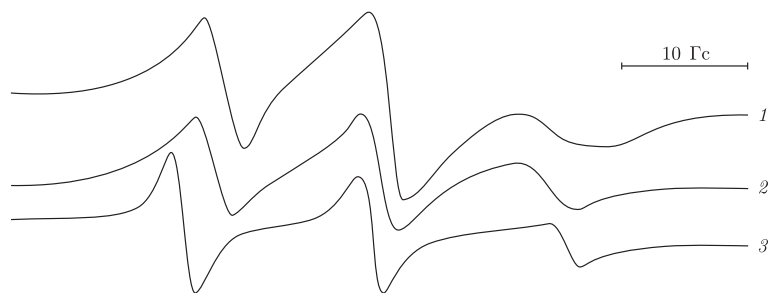


Рис. 2. Спектры ЭПР спин-меченого амида пальмитиновой кислоты в тканях сосудов крысы: 1 — в ткани бедренной артерии; 2 — в ткани аорты; 3 — в ткани бедренной вены

тропией вращательной диффузии длинной меченой жирной кислоты в липидном бислое мембран клеток сосудов. Спин-меченая пальмитиновая кислота в этих условиях совершает конусообразное вращение преимущественно вокруг длинной оси.

На основании данных исследования методом ЭПР липофильного спинового зонда (1) нами впервые для мембран клеток тканей артерии, вены и аорты рассчитаны величины времен корреляции τ_{c-1} (см. табл. 1), которые располагаются в ряду: вена < аорта < артерия.

Можно видеть, что вязкость липидов мембран ткани вен в 3 раза меньше, чем в ткани артерии. И это понятно, исходя из функции этих сосудов в организме — в артерии кровь поступает под сильным давлением сердечного насоса и их ткань должна быть очень прочной и плотной, а в венах идет пассивный отток крови от конечностей и органов без давления.

Возможность преодоления наночастицами, в частности, углеродными нанотрубками стенок артерий и диффузии в прилегающие ткани представляется маловероятной. А для вен вероятность диффузии коротких нанотрубок через стенку сосуда в прилегающие ткани значительно увеличивается.

Чрезвычайно интересным представляется вопрос о величинах вязкости мембран других клеток в шкале “малой” вязкости вен и “высокой” вязкости артерий. Для ответа на этот вопрос мы ввели зонд (1) в липосомы, которые не содержат белков и считаются наиболее лабильными, а также в мембрану эритроцитов — клеток, содержащих наибольшее количество белков (в процентном отношении) и отличающихся очень плотной мембраной. Расчет параметров спектров ЭПР показал, что для зонда в липосомах $\tau_{c-1} = 0,64 \cdot 10^{-9}$ с, а для зонда в мембранах эритроцитов $\tau_{c-1} = 1,01 \cdot 10^{-9}$ с. Полученный результат оказался весьма неожиданным: вязкость мембран клеток ткани вен меньше, чем в липосомах, а вязкость мембран клеток ткани артерий больше, чем в мембране эритроцитов.

Полный ряд возрастания τ_{c-1} (или вязкости) мембран в тканях сосудов и других клетках выглядит следующим образом:

вена < липосома < аорта < эритроцит < артерия.

Таблица 1. Расчетные значения вязкости липидов мембран разной природы

Тип мембраны	$\tau_{c-1}, 10^{-9}$ с	Вязкость, о. е.
Вена	0,53	0,83
Аорта	0,76	1,19
Артерия	1,50	2,34
Липосома	0,64	1*
Эритроцит	1,01	1,58

*Вязкость мембраны липосомы принята за 1.

