

WPŁYW JONÓW GLINU NA STRUKTURĘ TKANKI OSIERDZIA ŚWINI, BADANEJ Z UŻYCIEM EPR - METODY ZNACZNIKÓW SPINOWYCH

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL, MARIA JASTRZĘBSKA

KATEDRA BIOFIZYKI, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA,
OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC;
C WALINA@SLAM.KATOWICE.PL

Streszczenie

Celem pracy była ocena zmian struktury tkanek osierdza świni, poddanych działaniu jonów glinu (w postaci siarczanu $Al_2(SO_4)_3$ oraz wodorotlenku $Al_2O_3 \cdot nH_2O$ w preparacie ALUSAL), z zastosowaniem spektroskopii EPR - metody znaczników spinowych (znacznik spinowy: 4-izotiocyjaniano-TEMPO; 4ITCTO). Wykazano, że traktowanie tkanki osierdza świni jonami glinu prowadzi do zwiększenia sztywności struktury wewnętrznej tkanki. Ujawniły to zmiany kształtu widma EPR znacznika 4ITCTO związanego z tkanką. Jakkolwiek efekty stabilizacji tkanki jonami Al^{3+} i aldehydem glutarowym są podobne, jednak mechanizmy sieciowania białek tkankowych są różne.

Słowa kluczowe: tkanka, osierdzie świni, sieciowanie, jony glinu, glutaraldehyd, EPR, znakowanie spinowe.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),30-33]

Wprowadzenie

Przez wiele lat uważano, że substancje zawierające glin są nieszkodliwe dla zdrowia. Dlatego zasadowe związki glinu są stosowane w leczeniu stanów nadkwaśności żołądka, szczególnie w chorobie wrzodowej. Do popularnych preparatów zawierających glin należą: Alugastrin, Alumag, Maalox, Gelatum Aluminium Phosphoricum, a także ALUSAL zawierający koloidalny wodorotlenek glinu (III) [1].

Glin wchłania się z przewodu pokarmowego i ulega kumulacji w tkankach. Jego toksyczność nie jest w pełni poznana. Uważa się, że zwiększona zawartość glinu w tkankach organizmu jest niekorzystna dla zdrowia. Objawami nadmiernej kumulacji tego pierwiastka w tkance mózgowej są zaburzenia pamięci i zaburzenia równowagi. Uszkodzenie neuronów jest przeważnie nieodwracalne. Wielu badaczy łączy choroby Alzheimera i Parkinsona z akumulacją glinu w organizmie. Metal ten występuje nie tylko w wymienionych lekach, ale także w wielu produktach spożywczych: napojach przechowywanych w puszkach aluminiowych, pokarmach pieczonych w folii aluminiowej lub gotowanych w naczyniach aluminiowych, itp.

Kolagen jest jednym z głównych składników białkowych tkanki łącznej, a więc i każdego narządu zawierającego tę tkankę [2,3]. Obficie występuje w skórze, ścięgnach, chrząstkach, kościach, zębach, ścianach naczyń krwionośnych i błonach. Jest również obecny w osierdziu, zastawkach serca oraz wielu innych tkankach. Glicyna stanowi co trzeci aminokwas w cząsteczce kolagenu. Glicynę poprzedza hydroksypolina (aminokwas charakterystyczny dla kolagenu), a po glicynie następuje prolina. Ponadto w kolagenie występuje rzadko spotykany aminokwas - hydroksylizyna [2]. Elastyna jest białkiem występującym w większości tkanek łącznych wspólnie z kolagenem i polisacharydami [4].

THE INFLUENCE OF ALUMINIUM IONS ON THE PORCINE PERICARDIUM TISSUE STRUCTURE INVESTIGATED BY EPR - SPIN LABELING METHOD

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL, MARIA JASTRZĘBSKA

DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC;
C WALINA@SLAM.KATOWICE.PL

Abstract

The aim of this work was to elucidate changes in the structure of porcine pericardium tissues treated with the aluminium ions (in the form of sulphate salt $Al_2(SO_4)_3$ or hydroxide $Al_2O_3 \cdot nH_2O$ in the ALUSAL preparation), using the EPR spectroscopy - spin labeling method (spin label: 4-Isothiocyanato-TEMPO; 4ITCTO). It has been demonstrated that the treatment of the porcine pericardium tissue with aluminium ions leads to enlargement of stiffness of the tissue internal structure. It was visible by the shape changes in the EPR spectra of 4ITCTO label attached with the tissue. Although results of the tissue stabilization by Al^{3+} ions and glutaraldehyde are similar, however mechanisms of the tissue proteins cross-linking are different.

