

ZASTOSOWANIE EPR - METODY ZNACZNIKÓW SPINOWYCH DO BADANIA WPŁYWU JONÓW ŻELAZA I CHROMU NA STRUKTURĘ TKANKI OSIERDZIA ŚWINI

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL, MARIA JASTRZEBSKA

KATEDRA BIOFIZYKI, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA,
OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC

Streszczenie

Badano zmiany struktury tkanek osierdzia świni, poddanych działaniu soli chromu i żelaza: szczawianu chromowo(III)-potasowego, siarczanu żelaza(II) i siarczanu żelaza(III), z zastosowaniem spektroskopii EPR - metody znaczników spinowych (znacznik spinowy: 4-izotiocyjaniano-Tempo; ITCTO). Wykazano, że tkanka osierdzia świni ulega modyfikacji pod wpływem jonów Cr(III), Fe(II) oraz Fe(III). Na podstawie badań makroskopowych oraz wyników badań EPR stwierdzono, że spośród zastosowanych substancji chemicznych, najbardziej efektywnym odczynnikiem sieciującym był siarczan żelaza (III). Ponadto wyniki badań EPR - metody znaczników spinowych sugerują, że szczawian chromowo(III)-potasowy modyfikuje tkankę osierdzia na innej drodze, niż związki żelaza. Wyjaśnienie tego mechanizmu wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: tkanka, osierdzie świńskie, sieciowanie, jony żelaza i chromu, EPR, znakowanie spinowe.

Wprowadzenie

Sieciowanie jest efektywną metodą modyfikacji materiałów kolagenowych, w tym tkanek bogatych w kolagen [1, 2]. Proces ten powoduje zwiększenie odporności tkanek na trawienie enzymatyczne, uzyskanie optymalnych właściwości mechanicznych (bio)materiału, a także zadowalającej zgodności biologicznej [2, 3]. Do modyfikacji materiałów tkankowych wykorzystuje się najczęściej aldehyd glutarowy [4]. Wiązania sieciujące w kolagenie mogą powstawać także w wyniku reakcji tego białka z jonami metali przejściowych, takimi jak Cr(III) i Fe(III). Reakcje te prowadzą do wytworzenia w strukturze kolagenu bardzo trwałych, sieciujących wiązań koordynacyjnych między jodem metalu i grupami karboksylowymi cząsteczek białka. Efekty te są wykorzystywane w procesach garbowania skór [5].

Celem tej pracy było badanie zmian struktury tkanek osierdzia świni, poddanych działaniu soli chromu i żelaza: szczawianu chromowo(III) potasowego, siarczanu żelaza(II) i siarczanu żelaza(III), z zastosowaniem spektroskopii EPR - metody znaczników spinowych [6].

THE USE OF EPR - SPIN LABELING METHOD FOR INVESTIGATION THE INFLUENCE OF IRON AND CHROMIUM IONS ON THE STRUCTURE OF PORCINE PERICARDIUM TISSUE

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL, MARIA JASTRZEBSKA

DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC

Abstract

Investigated were changes in the structure of porcine pericardium tissues treated with the chromium and ferro-salts: chromium(III)-potassium oxalate, ferro(II) sulphate and ferro(III) sulphate, using the EPR spectroscopy - spin labeling method (spin label: 4-isothiocyanato-Tempo; ITCTO). It has been demonstrated that the porcine pericardium tissue undergoes modification under the action of Cr(III), Fe(II) and Fe(III) ions. Based on the macroscopic examinations and results of EPR studies one ascertained that from among used chemical substances, the most effective crosslinking reagent was the ferro(III) sulphate. Besides, results of the EPR investigations - spin labeling method suggest that the chromium(III)-potassium oxalate modifies the pericardium tissue on other way, than the ferro compounds. Explanation of this mechanism requires further researches.

Key words: tissue, porcine pericardium, crosslinking, ferro and chromium ions, EPR, spin labeling.

