

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ НАНОБИООБЪЕКТОВ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Л.В. Иванов, Н.Т. Картель

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

С использованием метода спиновых зондов проведена характеристика реологических свойств (текучесть, вязкость) мембран клеток ряда биологических тканей и органов, а также макромолекулы альбумина при взаимодействии с многоатомными спиртами и полиэтиленоксидами. Показано влияние молекулярной массы и концентрации полиэтиленоксидов на текучесть мембран и на микровязкость цитозолей различных клеток (эритроцитов человека, липосом, эпителия кожи и сердечной мышцы крысы). Рассмотрены причины изменения реологических показателей, возникающие при процессах дегидратации клеток.

Введение

Бурное развитие нанотехнологий, отмечаемое в последнее время, связано с разработкой, исследованием свойств и применением различных наноматериалов – объектов, для которых линейный размер хотя бы по одной из координат не превышает 100 нм. Особый интерес представляет разнообразие наноструктурных биоматериалов (белки, ферменты, ДНК, мембраны и внутриклеточные органеллы клеток различных органов и тканей) при создании комбинированных и гибридных продуктов с полимерными матрицами, а также нанопористыми и наноразмерными неорганическими веществами (металлы, оксидные, углеродные и другие материалы), имеющими развитую поверхность. Очевидно, что свойства поверхности биоматериалов, выступающих в качестве компонентов комбинированных и гибридных продуктов, должны существенно отличаться от таковых для нативных биоматериалов.

Первыми в направлении создания комбинированных продуктов явились работы по получению ряда иммобилизованных ферментов – ферментов, молекулы которых связаны с матрицей или носителем (как правило, полимером), при этом полностью или частично сохраняющие свои каталитические свойства. Известны, по крайней мере, три типа подходов, позволяющих связывать ферменты с носителем: адсорбционные методы, методы механического включения (захвата) и методы химического (ковалентного) присоединения [1–3].

В последнее десятилетие возник повышенный интерес к углеродным нанотрубкам (УНТ) как матрицам иммобилизации различных биообъектов. Он связан с выявленной у нанотрубок способностью проникновения сквозь мембраны клеток и открывшейся возможностью целевой доставки белковых молекул, РНК и ДНК, непосредственно внутрь клеток [4, 5]. В других работах однозначно отмечалось промотирующее действие УНТ на пролиферацию клеток костной и нервной тканей. Это открывает дополнительные возможности в области создания искусственных органов и биосовместимого протезирования [6]. Наноконпозиты УНТ с различными ферментами рассматриваются как перспективные биосенсоры, поскольку нанотрубки обладают хорошей электропроводностью. Наноструктуры могут быть весьма эффективны для восстановительной терапии и создания новых антибактериальных покрытий [7–9].

Состояние и свойства поверхности биоматериалов, находящихся в составе наноконпозитов, является предметом первостепенного исследования. В связи с этим

целью настоящей работы явилось изучение структуры и реологических свойств некоторых нанобиобъектов – эпителия кожи крыс, мембран эритроцитов человека, липосомальных мембран из фосфатидилхолина, а также макромолекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) методом спиновых зондов. Предполагалось изучить способность поверхности таких биообъектов взаимодействовать с полимерами, водой и низкомолекулярными веществами, механизм дегидратации ткани кожи и клеток эритроцитов, оценить диффузию низкомолекулярных веществ через некоторые мембраны, конформационную подвижность биоповерхности и роль в этой подвижности молекул воды.

Материалы и методы

Липосомы получали путем ультразвуковой обработки на частоте 22 кГц многослойных везикул из фосфатидилхолина с концентрацией 0,05% в 0,1 М ТРИС-буфере с рН 7,2, согласно методике, описанной в [10].

Эритроциты крови человека получали из эритромаcсы, отмытой от плазмы и стабилизирующего раствора, центрифугированием в физиологическом растворе (рН 7,2) при 3 кратном рабавлении.

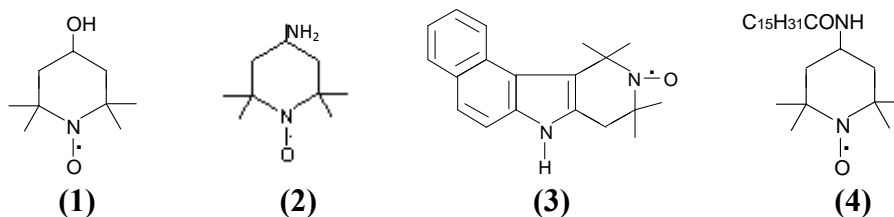
Использовали очищенный от жирных кислот, электрофоретически однородный бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы "Calbiochem" или "Sigma Chem" (США), который по своим свойствам и структуре близок сывороточному альбумину человека (ЧСА).

Для изучения процессов дегидратации кожи использовали образцы кожи крыс в специальном физиологическом растворе.

Для оценки вязкости цитозоля тканей использовали свежeweделенные образцы ткани сердца крысы в физиологическом растворе.

В работе использовали полиэтиленгликоли (ПЭГ) фирмы "Merk" и проксанол, представляющий собой продукт конденсации оксидов этилена и пропилена со средней молекулярной массой ~7000 Да.

Использовали следующие спиновые зонды: водорастворимые стабильные иминоксильные радикалы 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-оксил (**1**) и 2,2,6,6,-тетраметил-4-амино-пиперидин-1-оксил (аминорадикал) (**2**); липофильный спин меченый карболен 3-оксил-2,2,4,4-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин (**3**), липофильный зонд 1-оксил-2,2,6,6,-тетраметилпиперидин-амид пальмитиновой кислоты (**4**). Ниже приведены их структурные формулы [11]:



Введение гидрофобных (липофильных) спиновых зондов (**3**) и (**4**) в суспензию эритроцитов, липосом или раствор БСА осуществляли добавлением водно-спиртовых растворов зондов в концентрации 10^{-5} моль/л – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л к соответствующим суспензиям таким образом, чтобы конечная концентрация этанола в растворах и взвешях составляла не более 0,5–1%. Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре "Bruker" (Германия).

