

УДК 577.29

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БРОУНОВСКОГО ДВИЖЕНИЯ НА МЁССБАУЭРОВСКИЕ СПЕКТРЫ НАНОЧАСТИЦ В СРЕДЕ, МОДЕЛИРУЮЩЕЙ КЛЕТОЧНУЮ ЦИТОПЛАЗМУ

© 2020 г. А. Ю. Юреня^{1,2,*}, А. А. Никитин^{2,3}, Р. Р. Габбасов¹, М. А. Поликарпов¹, В. М. Черепанов¹, М. А. Чуев⁴, М. А. Абакумов³, В. Я. Панченко^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение

“Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

³Национальный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Физико-технологический институт имени К.А. Валиева Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: antonyurenya@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Нестандартный характер внутриклеточного движения связан со значительным содержанием макромолекул и во многом определяется явлением аномальной диффузии. С помощью мёссбауэровской спектроскопии впервые в наносекундном временном масштабе исследованы особенности движения наночастиц в концентрированных растворах белка, моделирующих цитоплазму. Проведен сравнительный анализ нано-вязкости и макро-вязкости сред.

DOI: 10.31857/S0367676520110320

ВВЕДЕНИЕ

Процессы внутриклеточного транспорта относятся к одной из наименее изученных областей биологии клетки [1]. Еще более 100 лет назад в работах Эйнштейна и Смолуховского было показано, что транспорт мельчайших частиц в простых растворах описывается законами броуновского движения [2, 3]. Тем не менее, даже в рамках современной теории оказывается невозможным описание процессов движения макромолекул и частиц в биологических средах [4, 5]. В живой клетке содержится множество макромолекул, таких как белки, нуклеиновые кислоты и сложные сахара, объемная доля которых достигает 40% от общего объема жидкой фазы клеточной цитоплазмы. Одновременное присутствие таких молекул в среде приводит к эффекту заполненного объема, т.н. “макромолекулярному краудингу” (ММК) [6]. Краудинг оказывает влияние на транспортные процессы [4], термодинамические параметры, скорость и равновесие биохимических реакций [7–10]. Специфику движения в клетках в первую очередь связывают с явлением аномальной диффузии [7, 11]. Существует несколько упрощенных моделей, описывающих нестандартное движение макромолекул в условиях диффузии ММК [9, 11],

однако понимание динамики этого движения до сих пор остается одной из ключевых задач биологии [8, 13].

При исследовании движения в условиях аномальной диффузии ММК в противовес макроскопической вязкости среды часто рассматривают понятие микро- и нано-вязкости [7, 13]. Выделение микро- и нано-вязкости связано с тем, что в условиях ММК движение броуновской частицы характеризуется коэффициентом диффузии, величина которого зависит от временного и пространственного масштаба измерений. В таких экспериментах исследуется среднеквадратичное смещение броуновской частицы за фиксированные интервалы времени. Современные подходы основаны на оптическом наблюдении “броуновской частицы”, в качестве которой используются флуоресцентно-меченые белки или наноразмерные частицы-зонды [7, 15–17]. Основные усилия исследователей сфокусированы на усовершенствовании экспериментальной модели с целью уменьшения масштаба измерений. Тем не менее, наблюдение индивидуального движения наноразмерных объектов оптическими методами имеет ряд ограничений, прежде всего обусловленных дифракционным пределом, что, в действительности, не позволяет получать

высокоточных данных о движении частиц ни в нанометровом, ни в наносекундном диапазоне. Наиболее актуальные результаты были получены с пространственным и временным разрешением >100 нм и >1 мкс соответственно [7, 17].

Ранее нами был предложен новый подход к изучению динамики броуновских частиц в условиях ММК [18, 19]. В основе подхода лежит мёссбауэровская спектроскопия диспергированных в исследуемой среде наночастиц (НЧ), изготовленных на основе изотопа ^{57}Fe . Измерение мёссбауэровских спектров ансамбля НЧ в составе вязких сред обнаруживает уширение линии вследствие их броуновского движения [20]. В первом приближении диффузионную трансформацию спектра частиц можно рассматривать как однородное уширение $\Delta\Gamma$ всех спектральных линий [21, 22], которое описывается формулой:

$$\Delta\Gamma = \frac{E_0^2 T}{3\hbar\pi c^2 R\eta}, \quad (1)$$

где T – температура, η – коэффициент динамической вязкости, R – размер частицы, E_0^2 – энергия гамма-кванта.