Introduction

Crosslinking is an effective method of the modification of collagenous materials, including the collagen-rich tissues [1, 2]. This process causes an increase in the tissues resistance to enzymatic digestion, the obtainment of optimal mechanical properties and also satisfactory biocompatibility [2, 3]. Glutaraldehyde is the substance most often used for modification of tissue materials [4]. Cross-links in the collagen may also be a result of this protein reaction with transition metal ions such as Cr(III) and Fe(III). These reaction leads to producing in the collagen structure of very stable, crosslinking coordinate bonds between the metal ion and carboxylic groups in proteins molecules. These effects are used in processes of the leathers tanning [5].

The aim of this work was to investigate changes in the porcine pericardium tissues treated with the chromium and ferro salts: chromium(III)-potassium oxalate, ferro(II) sulphate and ferro(III) sulphate, with the use of the EPR spectroscopy - spin labeling method [6].

Badano tkanki osierdzia świni pobrane w rzeźni bezpośrednio po uboju zwierząt. Tkanki umieszczano w pojemniku ze schłodzonym roztworem solanki buforowanej fosforanami (PBS; phosphate buffered saline, pH 6,5) i transportowano do Katedry Biofizyki w Sosnowcu, gdzie ostrożnie je oczyszczano i usuwano tłuszcz oraz wszelkiego rodzaju zgrubienia. Następnie tkanki cięto na kawałki, które umieszczano w probówkach z roztworami (w PBS) soli zawierających jony: Fe(II) - 0,5% roztwór siarczanu żelaza(II), Fe(III) - 0,5% roztwór siarczanu żelaza(III) i Cr(III) - 1,5% roztwór szczawianu chromowo(III)-potasowego. Po 0,5 h lub 2 h inkubacji tkanek z jonami metali, przeprowadzono badania z użyciem spektrometru EPR [6-8]. Próbkę tkanek natywnych i modyfikowanych zalewano roztworem znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-Tempo (ITCTO) i inkubowano w 4°C przez 24 h. Po tym czasie nadmiar znacznika odmywano 10-krotnie, stosując wirowanie (6000 obr/min). Pomiędzy każdym wirowaniem próbkę płukano roztworem PBS. Następnie materiał umieszczano w kapilarze o średnicy 1mm i wykonywano pomiary z użyciem spektrometru EPR firmy Radiopan-Poznań. Widma próbek rejestrowano za pomocą spektrometru EPR typ SE/X 2542, z rezonatorem cylindrycznym TM_{110} . 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

Makroskopowe badania tkanek natywnych i modyfikowanych jonami metali wykazały różnice w ich strukturze. Stwierdzono charakterystyczne pogrubienie tkanek i zwiększenie ich twardości, będące efektem procesu sieciowania.

Otrzymane wyniki pokazują zróżnicowany wpływ wybranych jonów metali przejściowych, tj. Fe(II), Fe(III) oraz Cr(III), na proces modyfikacji tkanki osierdzia świni (FIG. 1).

Inkubacja tkanki osierdzia ze szczawianem chromowo(III)-potasowym spowodowała zmiany w widmach EPR znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-Tempo związanego z grupami ε-aminowymi lizyny kolagenu tkankowego. Dla tkanek modyfikowanych, stosunek S/W uległ zmniejszeniu w porównaniu z tkankami natywnymi.

Podobny efekt stwierdzono w przypadku tkanek modyfikowanych za pomocą siarczanu żelaza(II). Obserwowane nieznaczne zmniejszenie składowej S w porównaniu do W może wskazywać na większą zwartość włókien kolagenowych, a tym samym mniejszą swobodę ruchu cząsteczek tropokolagenu. Prawdopodobnie może to wpływać także na oddziaływania innych grup funkcyjnych tego białka. Nie obserwowano przy tym wyraźnych zmian cech zewnętrznych tkanek poddanych modyfikacji za pomocą siarczanu żelaza(II).