Для оценки вязкости в мембранах клеток используется уравнение Стокса-Энштейна:

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

где η – вязкость среды, a – эффективный радиус спинового зонда, τ_c – время корреляции броуновской вращательной диффузии зонда, определяемое по спектрам ЭПР (время, за которое зонд оборачивается на угол в 1 радиан – 57°). Время корреляции спинового зонда (нитроксильного стабильного радикала) определяется из спектров ЭПР по следующим формулам [11]:

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

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

$\nu = 1/2\pi\tau$ – величина, 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, где h_0 , h_{+1} и h_{-1} – интенсивности компонентов спектра с величиной магнитного квантового числа ядра ^{14}N , соответственно равного 0, +1 и -1, пропорциональные τ_c [11]. Время $\tau_{c(-1)}$ дает информацию о вращательной подвижности иминоксильной «головке» спинового зонда, а $\tau_{c(+1)}$ – информацию о вращательной подвижности «ножки» иминоксильного фрагмента.

В работе по спектрам ЭПР зондов определяли τ_c и в сравнительном анализе судили о микровязкости липидов мембран тех или иных тканей или клеток.

Результаты и их обсуждение

Взаимодействие сывороточного альбумина с полиэтиленгликолями

Сывороточный альбумин является удобным объектом для изучения механизмов взаимодействия с различными веществами, поскольку его структура достаточно хорошо изучена [11, 12]. Известно, что сывороточный альбумин крови является универсальным переносчиком лекарственных и биологически активных веществ в организме человека и животных, так как на поверхности макромолекулы (глобулы) альбумина находятся три гидрофобных «кармана» (полости), выстланных неполярными аминокислотами – триптофаном, тирозином и фенилаланином. В одной из полостей, наибольшей по размеру, могут укладываться стероиды, жирные кислоты и другие вещества приблизительно этих размеров. Это позволяет макромолекуле альбумина образовывать супрамолекулярные комплексы с водонерастворимыми веществами или полимерами, имеющими в молекуле гидрофобные фрагменты, за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий [12].

Наночастицы полимерных материалов обладают рядом преимуществ, определяющих эффективность их применения в технологиях доставки, - биосовместимость, способность к биodeградации, функциональная совместимость. Типичными соединениями, которые представляют основу для создания полимерных наночастиц, являются полимолочная и полигликолевая кислоты, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поликапрактон и др., а также их различные сополимеры (проксанол). ПЭГ часто используют для повышения стабильности различных молекулярных переносчиков. Например, липосомы, покрытые ПЭГ («стелс-липосомы»), по сравнению с обычными менее подвержены биodeградации, в результате чего обладают заметным пролонгированным действием [13].

В работе изучали способность макромолекулы бычьего сывороточного альбумина (БСА) образовывать комплексы с ПЭГ различной молекулярной массы. На рис. 1 представлен спектр ЭПР спинового зонда (3) в растворе БСА, который является суперпозицией широкого сигнала ЭПР, характеризующего очень медленную

вращательную диффузию зонда вместе с макромолекулой альбумина в гидрофобной полости макромолекулы, а также узкий сигнал, характеризующий быстрое вращение части зонда в водном растворе альбумина. Добавление ПЭГ-400 к раствору БСА приводило к увеличению доли узкого сигнала в низкочастотной компоненте триплета h_{+1} в спектре ЭПР и свидетельствовало о связывании молекул ПЭГ с гидрофобной полостью белка с последующим вытеснением части зонда из полости в водный раствор.

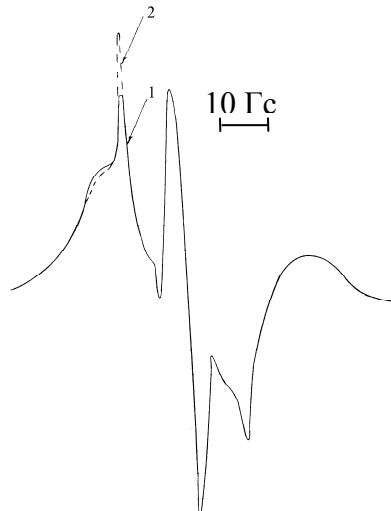


Рис. 1. Спектр ЭПР спинового зонда (3) ($5 \cdot 10^{-5}$ М) в растворе БСА (10^{-4} М): 1 – контроль; 2 – в присутствии ПЭГ-400 (20%).

Такое взаимодействие ПЭГ с гидрофобной полостью БСА можно объяснить наличием в молекулах полиэтиленгликолей $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$ гидрофобных метиленовых групп. Так как гидрофобные полости на поверхности БСА имеют ограниченный размер, мы предположили, что максимальное сродство ПЭГ с макромолекулой БСА будет реализовано при размерах ПЭГ, соответствующих размерам основной гидрофобной полости белка.

На рис. 2 представлены данные по взаимодействию макромолекулы БСА и ПЭГ с молекулярной массой от 200 до 40000 Да. Оказалось, что максимальная интенсивность узкой компоненты линии h_{+1} триплета наблюдается при молекулярной массе ПЭГ в районе 600 Да, что соответствует размерам основной гидрофобной полости макромолекулы БСА [12].

В контексте полученных данных необходимо упомянуть результаты работы [14] по изучению нековалентного комплекса ПЭГ с одностенными углеродными нанотрубками (ОУНТ). После введения такого комплекса мышам внутривенно он обнаруживался внутри макрофагов печени животных, что доказывает, прежде всего, высокую стабильность супрамолекулярных комплексов ПЭГ с объектами, имеющими гидрофобные поверхности. Поверхность макромолекулы альбумина является гетерогенной по полярности и потенциально способна связываться с различными неполярными наночастицами. Таким образом, на примере БСА проиллюстрирована возможность образования «гидрофобных» комплексов (наноконструкций) различных белков с наночастицами, будь то олигомеры невысокой молекулярной массы или углеродные наноматериалы. Важным также является то, что такое взаимодействие эффективно протекает в водных средах, поскольку органы и ткани живых организмов на 80% состоят из воды.