В соответствии с формулой (1) уширение спектра НЧ в вязкой среде относительно спектра порошкового образца обратно пропорционально ее вязкости. Таким образом, значение вязкости среды может быть получено из совместного анализа спектра НЧ, диспергированных в исследуемой среде, и порошкового спектра НЧ, измеренного при той же температуре. Существенно, что временное разрешение предлагаемого подхода определяется временем жизни возбужденного состояния ядра ^{57}Fe ($<10^{-7}$ с). При этом усредненные параметры движения частиц за указанное время непосредственно отражены в характеристиках получаемых спектров, что фактически исключает пространственное ограничение измерений. Таким образом, масштаб измерения на два порядка превосходит нижнюю границу имеющихся оптических методов, и вычисляемая по формуле (1) величина вязкости соответствует понятию нано-вязкости. В предшествующих работах нами была разработана методика анализа сверхтонкой структуры мёссбауэровских спектров, учитывающая разделение вкладов магнитной релаксации и броуновского движения НЧ в жидких средах [19]. Методика была успешно апробирована в исследовании параметров движения наночастиц-зондов, диспергированных в простых растворах с известной вязкостью [19, 23].

В основе данной работы лежит исследование броуновского движения НЧ в условиях ММК с помощью мёссбауэровской спектроскопии. При исследовании систем, моделирующих ММК, основными параметрами являются динамическая вязкость среды η и объемная доля макромолекул

ϕ в этой среде [11]. Для исследования было получено три образца вязких сред, содержащих диспергированные НЧ феррита кобальта $\text{Co}^{57}\text{Fe}_2\text{O}_4$. Модельные среды изготавливались на основе воды, глицерина и бычьего сывороточного альбумина (БСА), используемого в качестве краудинг-агента, объемная доля которого в среде составляла: 0.5 и 10%. Соотношение компонентов в каждом образце было подобрано таким образом, чтобы их макроскопическая вязкость была равна и составляла $\eta_0 = 50$ сП. Жидкие среды с вязкостью такого порядка присутствуют в компартментах живых клеток [24] и могут исследоваться с применением НЧ на стандартном мёссбауэровском спектрометре [19]. По результатам измерения и анализа спектров образцов НЧ, диспергированных в модельных средах с различным содержанием краудинг-агента, было установлено соотношение нано-вязкости сред η , определяемой из формулы (1), и макроскопической вязкости η_0 , измеряемой экспериментально при помощи вискозиметра.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Синтез НЧ $\text{Co}^{57}\text{Fe}_2\text{O}_4$

Синтез НЧ осуществлялся методом высокотемпературного сосаждения. Для этого 0.519 г $^{57}\text{FeCl}_3$ (содержание изотопа $^{57}\text{Fe} \geq 95\%$), было растворено в 6.4 мл деионизированной воды, после чего к раствору было добавлено 0.689 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, растворенного в 0.8 мл деионизированной воды и 0.2 мл HCl (36%). Полученный раствор добавляли по каплям к 32 мл 1 М раствора NaOH , предварительно нагретого до температуры кипения. Кипение раствора поддерживали в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. По окончании реакции смесь охлаждали до комнатной температуры, НЧ отделяли от раствора центрифугированием и трижды промывали деионизированной водой. Полученные НЧ феррита кобальта были дополнительно стабилизированы в воде путем модификации их поверхности цитрат-ионами [25].

Получение модельных сред

Заданную объемную долю краудинг-агента ϕ при получении модельных сред на основе БСА, моделирующих ММК, рассчитывали с помощью формулы [11]:

$$\phi = \frac{\vartheta m_{BSA}}{V_{solv} + \vartheta m_{BSA}}, \quad (2)$$

где V_{solv} – объем растворителя, в котором растворяется БСА с массой m_{BSA} , ϑ – специфический объем БСА в растворителе. Значение ϑ для БСА в водных растворах глицерина составляет порядка 0.69 мл/г [26]. Поскольку чистые водные раство-