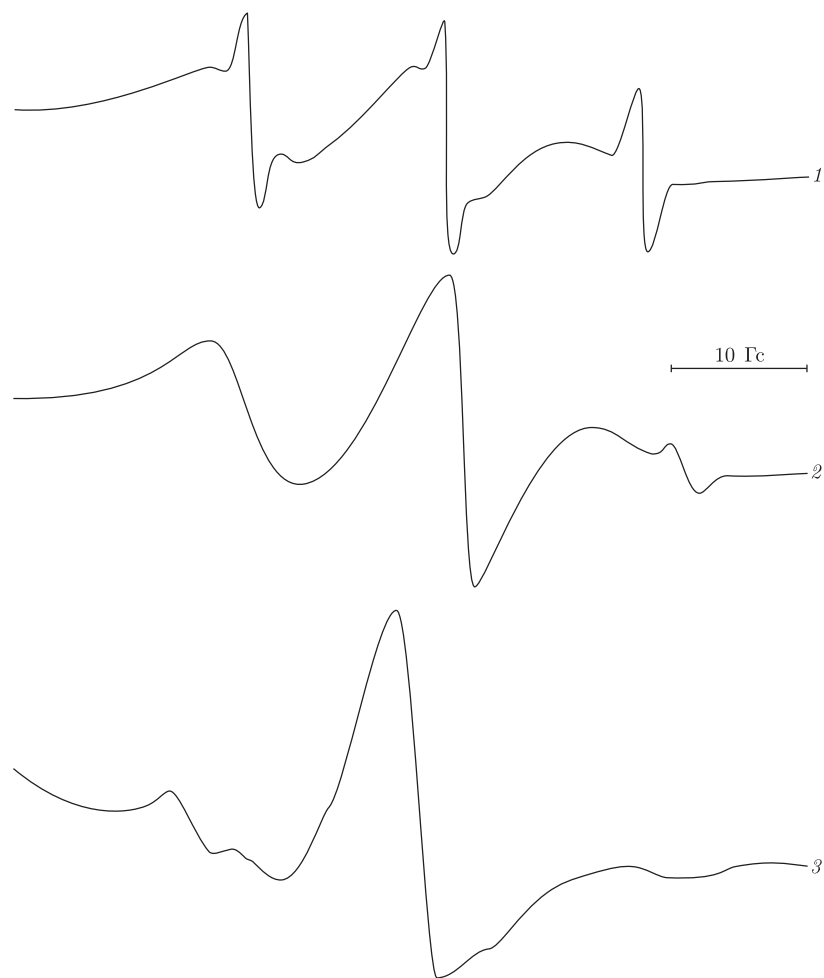


Рис. 3. Спектры ЭПР спин-меченых стероидов: 1 — зонда (2) в суспензии ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) липосом; 2 — зонда (3) в суспензии ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) липосом; 3 — зонда (3) в суспензии ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) эритроцитов

Как видно из табл. 1, микровязкости мембран (а, следовательно, и способность к транс-мембранной диффузии наночастиц) отличаются в несколько раз.

Кроме зонда (3) в мембраны различных клеток вводили и другие липофильные спиновые зонды на основе стероидов (2) и (3). Соответствующие спектры ЭПР представлены на рис. 3. Они демонстрируют значительные различия для разных клеток параметров спектра h_0/h_{-1} и h_0/h_{+1} , пропорциональных τ_{c-1} зондов в липидах мембран и их вязкости.

Заметно отличаются спектры ЭПР для зонда (3) в мембране эритроцитов и в липосомах. Такое различие вполне объяснимо отсутствием в липосомах белков, тогда как в мембране эритроцитов достаточно высокое содержание белка спектрина. Спектр ЭПР спин-меченого стероида (3) в мембране эритроцитов, по сравнению со спектром этого зонда в липосомах, демонстрирует очень широкие линии ЭПР как для низкополевой (h_{+1}), так и высокополевой (h_{-1}) компоненты спектра, а также большую ширину центральной компоненты H_0 (см. рис. 1). Это свидетельствует о сильной заторможенности вращательной подвижности спин-меченого стероида (3) в мембране клеток эритроцитов и, следовательно, о большей вязкости мембран эритроцитов по сравнению с липосомами [8].