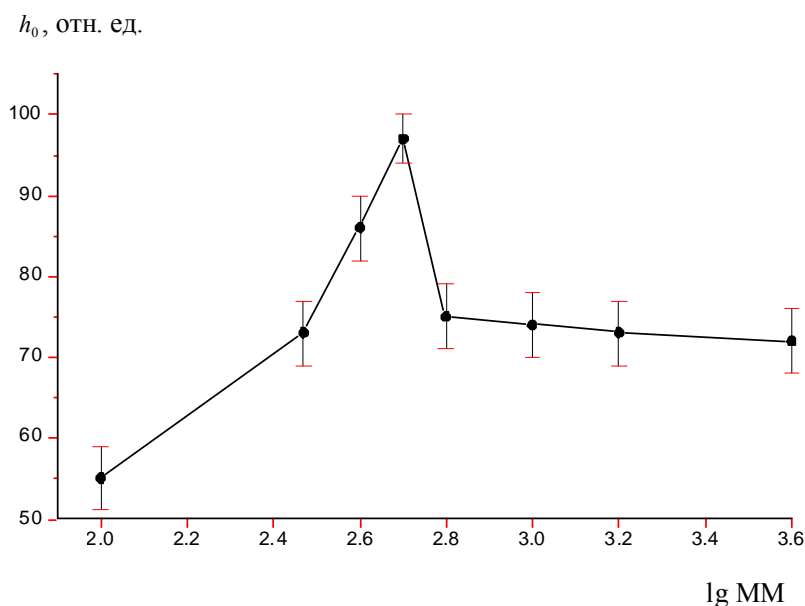


Рис. 2. Зависимость интенсивности h_0 центральной компоненты спектра ЭПР спинового зонда (**3**) ($5 \cdot 10^{-5}$ М) в растворе БСА (10^{-4} М) от молекулярной массы вводимого ПЭГ.

Текущность липидов мембран липосом и эритроцитов

Мембраны клеток тканей и органов состоят из бислоя фосфолипидов и «утопленных» в липидный бислой поверхностных и интегральных белков [12]. Коллоидно-химические свойства мембран в основном зависят от фосфолипидного состава мембраны, а также от количества и свойств разнообразных белков, связанных с ней. Формирование липидного бислоя мембраны проходит таким образом, что полярные «головки» фосфолипидов взаимодействуют с внеклеточной и внутриклеточной водой, а алкильные хвосты бислоя обращены друг к другу по принципу минимизации внутренней энергии. Трансмембранные (интегральные) белки «утоплены» в липидный бислой, вследствие гидрофобного взаимодействия между алкильными хвостами и гидрофобными областями на поверхности этих белков.

Такое строение мембран обеспечивает их непроницаемость для водорастворимых веществ и ионов, а также предохраняет клетку от присутствия нежелательных экзогенных субстратов. В то же время необходимые для функционирования клетки ионы и вещества попадают в цитоплазму с помощью, например, Na^+/K^+ -АТФ-аз, Ca^{2+} -АТФ-аз, водных и кальциевых каналов. На внешней и внутренней поверхности мембраны находятся заряды «головок» фосфолипидов и поверхностных белков, которые создают поверхностный потенциал мембраны. В мембране имеется также связанная (иммобилизованная вода), имеющая очень низкие значения диэлектрической проницаемости ϵ . В результате у поверхности мембраны наблюдается градиент диэлектрической проницаемости. Так, во внеклеточной воде ϵ составляет 80, в связанной воде у внешней поверхности цитоплазматической мембраны снижается до 40; ϵ липидного бислоя равно 9, а цитозоли клетки – 60 [15, 16]. Любое воздействие, приводящее к понижению полярности (понижению ϵ), приводит к разрыхлению и увеличению толщины липидного бислоя мембраны, а также к уменьшению плотности упаковки фосфолипидов в мембране [17].

Очень важной особенностью биологических мембран является высокая степень их трансляционной подвижности и латеральной диффузии, которая изучена с помощью спиновых зондов в мембранах. Одним из вариантов трансляционной подвижности зондов в мембранах является флип-флоп переход, заключающийся в перемещении

радикала из одного монослоя мембраны в другой с одновременным переворачиванием радикала на 180° [18].

Латеральная диффузия фосфолипидов состоит в очень быстром перемещении их молекул по изоэнергетической поверхности липидного бислоя мембран, где они быстро меняются местами с соседними молекулами. Коэффициент диффузии D спин-меченого фосфатидилхолина в мембранах различных клеток колеблется в пределах $2 \cdot 10^{-8} \div 16 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ с энергией активации 3,65 ккал/моль при 20–40 °С. В течение одной секунды, диффундируя с $D = 6 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$, молекула спин-меченого фосфолипида проходит расстояние 5000 нм, т.е. расстояние, равное поперечному сечению небольшой бактериальной клетки [17]. Большая конформационная подвижность фосфолипидов в мембране и очень быстрая латеральная диффузия коренным образом отличает биологические поверхности от поверхностей неорганических материалов.

Липосомы являются модельными клетками, мембрана которых состоит из фосфатидилхолина и не содержит белков [10]. Это отличает свойства мембран липосом от мембран интактных клеток, вязкость и прочность которых существенно выше мембран липосом. Например, выполненные нами по формуле (1) расчеты, основанные на собственных экспериментах [19], показали, что время корреляции $\tau_{c(-)}$ спин-меченой пальмитиновой кислоты (3) в мембране липосом составляет $0,645 \cdot 10^{-9}$ с, а для мембран эритроцитов – $1,01 \cdot 10^{-9}$ с, т.е. вязкость мембран эритроцитов в 1,5 раза выше вязкости липосом. «Повышенная» вязкость мембран эритроцитов объясняется большим количеством белка спектрина, образующего в мембране трехмерную сетку, а также холестерина. Липосомы, тем не менее, широко используются в биотехнологиях, медицине и фармации как системы доставки лекарственных веществ [13, 20].

Для изучения текучести липидов мембран липосом в работе использовали спин-меченую пальмитиновую кислоту (4), которая легко встраивается в мембрану и совершает вращение вокруг длинной оси в липидном бислое [11]. Введение в суспензию липосом феррицианида калия (в качестве «гасителя» парамагнитной метки) свидетельствовало о локализации иминоксильной головки спин-меченой пальмитиновой кислоты в поверхностном липидном слое мембраны. Из спектров ЭПР рассчитывали τ_c вращательной диффузии зонда (4) в мембране липосом и $\nu = 1/\tau_c$ – величину, пропорциональную текучести липидов, названную «частотой вращения» зонда.

На рис. 3 представлены данные о влиянии гидрофильных неводных растворителей на параметр подвижности $\nu_{(-)}$ зонда (4) в мембране липосом, пропорционального текучести. Введение спиртов в суспензию липосом приводило сначала к заметному увеличению текучести липидов (разжижению мембраны), а при концентрациях больше 15% к разрушению мембран липосом. В то же время добавление ПЭГ-1500, ПЭГ-400, глицерина и пропиленгликоля сначала приводило к уменьшению текучести липидов (иммобилизации мембран липосом), а затем при дальнейшем повышении концентрации растворителей – к разрушению мембран липосом.