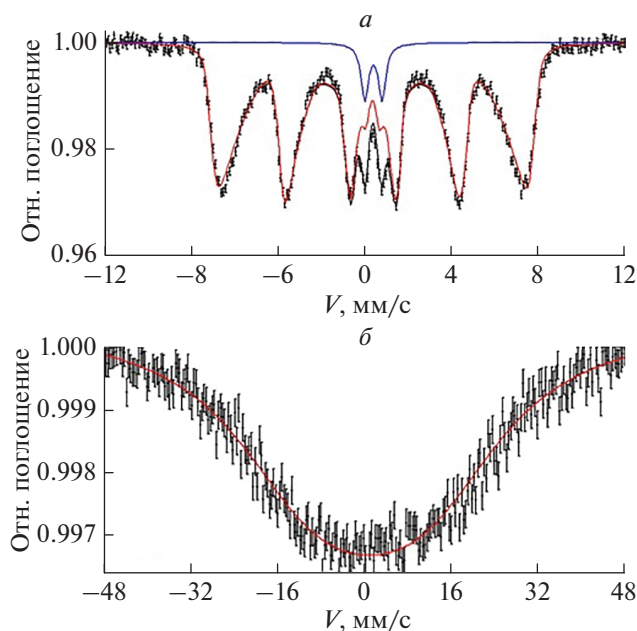


Рис. 1. ^{57}Fe -мёссбауэровские спектры НЧ феррита кобальта $\text{Co}^{57}\text{Fe}_2\text{O}_4$. Представлен спектр порошкового образца НЧ (а) и спектр НЧ, диспергированных в водно-глицериновом растворе БСА с объемной долей $\Phi_{\text{БСА}} = 10\%$ (б). Диффузионное уширение спектра НЧ в среде составляет $\Delta\Gamma_{10} = 29 \pm 4$ мм/с. Спектры измерены при температуре $T = 276.0 \pm 0.1$ К.

ры БСА с заданным ϕ имеют определенные значения вязкости, при конкретной температуре, с целью получения модельных растворов с $\Phi_{\text{БСА}} = 5$ и 10% и заданной вязкостью чистый белок растворяли в водных растворах глицерина. Необходимое соотношение глицерина и воды в модельных средах было определено в калибровочных экспериментах с применением ротационного вискозиметра RV-2T (W&J Instrument Co., LTD). Измеренная вязкость исследуемых образцов η_0 составила 50 ± 2 сП при температуре $T = 276.0$ К, соответствующей температуре измерения спектров.

Получение модельных сред с диспергированными НЧ

Для получения сред с НЧ, в процессе изготовления в качестве водной компоненты раствора использовали коллоидный раствор НЧ в аналогичной пропорции. Итоговая концентрация НЧ, диспергированных в средах, составляла $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Измерения макроскопической вязкости полученных сред с диспергированными НЧ показали, что данная концентрация НЧ не оказывает влияния на величину вязкости сред. Полученные среды обрабатывались в ультразвуковой бане, после чего пе-

реливались в плоские цилиндрические кюветы из плексигласа 1 мл для последующих измерений.

Анализ формы и размеров НЧ

Морфологию и размер “ядра” НЧ устанавливали с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии. Исследования проводили на микроскопе JEOL JEM-1400. Средний размер НЧ вычисляли с использованием программного обеспечения ImageJ. НЧ в исходном коллоиде и образцах сред анализировали на монодисперсность методом динамического светорассеяния с использованием прибора Malvern Zetasizer Nano ZS.

Мёссбауэровская спектроскопия

Спектры образцов измеряли при $T = 276.0 \pm 0.1$ К на спектрометре MC-1104Em с использованием штатного проточного криостата. Диапазон скоростей источника гамма-квантов при исследовании образцов с модельными средами составил ± 48 мм/с, что в 4 раза больше диапазона ± 12 мм/с при измерении спектра высушенных НЧ. Для калибровки спектрометра на другом канале регистрации измеряли эталонный поглотитель $\alpha\text{-Fe}$. В качестве источника гамма-квантов использовали $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$ активностью 10 мКи. Изомерные сдвиги определяли относительно линии поглощения $\alpha\text{-Fe}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установленный по микрофотографиям средний диаметр НЧ составил 9 ± 2 нм. Исследование гидродинамических параметров НЧ показало длительное (7 сут) сохранение монодисперсности НЧ как в исходном водном растворе, так и в водно-глицериновых растворах БСА. Сама по себе молекула БСА представляет собой глобулу в форме сплюснутого эллипсоида вращения с полуосями 1.8 на 4.6 нм [11]. Таким образом, синтезированные НЧ соразмерны краудинг-агенту.