Полученные результаты показывают, что вязкости мембран изолированных клеток и клеток тканей органов существенно различаются и что, несомненно, играет определяющую роль в механизме токсического действия наночастиц уже на стадии трансмембранной или трансваскулярной (сосудистой) диффузии из крови в прилегающие органы и ткани.

Таким образом, по данным спектров ЭПР липофильных зондов, находящихся в липидах мембран ряда клеток и клеток тканей сосудов, впервые проведена сравнительная оценка вязкости мембран различной природы. Это позволило расположить изучаемые клетки и клетки ткани сосудов по возрастанию вязкости липидов мембран в следующий ряд: вена < липосома < аорта < эритроцит < артерия. Вязкость мембран клеток ткани вен в 3 раза меньше, чем у артерий, что предполагает более эффективную диффузию наночастиц через вены в прилегающие ткани и проявление токсических эффектов.

Следует подчеркнуть, что вязкости мембран изолированных клеток и клеток тканей различаются в достаточно широком диапазоне. Это может служить причиной избирательной токсичности наночастиц для различных органов тканей, так как природа мембран определяет временной фактор ее преодоления.

1. Lu F., Gu L., Mezzani M. J. et al. Advances in bioapplications of carbon nanotubes // Adv. Mater. Res. – 2009. – **21**, No 2. – P. 139–152.
2. Porter A. E., Gass M., Muller K. et al. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells // Nature Nanotechnol. – 2007. – **2**, No 11. – P. 713–717.
3. Schipper M. L., Nakayama-Ratchford N., Davis C. R. et al. A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice // Ibid. – 2008. – **3**, No 4. – P. 216–221.
4. Картель Н. Т., Грищенко В. И., Черных В. П. и др. Использование метода спиновых зондов для оценки цитотоксичности углеродных нанотрубок // Доп. НАН України. – 2009. – № 8. – С. 127–133.
5. Kartel M. T., Ivanov L. V., Kovalenko S. N., Tereschenko V. P. Carbon nanotubes: biorisks and biodefence // Biodefence: Advanced Materials and Methods for Health Protection (NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology) / Ed. S. Mikhailovsky, A. Khajibaev. – Berlin; New York: Springer Sci. + Business Media (B. V.), 2011. – P. 11–22.
6. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – Москва: Наука, 1974. – 256 с.
7. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. – Москва: Медицина, 1983. – 384 с.
8. Нардід О. А. Відновлення спінового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // Фізика живого. – 2008. – **16**, № 1. – С. 44–49.

*Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 04.11.2011

*Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков*

Л. В. Иванов, член-корреспондент НАН України **М. Т. Картель**

Оцінка мікрів'язкості клітинних мембран різної природи методом спинових зондів

З використанням методу спинових зондів проведено оцінку мікрів'язкості мембран ізольованих клітин і клітин тканин судин різної природи. За даними спектрів ЕПР визначали час кореляції обертової дифузії зондів у мембранах, пропорційний в'язкості їх ліпідного шару. Згідно з отриманими результатами, доведено, що клітинні мембрани артерії мають найбільшу в'язкість, а вени — найменшу, розбіжність у показниках їх в'язкості досягає триразового значення. Встановлений факт, безперечно, відіграє визначальну роль у механізмі токсичної дії наночастинок вже на стадії трансмембранної дифузії з крові в прилеглі органи і тканини.

L. V. Ivanov, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **N. T. Kartel**

Estimation of microviscosity of various cell membranes by the spin probe method

Using the method of spin probes, we have estimated the microviscosity of the membranes of isolated cells and cells of vascular tissues of different nature. By the ESR spectra data, the correlation times of the rotational diffusion of probes in membranes, which are proportional to the viscosity of their lipid layer, are measured. The results show that cell membranes of arteries have the highest viscosity and those of veins – the lowest, the difference in terms of their viscosities reaches 3 times. The marked fact, of course, plays a decisive role in the mechanism of toxic actions of nanoparticles on the stage of the transmembrane diffusion from blood into surrounding tissues and organs.