Можно отметить, что параметр спектров ЭПР $\nu_{(-)}$, который рассчитывается по формуле (3), имеет ошибку в экспериментах не больше 2–3%. Поэтому разница между кривыми на рис. 3 достоверна. Реальные мембраны, содержащие на поверхности различные периферические и интегральные белки, имеют значения текучести гораздо ниже и являются более прочными (текучесть мембран эритроцитов в полтора раза ниже текучести мембран липосом).

Полученные данные показывают, что липидные домены (кластеры) на поверхности нативных мембран являются наиболее уязвимыми участками

биологических поверхностей, хотя через липидный бислой мембран функционирующей клетки осуществляется перенос основного массива экзогенных и эндогенных субстратов, а с помощью латеральной диффузии липидов по поверхности мембран осуществляется быстрый перенос многих веществ из одного района поверхности мембран в другой [17].

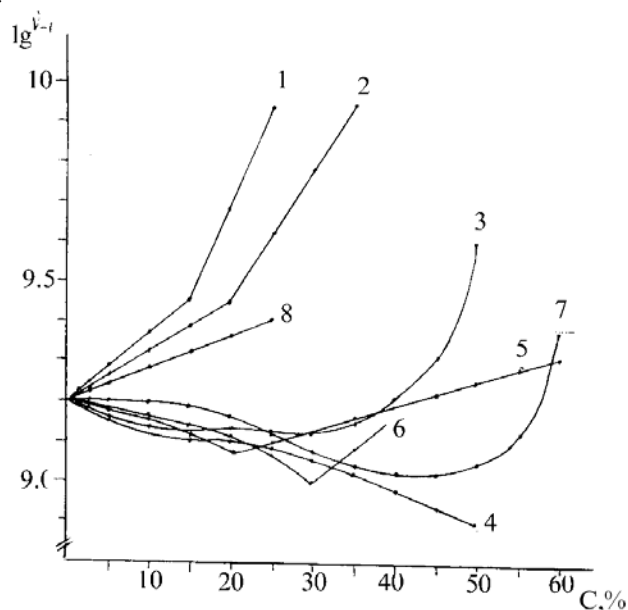


Рис. 3. Зависимость параметра $v_{(-1)}$ спектров ЭПР зонда (3) от концентрации растворителя: 1 – изопропиловый спирт; 2 – этиловый спирт; 3 – пропиленгликоль; 4 – глицерин; 5 – ПЭГ-400; 6 – ПЭГ-1500; 7 – димексид; 8 – проксанол.

Мембраны эритроцитов содержат от 30 до 50% фосфолипидов, из них фосфатидилхолина 23–48%, а нейтральных липидов (холестерин) 24,5–28,9% [17, 20–22].

В табл. 1 представлены данные о влиянии некоторых веществ на текучесть липидов мембран эритроцитов по аналогии с данными, полученными для липосом (см. рис. 3).

Таблица 1. Влияние некоторых растворителей на параметры вращательной подвижности зонда (4) в мембране эритроцитов

Объект, растворители	Параметр $\tau_{c(-1)} \cdot 10^{10} c$	Изменение параметра $\Delta \tau_{c(-1)} \cdot 10^{10} c$
Эритроциты в физ. растворе (контроль)	10,1	
+15% пропиленгликоля	10,8	+0,7
+15% глицерина	11,5	+1,4
+15% ПЭГ-400	12,1	+2,0
+15% ПЭГ-1500	11,1	+1,0
+15% димексида	10,2	+0,1

Характер влияния полимера ПЭГ и других неводных растворителей на текучесть липидов мембран эритроцитов аналогичен характеру влияния этих веществ на текучесть мембран липосом. Эти полимеры при небольших концентрациях снижают текучесть липидного бислоя. Поэтому можно предположить, что нанесение липидных слоев на неорганические подложки должно приводить к иммобилизации биомембран.

Дегидратация клеток органов и тканей

Предложенный ранее Л.В. Ивановым [23] способ количественной оценки вязкости внутриклеточной жидкости изолированных клеток и клеток тканей по спектрам ЭПР спиновых зондов позволяет оценивать наличие во внутриклеточной жидкости (цитозоле) свободной и связанной воды, а также изучать механизмы процессов их дегидратации. Благодаря этому способу появилась также возможность оценивать вязкость цитозоля. В свою очередь, знание микровязкости цитозоля дает возможность оценить реологические свойства тканей, поскольку интегральная вязкость ткани определяется суммой вкладов вязкостей клеточных мембран и цитозоля. Например, цитозоль клеток ткани кожи представляет водный гель полимукосахарида – глюкозаминогликана, который вместе с коллагеном определяет упругость кожи и ее реологические характеристики [24].

На рис. 4 приведены спектры ЭПР зонда (1) в физиологическом растворе и в цитозоле эритроцитов. Видно, что вращательная подвижность зонда в цитозоле заторможена (увеличение параметра ЭПР h_{+1}/h_{-1}), что свидетельствует о повышенной вязкости внутренней эритроцитарной среды по сравнению с водными растворами: для воды $\tau_{c(-1)} = 2 \cdot 10^{-11}$ с, а для цитозоля – $\tau_{c(-1)} = 6 \cdot 10^{-11}$ с. Трехкратное увеличение вязкости в цитозоле можно объяснить присутствием макромолекул гемоглобина и других внутриклеточных структур.

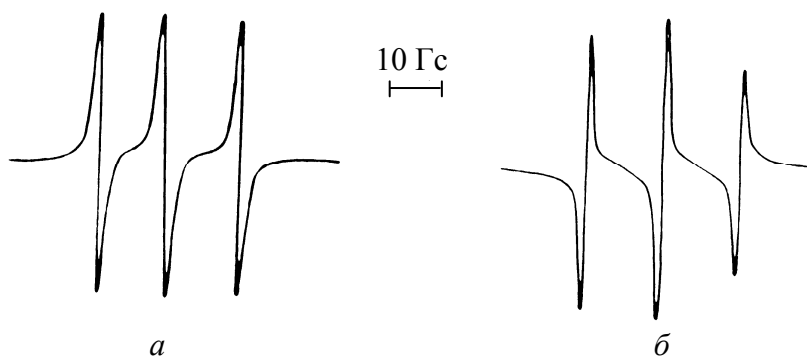


Рис. 4. Спектры ЭПР спинового зонда (1) в воде (а) и цитоплазме эритроцитов (б) при комнатной температуре.