Key words: tissue, porcine pericardium, crosslinking, aluminium ions, glutaraldehyde, EPR, spin labeling.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),30-33]

Introduction

For many years it has been considered that aluminium-containing substances are harmless for the health. Thus, the alkaline preparations containing aluminium are used for stomach hyperacidity treatment, especially in the ulcerous diseases. The popular pharmaceuticals used for this purposes are: Alugastrin, Alumag, Maalox, Gelatum Aluminium Phosphoricum, and also ALUSAL that contains colloidal aluminium hydroxide (III) [1].

Aluminium is absorbed from the alimentary canal and cumulated in tissues. Its toxicity is not fully recognized. One attends that enlarged concentration of aluminium in tissues is unprofitable for the health. Symptoms of the excessive cumulation of this element in the brain tissue are perturbations in the memory and ballance. The neurons damage is mostly irreversible. Many investigators link the Alzheimer's and the Parkinson's diseases with the aluminium cumulation in the organism. This metal is present not only in mentioned drugs, but also in many grocery products: drinks kept in the aluminium cans, foods roasted in tinfoil or boiled in aluminium dishes, etc.

The collagen is one of main protein components in the connective tissue, so every organ containing this tissue [2,3]. Abundantly collagen appears in the skin, tendons, gristles, bones, teeth, walls of blood-vessels and membranes. It also is present in the pericardium, heart valves and many other tissues. Glycine is each the third amino-acid in the collagen molecule. The glycine is preceded by the hydroxyproline (the amino acid characteristic for the collagen), and followed

Jest ona podstawowym składnikiem włókien elastycznych i sprężystych. Podobnie, jak w kolagenie, jedną trzecią reszt stanowi glicyna, jednak elastyna nie zawiera hydroksylizyny.

W celu stabilizacji biomateriałów tkankowych stosuje się najczęściej sieciowanie tkanek bogatych w kolagen za pomocą aldehydu glutarowego (glutaraldehydu; GA) [5, 6]. W garbarstwie w charakterze substancji sieciującej wykorzystuje się między innymi jony glinu (Al^{3+}) [7].

Oddziaływanie białek z różnymi składnikami komórek można badać różnymi metodami, włączając elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR), z wykorzystaniem znaczników spinowych (wolnych rodników) związanych kowalencyjnie z białkami [8, 9]. Przykładowo, znacznik spinowy 4-izotiocyaniano-TEMPO (4ITCTO) reaguje z grupami aminowymi białek [8]. Zmiany kształtu widm EPR znaczników spinowych umożliwiają monitorowanie modyfikacji ich struktury [10,11]. Znaczniki spinowe są stosowane przeważnie w formie roztworów wodnych. Badany materiał biologiczny jest inkubowany w roztworze znacznika; nadmiar znacznika jest usuwany przez dializę lub odmycie.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu glinu (w postaci siarczanu $Al_2(SO_4)_3$ oraz wodorotlenku $Al_2O_3 \cdot nH_2O$ w preparacie ALUSAL) na strukturę tkanki osierdzia świni, z wykorzystaniem spektrometrii EPR - metody znaczników spinowych. Analiza widm EPR znacznika spinowego 4ITCTO związanego z tkanką natywną i modyfikowaną za pomocą GA umożliwiła śledzenie efektów sieciowania tkanki wskutek działania jonów Al^{3+} (z soli lub leku).

Materiały i metody

Badanymi materiałami były tkanki osierdzia świni, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Próbki tkanek sieciowano przez 2 godziny z użyciem roztworów bazujących na PBS (PBS - solanka buforowana fosforanami; ang.: phosphate-buffered saline; pH 6,5), z dodatkiem 0,15% GA, 1,0% $Al_2(SO_4)_3$ lub 2% ALUSALu (tabletki; Polfa) zawierającego wodorotlenek glinu $Al_2O_3 \cdot nH_2O$. Próbki natywne i modyfikowane inkubowano w roztworze znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-TEMPO w 4°C przez 24 h. Po tym czasie nadmiar znacznika odmywano 10-krotnie, stosując wirowanie (6000 obr/min). Pomiedzy każdym wirowaniem próbkę płukano roztworem PBS. Następnie materiał umieszczano w kapilarze o średnicy 0,8 mm i wykonywano pomiary z użyciem spektrometru EPR firmy Radiopan-Poznań. Widma próbek rejestrowano za pomocą spektrometru EPR typ SE/X 2542, z rezonatorem cylindrycznym TM110. Stosowano moc mikrofalową ok. 100 mW z modulacją częstotliwości 100 kHz, amplitudę modulacji 0,08 mT oraz czas rejestracji 16 min. ze stałą czasową 1s. Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej.