Анализ сверхтонкой структуры мёссбауэровских спектров проводили в рамках многоуровневой модели релаксации ферромагнитных наночастиц [27]. Разделение вкладов магнитной релаксации и броуновского движения НЧ в среде проводили на основе методики, описанной в [19]. На рис. 1а представлен спектр порошкового образца наночастиц феррита кобальта и спектр этих же частиц, диспергированных в растворе с $\Phi_{\text{БСА}} = 10\%$. Наблюдается значительное видоизменение спектра НЧ в вязкой среде, которое обусловлено их броуновским движением. Характерный секстет линий трансформировался в уширенный синглет: на рис. 1б спектр НЧ в растворе БСА приведен на четырехкратно увеличенном масштабе скоростей. Броуновское уширение спектральных линий сопровождается значительным сниже-

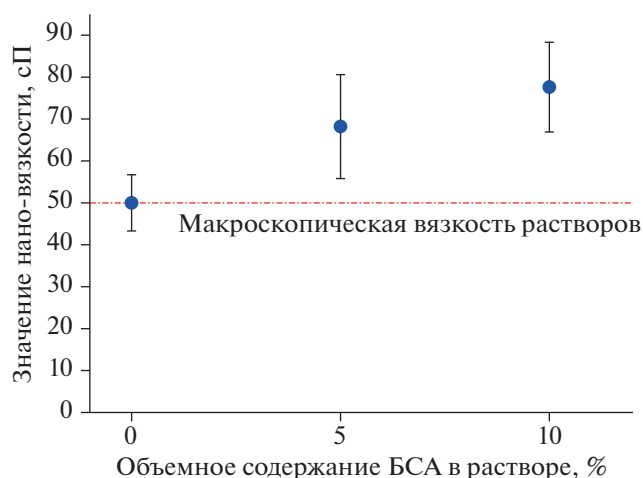


Рис. 2. Рассчитанные на основании анализа мёссбауэровских спектров значения нано-вязкости, соответствующей движению НЧ в исследуемых модельных средах. Представлены значения для сред с $\phi_{\text{БСА}} = 0, 5$ и 10% . Макроскопическая вязкость всех сред η_0 составляла 50 ± 2 сП. Вязкости соответствуют температуре сред $T = 276.0 \pm 0.1$ К.

нием вероятности резонансного поглощения в образце: максимумы относительного поглощения НЧ в среде на порядок меньше. Аналогичная трансформация спектров наблюдается для всех образцов вязких сред с НЧ. По результатам обработки уширение спектральных линий составило $\Delta\Gamma_0 = 45 \pm 6$ мм/с, $\Delta\Gamma_5 = 33 \pm 6$ мм/с, $\Delta\Gamma_{10} = 29 \pm 4$ мм/с для образцов с $\phi_{\text{БСА}} 0.5$ и 10% соответственно. Данный результат говорит о том, что, несмотря на равную вязкость растворов $\eta_0 = 50$ сП, характер броуновского движения НЧ в них различен. Поскольку уширение спектральных линий менее выражено для образцов, содержащих БСА, можно заключить, что в условиях ММК средняя скорость движения НЧ оказывается ниже, чем в простом растворе. При этом средняя скорость движения НЧ снижается с повышением концентрации БСА в растворе.

Согласно уравнению (1), уширение спектра НЧ является функцией нано-вязкости раствора η , в соответствии с которой происходит их броуновское движение за характерное время $t \sim 10^{-7}$ с. В условиях водного раствора глицерина броуновское движение НЧ происходит в отсутствие ММК, поэтому нано-вязкость может рассматриваться как независимая от масштаба измерения величина, соответствующая значению макроскопической вязкости раствора $\eta = \eta_0 = 50$ сП. С учетом (1), значение нано-вязкости η , соответствующей движению

НЧ в среде с заданным значением $\phi_{\text{БСА}}$, может быть получено из:

$$\eta = \frac{\eta_0 \Gamma_0}{\Gamma}, \quad (3)$$

где η_0 — вязкость простого раствора с такой же макроскопической вязкостью, $\Delta\Gamma_0$ — уширение спектра НЧ в простом растворе, $\Delta\Gamma$ — уширение спектра НЧ, диспергированных в исследуемой среде ММК. Значение нано-вязкости для сред с $\phi_{\text{БСА}} = 5\%$ и $\phi_{\text{БСА}} = 10\%$ составило $\eta_5 = 68.2 \pm 12.4$ сП и $\eta_{10} = 77.6 \pm 10.7$ сП соответственно (рис. 2).