На рис. 5 представлены данные о влиянии ряда осмотически активных неводных растворителей на параметр спектра ЭПР h_0/h_{-1} зонда (1) в цитозоле эритроцитов, пропорционального вязкости среды цитозоля, от времени. Все вещества добавляли по каплям с 30% содержанием в растворителях и в соотношении к эритромассе 1:1. Конечная концентрация гидрофильных растворителей в суспензии эритроцитов составляла 15%. Спектры ЭПР регистрировали сразу после введения растворителей в эритроциты. Такая предосторожность была вызвана тем, что резкое введение осмотически активных растворителей вызывает осмотический шок эритроцитов – разрыв мембран (гемолиз).

Как видно из рис. 5, добавление изучаемых веществ к взвеси эритроцитов приводит к быстрому увеличению вязкости внутриклеточной воды в той или иной степени, что связано с быстрой дегидратацией эритроцитов и уменьшением их объема. Однако через 20–30 мин для низкомолекулярных веществ наблюдается уменьшение вязкости цитозоля. Этот факт можно объяснить, если учесть, что низкомолекулярные растворители способны диффундировать через мембрану внутрь клеток, что приводит к осмотическому набуханию клетки и уменьшению вязкости цитозоля. Затем происходит

выравнивание осмотического давления внутри и снаружи клетки, клетка принимает почти тот же объем, что и до дегидратации. ПЭГ-2000 составляет исключение – его добавление к эритроцитам приводит к дегидратации клетки как в начальный момент, так и в следующие промежутки времени.

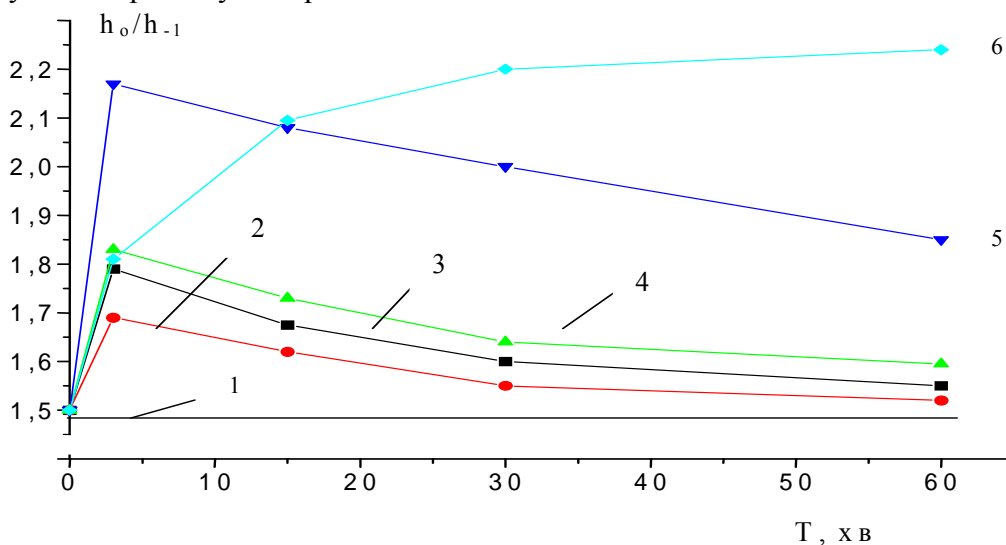


Рис. 5. Влияние осмотически активных растворителей на параметр h_0/h_{-1} спектра ЭПР зонда (1) в цитозоле эритроцитов: 1 – контроль; 2 – пропиленгликоль; 3 – глицерин; 4 – ПЭГ-300; 5 – ПЭГ-600; 6 – ПЭГ-2000.

Из этих экспериментов следует, что предлагаемый метод позволяет следить за кинетикой процесса дегидратации клеток и тканей, а также за возможными процессами набухания клеток или обезвоженных тканей в процессе гидратации. Кроме того полученные результаты дают информацию о способности различных низкомолекулярных веществ диффундировать через мембраны клеток и клеток тканей во времени и позволяют определять время проникновения этих веществ через мембраны. В нашем случае это время составляло до 60 мин, а для ПЭГ-600 – более 1 ч.

По способности дегидратировать клетки эритроцитов изученные растворители можно расположить в ряду:

пропиленгликоль < глицерин < ПЭГ-300 < ПЭГ-600 < ПЭГ-2000.

Эти данные коррелируют со сродством этих растворителей к липидам мембран и свидетельствуют о том, что удаление внутриклеточной воды начинается со связывания осмотически активных веществ с поверхностью мембраны. Из рис. 5 следует также, что по способности диффундировать через мембрану эритроцитов эти вещества располагаются в ряду, обратном дегидратационной способности:

ПЭГ-600 < ПЭГ-300 < глицерин < пропиленгликоль.

Дегидратация клеток может быть необратимой в случае высокомолекулярных веществ и обратимой для веществ с молекулярной массой меньше 1000.

На основе описаного способа изучения вязкости внутриклеточной воды мы разработали способ количественного определения деструкции клеток при различных физико-химических воздействиях [25]. В этом способе (методе) по уменьшению сигнала ЭПР зонда в цитозоле эритроцитов можно определить количество поврежденных клеток вследствие какого-либо воздействия, так как парамагнитная соль, в норме не проникающая через мембрану, диффундирует в цитозоль клетки при нарушении целостности мембраны и дает парамагнитный комплекс со спиновой меткой («подавляет» сигнал ЭПР) в цитозоле. С помощью этого метода мы показали, что добавление во взвесь эритроцитов полимеров ПЭГ-400, ПЭГ-600 и ПЭГ-2000 в

концентрациях выше 20–25% приводит к полному исчезновению сигнала ЭПР, что свидетельствует о разрушении всех клеток эритроцитов вследствие осмотического шока (резкой дегидратации).

Эти эксперименты показывают, что даже достаточно прочные мембраны эритроцитов, которые эволюционно создавались с учетом трения о стенки мелких капилляров, могут быстро разрушаться при определенных не очень жестких условиях – присутствии водорастворимых полимеров типа полиэтиленоксидов. Следовательно, в случае нанесения (иммобилизации) клеток на неорганическую поверхность, способную активно связывать воду, последние могут терять свои свойства или разрушаться.