Wyniki i dyskusja

Typowe widmo EPR znacznika spinowego 4ITCTO inkorporowanego do natywnej tkanki osierdzia świni przedstawiono na RYS.1, ukazującym linie charakterystyczne dla rodników: poruszającego się szybko, słabo związanego (wąska linia h_w) i poruszającego się wolno, silnie związanego (szeroka linia h_s). Analiza widm eksperymentalnych została przeprowadzona na podstawie obliczonego stosunku h_w/h_s , który jest bardzo wrażliwą miarą stanu fizycznego białek w błonach biologicznych [8].

Porównanie widm EPR (RYS.2) znacznika spinowego 4ITCTO inkorporowanego do tkanek osierdzia świni: natywnej oraz modyfikowanych GA lub jonami Al^{3+} (pochodzącymi z soli siarczanowej lub preparatu ALUSAL) pozwoliło okre-

być proline. Besides, in the collagen contains also hydroxylysine being rare amino-acid [2]. The elastin is protein that occurs in the most connective tissues jointly with the collagen and polysaccharides [4]. It is a main component of elastic and resilient fibers. Similarly to the collagen, each the third amino-acid is glycine, but elastin does not contain hydroxylysine.

For stabilization of tissular biomaterials, the cross-linking of the collagen-rich tissues by means of glutaraldehyde (GA) is most often used [5, 6]. Among cross-linking agents effective in the leathers tanning, the aluminium ions (Al^{3+}) may be mentioned [7].

The proteins interaction with different components of cells may be studied by various methods, including electron paramagnetic resonance (EPR) employing spin labels (free radicals) covalently bonded to proteins [8,9]. For example, the spin label 4- Isothiocyanato-TEMPO (4ITCTO) reacts with amine groups of the proteins [8]. Changes in the EPR-spectra of spin labels allowed monitoring the structural modification [10,11]. Spin labels are mostly used in the form of aqueous solutions. Biological material being investigated is incubated in the label solution; the label excess is removed by dialysis or washing off.

The aim of the present work was to examine the influence of aluminium (in the form of sulphate salt $Al_2(SO_4)_3$ or hydroxide $Al_2O_3 \cdot nH_2O$ in the ALUSAL preparation) on structure of the porcine pericardium tissue, using the EPR spectrometry - method of the spin labeling. Analysis of the EPR spectra of the 4ITCTO bonded to the tissues: native and GA-modified, allowed monitoring the cross-linking effects in the tissues under the action of the Al^{3+} ions (from salt or drug).

Materials and methods

The investigated materials were porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. The tissue samples have been crosslinked for 2 hours, using PBS-based solutions (PBS - phosphate-buffered saline; pH 6,5), supplemented with 0,15% GA, 1,0% $Al_2(SO_4)_3$ or 2% ALUSAL (tablets; Polfa) containing aluminium hydroxide $Al_2O_3 \cdot nH_2O$. Native and modified samples have been incubated in solution of spin label 4-Isothiocyanato-TEMPO at 4°C for 24 h. After this time, an excess of the label has been washed 10 times using centrifugation (6000 r.p.m.). Between each of centrifugations, the sample was rinsed with PBS. Afterwards the material has been placed into capillary vessel of 0,8 mm diameter and measurements have been carried out using the EPR spectrometer (Radiopan-Poznań). The samples' spectra have been recorded by means of EPR spectrometer type SE/X 2542 with cylindrical TM110 resonator. The microwave power nearly 100 mW with modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 0,08 mT, and scan time 16 min with time constant 1 s have been used. Measurements have been carried out at room temperature.