Таким образом, установлено, что даже в отсутствие клеточных структурных единиц эффект ММК изменяет броуновское движение наноразмерных объектов. Значение нано-вязкости в растворе с объемным содержанием 10% макромолекул, оказалась в 1.5 раза выше значения его макроскопической вязкости. Следует отметить, что разработанный подход для исследования нано-вязкости может быть применен для любых других НЧ вне зависимости от их формы, размера и химии поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые методом мёссбауэровской спектроскопии проведено исследование наномасштабного движения в условиях макромолекулярного краудинга. Обнаружено, что наличие макромолекул в растворе в наносекундном диапазоне измерений замедляет среднюю скорость броуновского движения наночастиц. Данный эффект возрастает с повышением концентрации макромолекул в растворе.

Работа частично поддержана РФФИ в рамках комплексного научного проекта № 17-00-00444 (К): изготовление образцов выполнено в рамках подпроекта № 17-00-00442, мёссбауэровские исследования выполнены в рамках подпроекта № 17-00-00438, математический анализ выполнен в рамках подпроекта № 17-00-00443 и частично в рамках государственного задания ФТИАН им. К.А. Валиева РАН Минобрнауки РФ по теме № 0066-2019-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goins A.B., Sanabria H., Waxham M.N. // Biophys. J. 2008. V. 95. № 11. P. 5362.
2. Einstein A. // Ann. Phys. 1905. V. 17. P. 549.
3. Smoluchowski M. // Ann. Phys. 1906. V. 21. P. 756.
4. Hofling F., Franosch T. // Rep. Prog. Phys. 2013. V. 76. Art. № 046602.
5. Dix J.A., Verkman A.S. // Ann. Rev. Biophys. 2008. V. 37. P. 247.
6. Ellis R.J., Minton A.P. // Nature. 2003. V. 425. № 6953. P. 27.

7. *Di Rienzo C., Piazza V., Gratton E. et al.* // Nat. Commun. 2014. V. 5. № 1. P. 1.
8. *Elcock A.H.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. № 2. P. 196.
9. *Minton A.P.* // J. Cell. Sci. 2006. V. 119. № 14. P. 2863.
10. *Qin S., Zhou H.X.* // Biophys. J. 2009. V. 97. № 1. P. 12.
11. *Roosen-Runge F., Hennig M., Zhang F. et al.* // PNAS. 2011. V. 108. № 29. Art. № 11815.
12. *Novak I.L., Kraikivski P., Slepchenko B.M. et al.* // Biophys. J. 2009. V. 97 № 3. P. 758.
13. *Rivas G., Minton A.P.* // Trend. Biochem. Sci. 2016. V. 41. № 11. P. 970.
14. *Rashid R., Chee S.M., Raghunath M., Wohland T.* // Phys. Biol. 2015. V. 12. № 3. Art. № 034001.
15. *Weiss M.* // Phys. Rev. E. 2013. V. 88. № 1. Art. № 010101.
16. *Ernst D., Hellmann M., Köhler J., Weiss M.* // Soft Matt. 2012. V. 8. № 18. P. 4886.
17. *Guigas G., Kalla C., Weiss M.* // Biophys. J. 2007. V. 93. № 1. P. 316.
18. *Norregaard K., Metzler R., Ritter C.M. et al.* // Chem. Rev. 2017. V. 117. № 5. P. 4342.
19. *Чуев М.А., Черепанов В.М., Поликарпов М.А.* // Письма в ЖЭТФ. 2018. Т. 108. № 1. С. 57; *Chuev M.A., Cherepanov V.M., Polikarpov M.A.* // JETP Lett. 2018. V. 108. № 1. P. 59.
20. *Gabbasov R., Yurenya A., Nikitin A. et al.* // JMMM. 2019. V. 475. P. 146.
21. *Landers J., Salamon S., Remmer H. et al.* // Nano Lett. 2016. V. 16. № 2. P. 1150.
22. *Keller H., Kündig W.* // Sol. St. Commun. 1975. V. 16. № 2. P. 253.
23. *Черепанов В.М., Габбасов П.Р., Юреня А.Ю. и др.* // Крист. 2020. Т. 65. № 3. С. 414.
24. *Kuimova M.K., Yahioglu G., Levitt J.A. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 21. P. 6672.
25. *Garanina A.S., Naumenko V.A., Nikitin A.A. et al.* // Nanomed. 2020. V. 25. Art. № 102171.
26. *Priev A., Almagor A., Yedgar S. et al.* // Biochem. 1996. V. 35. № 7. P. 2061.
27. *Chuev M.A.* // JMMM. 2019. V. 470. P. 12.