Интересным представляется также рассмотреть данные по дегидратации кожи. Кожа является естественным барьером на пути инородных молекул и частиц, потенциально способных проникнуть в организм. Ее строение таково, что препятствует проникновению крупных гидрофильных молекул, а также воды, что предотвращает обезвоживание организма, позволяя, тем не менее, коже «дышать». Основной «линией обороны» является самый верхний и тонкий слой кожи – роговой слой (*stratum corneum*). Роговой слой состоит из корнеоцитов – мертвых клеток, заполненных фибриллярным белком кератином и образующих роговые «чешуйки» толщиной 0,2–0,4 мкм и ≈40 мкм в диаметре. Корнеоциты соединены между собой корнеодесмосомами, связывающими клетки в прочную сеть. Непроницаемым роговой слой делает липидный матрикс, в который «погружены» корнеоциты; он состоит в основном из керамидов, холестерина и жирных кислот, образующих систему мультислойных бислоев. Ниже находится слой живых эпидермальных клеток и слой дермы, пронизанной капиллярами, способными «разнести» проникшее через барьер вещество по всему организму.

На рис. 6 представлены спектры ЭПР зонда **(1)** в цитозоле ткани кожи крыс. Спектры ЭПР заметно отличаются от аналогичных спектров для цитозоля эритроцитов: имеется расщепление высокопольной компоненты спектра h_{-1} , свидетельствующее о присутствии в цитозоле клеток ткани кожи жидкостей с разной полярностью (отличие констант сверхтонкого расщепления $A_{изо}$ – расстояния между компонентами h_0 и h_{-1}) и с различной вязкостью этих жидкостей в цитозоле клеток кожи [11]: для узкого сигнала высокопольной компоненты спектра h_{-1} $A_{изо}$ выше, чем для более широкого сигнала высокопольной компоненты [11, 17]. Кроме того, отличаются параметры h_0/h_{-1} для этих сигналов, что свидетельствует о разной вязкости двух типов жидкостей в цитозоле клеток кожи.

Учитывая многослойное строение ткани кожи, пронизанной коллагеном (70% от общего количества белков кожи) и небольшим количеством внутриклеточной воды, можно интерпретировать полученные спектры ЭПР таким образом: водорастворимый зонд **(1)** частично находится в связанной иммобилизованной внутриклеточной и межклеточной воде, а частично в относительно подвижной внутриклеточной воде. Так как в ткани кожи наблюдается своеобразный градиент насыщения клеток кожи водой – от верхнего обезвоженного рогового слоя до нижнего слоя базальных клеток дермы, более насыщенного водой, можно полагать, что узкая компонента спектра ЭПР соответствует зонду в цитозоле клеток нижних слоев ткани кожи (дерма), а более широкая – зонду в цитозоле клеток в верхних слоях ткани кожи (роговой слой и эпидермис).

Анализ спектров ЭПР зонда **(1)** в цитозоле клеток кожи показал, что для узкой составляющей высокопольной компоненты триплета $\tau_{c(-1)} = 1,8 \cdot 10^{-10}$ с, т.е.

микровязкость более подвижной жидкости в ткани кожи все равно значительно больше, чем чистой воды ($0,6 \cdot 10^{-10}$ с), а микровязкость связанной (иммобилизованной) воды еще в 2 раза выше, так как для широкой составляющей высокопольной линии спектра $\tau_{c(-1)} = 3,6 \cdot 10^{-10}$ с. Возможно речь идет о разных слоях клеток ткани кожи – обезвоженных и менее обезвоженных.

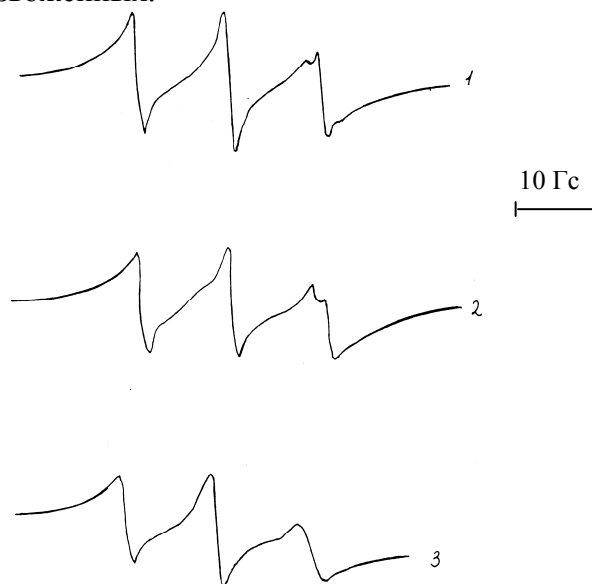


Рис. 6. Спектры ЭПР спинового зонда **(1)** в цитозоле клеток ткани кожи крысы: 1 – контроль; 2 – в присутствии глицерина (15 %); 3 – в присутствии ПЭГ-400 (15%).

Добавление глицерина к образцам ткани кожи приводит к перераспределению широкого и узкого сигнала в высокопольной компоненте спектра h_{-1} : интенсивность узкого сигнала уменьшается, а интенсивность широкого сигнала увеличивается. Добавление к ткани кожи ПЭГ-400 приводит к полному исчезновению узкого сигнала в высокопольной компоненте спектра и получению гомогенного сигнала с $\tau_{c(-1)} = 7,2 \cdot 10^{-10}$ с. Эти изменения в спектрах свидетельствуют о разной степени (глубине) дегидратации клеток ткани кожи в случае глицерина и ПЭГ-400: добавление глицерина уменьшает количество свободной воды цитозоля клеток кожи, а добавление ПЭГ-400 приводит не только к исчезновению подвижной воды в цитозоле клеток кожи, но и к дополнительному увеличению вязкости иммобилизованной фракции цитозоля кожи. Эти данные согласуются с данными об увеличении дегидратации эритроцитов с увеличением молекулярной массы растворителей.

Не менее интересными представляются данные по дегидратации клеток ткани сердечной мышцы крыс. На рис. 7 представлены спектры ЭПР водорастворимого положительно заряженного спинового зонда **(2)** в цитозоле кардиомиоцитов ткани сердца крысы. В низкопольной компоненте спектра h_{+1} наблюдается суперпозиция широкого и узкого сигналов ЭПР, что свидетельствует о разном микроокружении зонда **(2)** во внутриклеточной жидкости кардиомиоцитов – наличии в цитозоле вязкой и более подвижной жидкости. Ситуация несколько напоминает спектр ЭПР водорастворимого зонда **(1)** в цитозоле клеток кожи – суперпозицию широкого и узкого сигналов ЭПР.