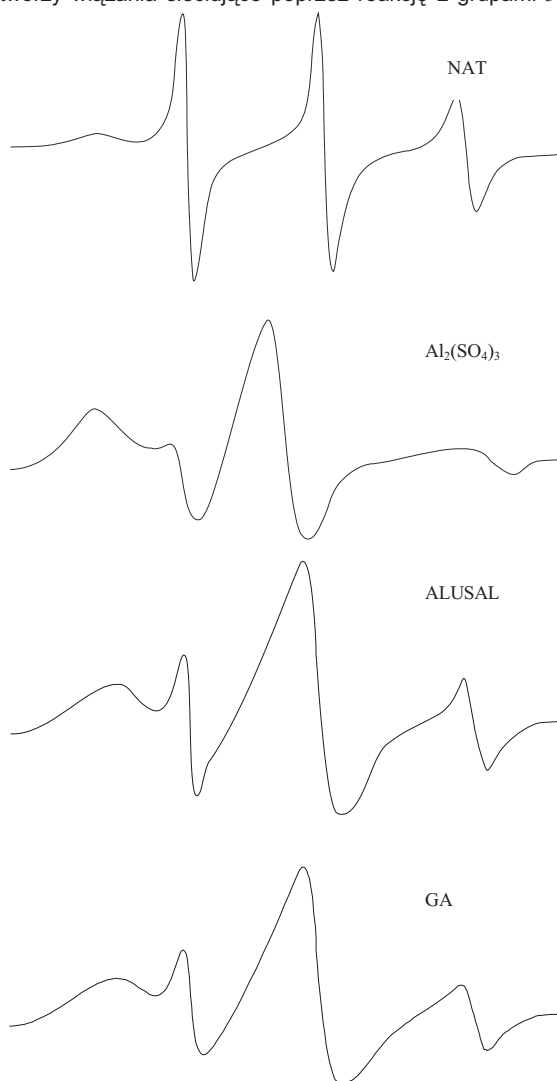
Results and discussion

Typical EPR spectrum of the 4ITCTO spin label incorporated into native porcine pericardium tissue has been presented in FIG.1, showing the lines characteristic for the radicals: fast moving, weakly immobilized (narrow-line h_w) and slowly moving, strongly immobilized (broad-line h_s). The analysis of the experimental spectra was performed by the calculation of h_w/h_s ratio, which is very sensitive measure of the physical state of proteins in biological membranes [Gwoździński].

Comparison of the EPR spectra (FIG.2) of the spin label

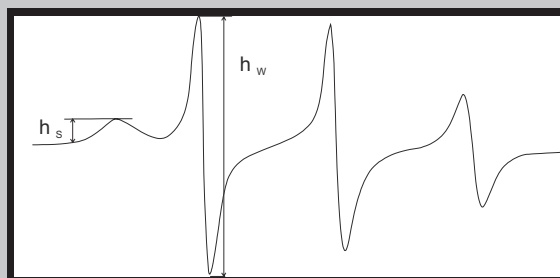
ślić siłę wiązania znacznika ze składnikami tkanki.

Wyniki prezentowanych badań pokazują, że znacznik spinowy 4ITCTO jest dobrym markerem zmian strukturalnych i dynamicznych, zachodzących w tkankach zawierających kolagen i elastynę. Wartości ilorazu h_w/h_s obliczone z widm EPR rodnika 4ITCTO związanego z tkanką traktowaną $Al_2(SO_4)_3$ ($h_w/h_s=0,5+0,1$), preparatem ALUSAL ($h_w/h_s=5+1$) lub GA ($h_w/h_s=4+1$) są istotnie mniejsze w porównaniu z tkanką natywną ($h_w/h_s=14+2$). Świadczy to o istotnych zmianach struktury modyfikowanych tkanek. Zarówno jony glinu, jak i glutaraldehyd powodują sieciowanie kolagenu. Mechanizmy tych procesów są jednak różne. W przypadku glutaraldehydu, zmniejszenie wartości stosunku h_w/h_s jest spowodowane w głównej mierze spadkiem wartości h_w w efekcie zmniejszenia się liczby miejsc wiążących dostępnych dla znacznika spinowego 4ITCTO. Aldehyd glutarowy tworzy wiązania sieciujące poprzez reakcję z grupami ϵ -



RYS. 2. Widma EPR znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-TEMPO związanego z tkankami: natywną (NAT) i usieciowanymi za pomocą $Al_2(SO_4)_3$, preparatu ALUSAL oraz GA.

FIG. 2. EPR spectra of the spin label 4-Isothiocyanato-TEMPO attached to the tissues: native (NAT) and cross-linked using $Al_2(SO_4)_3$, ALUSAL preparation and GA.