Для правильной интерпретации полученного спектра ЭПР в кардиомиоциты вводили незаряженный водорастворимый зонд **(1)**, спектр которого представлен на рис. 8. В случае незаряженного зонда **(1)** в цитозоле кардиомиоцитов наблюдался только узкий гомогенный сигнал ЭПР. Этот прием позволил предположить, что широкий

«наплыв» в спектре аминорадикала не связан с иммобилизованной внутриклеточной водой кардиомиоцитов, а, возможно, связан с какими-то отрицательно заряженными структурами цитозоля, притягивающими положительно заряженный аминорадикал по ион-ионному механизму, что приводит к торможению вращательной подвижности части зонда в цитозоле.

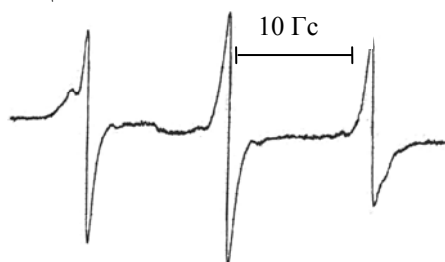


Рис. 7. Спектр ЭПР спинового зонда (2) в цитозоле кардиомиоцитов ткани сердца крысы.

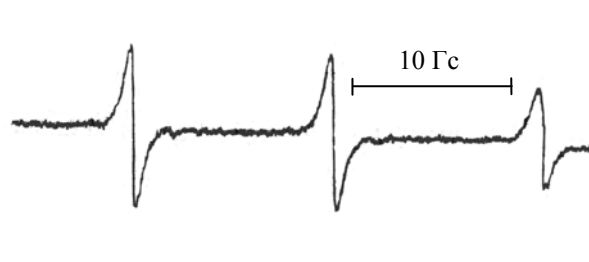


Рис. 8. Спектр ЭПР зонда (1) в цитозоле кардиомиоцитов ткани сердца крысы.

Известно, что внутриклеточные органеллы кардиомиоцитов митохондрии, в отличие от других клеток, содержат в мембране отрицательно заряженный фосфолипид кардиолипид, в полярной части которого находятся две молекулы фосфатидной кислоты, связанные с помощью одной молекулы глицерина. Возможно, кардиолипид и связывает часть аминорадикала по ион-ионному механизму, затормаживая его вращательную подвижность. Для незаряженного зонда (1) в цитозоле кардиомиоцитов ткани сердца $\tau_{c(-1)} = 0,7 \cdot 10^{-10}$ с, т.е. вязкость цитозоля в кардиомиоцитах несколько выше, чем в эритроцитах ($0,6 \cdot 10^{-10}$ с). На рис. 9 представлены спектры ЭПР зонда (1) в цитозоле клеток трупной жировой ткани человека. Спектр ЭПР характеризуется заторможенной по сравнению с чистой водой вращательной подвижностью зонда ($\tau_{c(-1)} = 0,5 \cdot 10^{-10}$ с), что близко к подвижности зонда в цитозоле эритроцитов и соответствует структуре специализированных жировых клеток – адипоцитов, которые накапливают жир, преимущественно в виде триглицеридов. Это соответствует внешним признакам жировой ткани – более подвижной и лабильной по сравнению с тканями органов, имеющими плотные межклеточные контакты и большое количество разнообразных внутриклеточных органелл.

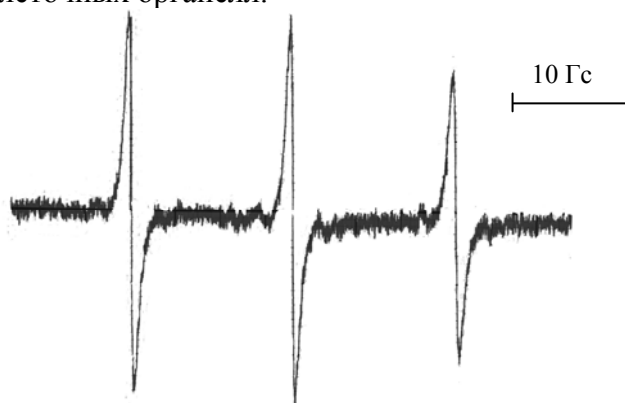


Рис. 9. Спектр ЭПР зонда (1) в цитозоле адипоцитов – клеток жировой ткани человека.

Выводы

Полученные данные показали, что полиэтиленоксиды, являющиеся основой для многих полимерных наночастиц, способны образовывать супрамолекулярный комплекс с макромолекулой альбумина по гидрофобному механизму за счет взаимодействия

метиленовых групп ПЭГ с гидрофобными полостями поверхности макромолекулы альбумина. Максимальное сродство к БСА у ПЭГ с молекулярной массой 600 Да, когда его размер молекулы совпадает с размером главной гидрофобной полости белка.

Сравнительное изучение текучести мембран липосом и эритроцитов показало более низкие значения для последних. Взаимодействие ПЭГ-400, ПЭГ-1500, пропиленгликоля и глицерина с липосомами и эритроцитами приводит к понижению текучести липидов мембран клеток вследствие взаимодействия изученных веществ с мембранами с последующей их дегидратацией. Для мембран эритроцитов этот эффект существенно меньше, чем для мембран липосом, так как липиды в эритроцитах связаны достаточно сильным белково-липидным взаимодействием, усиленным присутствием холестерина.

Изучение кинетики дегидратации эритроцитов при взаимодействии их с осмотически активными ПЭГ указывает на быструю дегидратацию клеток, сопровождающуюся вначале увеличением вязкости внутриклеточной жидкости эритроцитов, а затем медленным снижением ее вязкости и набуханием клеток в течение 1 ч. Таким образом, дегидратацию клеток следует рассматривать как диффузию низкомолекулярных веществ через мембрану эритроцитов и выравнивание осмотического давления внутри и снаружи клетки. Способность дегидратировать клетки эритроцитов возрастает, а способность диффундировать через мембрану уменьшается с увеличением молекулярной массы полиэтиленоксидов и других осмотически активных веществ. ПЭГ-2000 не способен диффундировать через мембрану эритроцитов из-за размеров и вызывает стойкую дегидратацию эритроцитов.

Исследование цитозоля клеток ткани кожи методом спиновых зондов показало наличие в клетках двух типов жидкостей: умеренно вязкой (подвижной) и значительно более вязкой. Вероятно, они представляют собой насыщенные водой нижний слой базальных клеток и обезвоженный верхний роговой слой. Добавление осмотически активных веществ к ткани кожи приводит либо к уменьшению доли подвижной воды, либо к полному ее исчезновению.

Зондирование цитозоля водорастворимыми (заряженными и нейтральными) спин-мечеными соединениями показало наличие в цитозоле клеток ткани сердца отрицательно заряженных участков. Заряд локализован, по всей видимости, на поверхности мембран митохондрий, содержащих отрицательно заряженный фосфолипид кардиолипин.

Микровязкость $\tau_{c(-)}$ цитозолей изученных клеток тканей и органов увеличивается в ряду: адипоциты ($0,5 \cdot 10^{-10}$ с) < эритроциты ($0,6 \cdot 10^{-10}$ с) < кардиомиоциты ткани сердца ($0,7 \cdot 10^{-10}$ с) < клетки кожи ($3,6 \cdot 10^{-10}$ с) < клетки кожи после дегидратации ($7,2 \cdot 10^{-10}$ с).

Особенности поверхности биологических материалов состоят в высокой степени трансляционной подвижности и латеральной диффузии фосфолипидов, наличии значительного количества воды, связанной с поверхностью мембран, а также внутриклеточной и межклеточной воды. Реологические и упругие свойства биоповерхностей формируются сложным сочетанием микровязкости цитоплазматических мембран и вязкости цитозоля клеток.

Литература

1. Введение в прикладную энзимологию - иммобилизованные ферменты / Под ред. И.В. Березина, К. Мартиника. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. – 383 с.
2. Мартинек К., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Березин И.В. Катализ водорастворимыми ферментами в органических растворителях // Докл. АН СССР. – 1977. – Т. 236. – С. 920–923.

3. Иммуобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы / Под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинекка. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – Т. 1,2. –296 с.; 358 с.
4. Kam N.W.S., Jessop T.C., Wender P., Dai H. Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube-Protein Conjugates into Mammalian Cells // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126, N. 22. – P. 6850–6851.
5. Chen R., Zhang Y., Wang D., Dai H. Non-covalent Sidewall Functionalization of Single-walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123, N. 16. – P. 3838–3839.
6. Zanello L.P., Bin Zhao, Hui Hu, Haddon R.C. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes // *Nano Letters* – 2006. – V. 6, N. 3. – P. 562–567.
7. Sinha N., Yeow J.T.-W. Carbon nanotubes for biomedical applications // *IEEE Transactions on Nanobioscience.* – 2005. – V. 4, N. 2. – P. 180–195.
8. Rey D.A., Batt C.A., Miller J.C. Carbon nanotubes in biomedical applications // *Nanotechnology Law @ Business.* – 2006. – V. 3, N. 3. – P. 263–292.
9. Yang W., Thordarson P., Gooding J.J. et al. Carbon nanotubes for biological and biomedical application // *Nanotechnology.* – 2007. – N. 18. – P. 1–12.
10. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. – М.: Медицина, 1983. – 384 с.
11. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
12. Сергеев П.В. Биохимическая фармакология. – М.: Выс. шк., 1982. – 343 с.
13. Каплун А.П., Ле Банг Шон, Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ // *Вопросы мед. химии*, 1999. – Т. 4, №1. – С. 3–12.
14. Zhao Y., Xing G., Chai Z. Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe? // *Nature Nanotechnology.* – 2008. – V. 3, N. 4. – P. 191–192.
15. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности – М.: Радио и связь, 1991. – 169 с.
16. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн. – М.: ИРЭ РАН, 1994. – 164 с.
17. Кольтовер В.К. Спиновые метки и зонды в исследованиях модельных и биологических мембран // *Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биофизика*, 1979. – Т. II. – С. 10–100.
18. Kornberg R.D., McConnell H.M. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes // *Biochemistry*, 1971. – V. 10, N. 7. – P. 1111–1120.
19. Иванов Л.В., Картель Н.Т. Оценка микровязкости клеточных мембран различной природы методом спиновых зондов // *Доп. НАН України.* – 2012. – №5. – С. 139–145.
20. Safra T., Muggia F., Jeffers S. et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m² // *Ann. Oncol.* – 2000. – V. 11, N. 8. – P. 1029–1033.
21. Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е., Рыбальченко В.К. Структура и функция биологических мембран. – Киев: Выщ. шк., 1981. – 336 с.
22. Парсонс Д.С. Биологические мембраны. – М.: Атомиздат, 1978. – 230 с.
23. Иванов Л.В., Пушкарь Н.С., Моисеев В.А. и др. Способ определения фазового состояния внутриклеточной воды // *Авт. свид. 830212 (СССР)*, 1981. Оpubл. 15.05.1981, Бюл. №18.
24. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. – М.: Мир, 1993. – Т. 1. – 384 с.

25. Иванов Л.В., Моисеев В.А., Гаврилова и др. Способ определения степени деструкции клеток // Авт. свид. 1049808 (СССР), 1983. Опубл. 23.06.1983, Бюл. №39.

ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ РЕОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОВЕРХНІ НАНОБІООб'ЄКТОВ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Л.В. Иванов, М.Т. Картель

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна*

З використанням методу спінових зондів проведена характеристика реологічних властивостей (плинність, в'язкість) мембран клітин ряду біологічних тканин і органів, а також макромолекули альбуміну при взаємодії з багатоатомними спиртами та поліетиленоксидами. Показано вплив молекулярної маси і концентрації поліетиленоксидів на плинність мембран і на мікров'язкість цитозолів різних клітин (еритроцитів людини, ліпосом, епітелію шкіри і серцевого м'яза щурів). Розглянуто причини зміни реологічних показників, що виникають при процесах дегідратації клітин.

CHARACTERIZATION OF RHEOLOGICAL PROPERTIES OF NANOBIOOBJECTS SURFACE BY SPIN PROBES

L.V. Ivanov, M.T. Kartel

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine
17, General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine*

Using the method of spin probes it was carried out the characterization of the rheological properties (fluidity, viscosity) of the cell membranes for a number of biological tissues and organs, as well as albumin macromolecules in the interaction of with polyhydric alcohols and polyethylene oxides. It was shown the effect of molecular mass and concentration of poly-ethylene oxides on the membrane fluidity and the cytosol microviscosity for various cells (human erythrocytes, liposomes, skin epithelium and heart muscle of rats). It was also considered the reasons of the rheology changes occurring during the processes of dehydration of cells.