RYS.1. Widmo EPR znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-TEMPO związanego z tkanką; h_s i h_w - składowe widma odpowiadające znacznikowi wykazującemu odpowiednio małą i dużą ruchliwość.

FIG.1. EPR spectrum of the spin label 4-Isothiocyanato-TEMPO attached to the tissue; h_s and h_w - spectrum-components related to the label indicating low and great mobility, respectively.

4ITCTO incorporated to the porcine pericardium tissues: native and modified by GA or Al^{3+} ions (arising from the sulphate salt or the ALUSAL preparation) permitted evaluation the power of the label binding with the tissue components.

The result of presented investigations show that spin label 4ITCTO is a good marker of structural and dynamic changes taking place in tissues containing the collagen and the elastin. Values of the h_w/h_s ratio calculated from EPR spectra of 4ITCTO radical attached to the tissue treated with: $Al_2(SO_4)_3$ ($h_w/h_s=0,5+0,1$), ALUSAL ($h_w/h_s=5+1$) or GA ($h_w/h_s=4+1$), are essentially lower as compared with the native tissue ($h_w/h_s=14+2$). It points to essential changes in structure of modified tissues. Both aluminium ions and glutaraldehyde cause cross-linking of the collagen. However mechanisms of these processes are different. In case of glutaraldehyde, the decrease in the h_w/h_s ratio is chiefly due to decrease in h_w value, as a result of decrease in number of binding sites accessible for the spin label 4ITCTO. The glutaraldehyde forms cross-linking bonds through the reaction with the ϵ -amino groups of hydroxylysine and lysine in the collagen, and 4ITCTO forms bonds with the lysine [12]. The blocking by GA of the part of ϵ -amino groups in the collagen reveals by the counted ratio decrease.

The aluminium ions stabilize the collagen, and probably also the elastin, through formation in the protein structure of very stable, covalent cross-linking bonds between Al^{3+} and carboxyl groups. It means that the h_w/h_s ratio decrease is not caused by lack of the amino acid rests accessible for the spin label. Probably in this case, the shape of 4ITCTO the EPR spectrum being the superimposed EPR signals of the spin label molecules attached to the collagen and the elastin [12] reflects changes in the rotary correlation time of ϵ -amino groups of these proteins. Cross-linking of the collagen and elastin causes the stiffness enlargement in their structure. This influences the motility of the spin label 4ITCTO attached to suitable amino acids of the tissue proteins. Additional cross-linking bonds make difficult movements of the main collagen chain. It leads to decrease in the motility, thus in elongation of the rotary correlation time of the radical attached with ϵ -amino groups of the lysine in collagen. As a result, changes in the EPR spectra shape are observed: the broadening of three narrow lines and the EPR spectrum shape similar to this attributed to the radical attached with the elastin. This effect is especially visible in

aminowymi hydroksylizyny i lizyny kolagenu, a 4ITCTO tworzy wiązania z lizyną [12]. Zablockowanie przez GA części grup ϵ -aminowych w kolagenie objawia się zmniejszeniem wartości obliczanego ilorazu.

Jony glinu stabilizują kolagen, a prawdopodobnie także elastynę, poprzez wytworzenie w strukturze białka bardzo trwałych sieciujących wiązań koordynacyjnych między Al^{3+} i grupami karboksylowymi. Oznacza to, że zmniejszenie ilorazu hw/hs nie jest spowodowane niedostatkami reszt aminokwasowych dostępnych dla znacznika spinowego. Prawdopodobnie w tym przypadku kształt widma EPR znacznika spinowego 4ITCTO, będącego superpozycją widm EPR znacznika związanego z kolagenem i elastyną [12], odzwierciedla zmiany czasu korelacji rotacyjnej grup ϵ -aminowych tych białek. Sieciowanie kolagenu i elastyny powoduje zwiększenie sztywności ich struktury. Wpływa to na ruchliwość znacznika spinowego 4ITCTO związanego z odpowiednimi aminokwasami białek tkankowych. Dodatkowe wiązania sieciujące utrudniają ruchy łańcucha głównego kolagenu. Prowadzi to do zmniejszenia ruchliwości, czyli wydłużenia czasu korelacji rotacyjnej rodnika związanego z ϵ -aminowymi grupami lizyny kolagenu. Skutkiem są zmiany kształtu widma EPR znacznika spinowego: poszerzenie trzech wąskich linii i przyjęcie kształtu zbliżonego do widma EPR rodnika związanego z elastyną. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w widmie tkanki osierdzia traktowanej $Al_2(SO_4)_3$ i w mniejszym stopniu - preparatem ALUSAL (RYS.2). Składowa reprezentująca rodnik o krótkim czasie korelacji rotacyjnej (duża ruchliwość; trzy wąskie linie) jest bardzo słaba. Jednocześnie obserwuje się poszerzenie całego widma EPR znacznika spinowego związanego z tkanką. Wskazuje to na usztywnienie struktury wewnętrznej modyfikowanej tkanki.

Wniosek

Traktowanie tkanki osierdzia świni jonami glinu (pochodzącymi zarówno z siarczanu glinu(III), jak i z preparatu leczniczego ALUSAL) prowadzi do zwiększenia sztywności struktury wewnętrznej tkanki. Ujawniają to zmiany kształtu widma EPR znacznika spinowego 4-izotocyjaniano-TEMPO (4ITCTO) związanego z tkanką. Jakkolwiek efekt stabilizacji tkanki jonami Al^{3+} jest podobny do uzyskanego z użyciem aldehydu glutarowego, jednak mechanizmy obu procesów sieciowania białek tkankowych są różne.

Podziękowania

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych i Śląską Akademię Medyczną; granty: NN-1-228/05 i NN-2-366/05. Pomiar EPR prowadzono w Katedrze Fizyki Medycznej ŚAM, kierowanej przez dr hab. Barbarę Piławę, prof. ŚAM.

spectrum of the pericardium tissue treated with $Al_2(SO_4)_3$ and in the smaller less degree - with a preparation ALUSAL (FIG.2). The component representing the radical indicating the short rotary correlation time (large motility; three narrow lines) is very weak. Simultaneously we observed broadening of whole EPR spectrum EPR of the spin label attached with the tissue. It points to stiffening of internal structure of the modified tissue.

Conclusion

The treatment of the porcine pericardium tissue with aluminium ions (originating both from the aluminium sulphate, as well as from the therapeutic preparation ALUSAL) leads to enlargement of stiffness of the tissue internal structure. It is visible by the shape changes in the EPR spectra of spin label 4- Isothiocyanato-TEMPO (4ITCTO) attached with the tissue. Although result of the tissue stabilization by Al^{3+} ions is similar to those obtained using the glutaraldehyde, but mechanisms of both processes of the tissue proteins cross-linking are different.

Acknowledgements

This work was financially supported by Committee for Scientific Research (KBN) and Medical University of Silesia; grants: NN-1-228/05 i NN-2-366/05. EPR-measurements have been carried out in Department of Medical Physics (Medical University of Silesia) headed by prof. Barbara Piława.

Piśmiennictwo

References

- [1] Zejc A. Chemia leków. PZWL, Warszawa, 1999.
- [2] Ostrowski K. Histologia. PZWL, Warszawa, 1995.
- [3] Nimni M.E. (Ed.) Collagen. Volume I. Biochemistry. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 2000.
- [4] Stryer L. Biochemia, PWN, Warszawa, 2003.
- [5] Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 1998, 45: 113-136.
- [6] Khor E. Methods of the treatment of collagenous tissue for bio-prostheses. Biomaterials, 1997, 18: 95-105.
- [7] Lasek W. Kolagen. WNT, Warszawa, 1978.
- [8] Gwoździński K., Bartosz G. Synteza i właściwości nitroksylowych znaczników spinowych oraz ich zastosowanie w badaniach biologicznych. Zagadnienia Biofizyki Współczesnej, 1978, 3: 45-100.
- [9] Berliner L.J. Spin labeling. Theory and applications. Acad. Press, New York-San Francisco-London, 1976.
- [10] Middleton D.A., Reid D.G., Watts A. The conformations of a functional spin-labelled derivative of gastric H/K-ATPase investigated by EPR spectroscopy. Biochemistry, 1995, 34: 7420-7429.
- [11] Surewicz K.W. Metody interpretacji widm EPR znakowanych spinowo biał biologicznych. Zagadnienia Biofizyki Współczesnej, 1978, 3: 21-44.
- [12] Cwalina B., Dul L. Porcine pericardium crosslinking-effects investigated by EPR spectroscopy - spin labeling method. Engineering of Biomaterials, 2002, 23-25: 61-64.