Wyraźne zmiany tych cech stwierdzono natomiast po zastosowaniu siarczanu żelaza(III) do modyfikacji tkanki osierdzia świni. Powierzchnia tkanki stała się szklista. Zwiększyła się również twardość tkanki i jej wytrzymałość na cięcie. Obserwowane zmiany morfologiczne modyfikowanej tkanki odzwierciedlały się w zmianach widm EPR znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-Tempo (ITCTO) związanego z tą tkanką (RYS.1). Spektra EPR znacznika ITCTO związanego z tkanką inkubowaną w roztworze siarczanu żelaza(III) bardzo wyraźnie różnią się od widm uzyskanych dla tkanki natywnej. Intensywność wąskiej linii niskopolo-

Investigated were porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. Tissues were placed in the container with cooled solution of the phosphate buffered saline (PBS; pH 6,5) and transported to the Department of Biophysics in Sosnowiec, where they were cleaned carefully and the fat and heavy vasculatures were removed. Then the tissues were cut on pieces, which have been placed in test-tubes with the solutions (in PBS) of salts containing ions: Fe(II) - 0,5% solution of ferro(II) sulphate, Fe(III) - 0,5% solution of ferro(III) sulphate and Cr(III) - 1,5% solution of the chromium(III)-potassium oxalate. After 0,5 h or 2 h of the tissues incubation with metal ions, investigations have been carried out using the EPR-spectrometer [6-8]. Native and modified samples have been flooded with solution of spin label 4-isothiocyanato-Tempo and incubated 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 TM_{110} 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

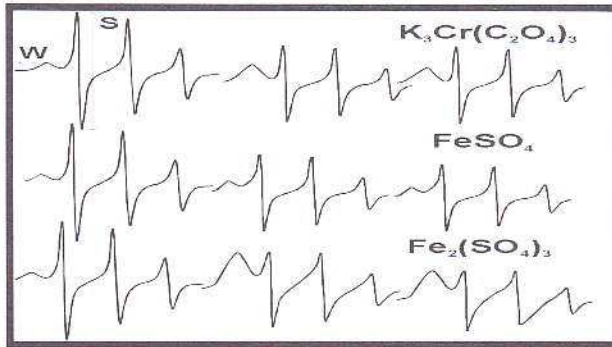
Macroscopic studies of tissues native and modified with metal ions showed differences in their structure. One ascertained characteristic thickening of tissues and the increase of their hardness, being the effect of the crosslinking process.

Obtained results show the diverse influence of chosen transition metal ions, i.e. Fe(II), Fe(III) and Cr(III), on the process of the porcine pericardium tissue modification (FIG. 1).

The pericardial tissue incubation with the chromium(III)-potassium oxalate caused changes in EPR- spectra of the spin label 4 -isothiocyanato-Tempo connected with ε-amino groups of the lysine in tissue collagen. For modified tissues, the S/W ratio was decreased as compared with the native tissues.

Similar effect was ascertained in the case of tissues modified by means of ferro(II) sulphate. Observed slight diminution of the S-component as compared with W may point to the greater compactness of collagenous fibers, and consequently the less freedom of tropocollagen-particles movement. Probably it may influence also on interactions of other functional groups of this protein. They were not observed changes in the external features of tissues underwent modification with ferro(II) sulphate.

Distinct changes in these features were observed after using of ferro(III) sulphate for the porcine pericardium tissue modification. The tissue surface became glassy. The tissue hardness and its endurance on the cut were higher. Observed morphological changes of modified tissue were reflected by changes in the EPR-spectra of the spin label 4 -isothiocyanato-Tempo (ITCTO) connected with this tissue (FIG. 1). The EPR-spectra of ITCTO connected with the tissue incubated in solution of ferro(III) sulphate were very different from spectra obtained for native tissue. Intensity of



RYS. 1. Widma EPR znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-Tempo związanego z próbkami natywnymi (N) i usieciowanymi za pomocą siarczanu żelaza(II), siarczanu żelaza(III) i szczawianu chromowo(III) potasowego, w czasie 0,5 h lub 2 h; W i S - składowe widma odpowiadające znacznikowi o odpowiednio małej i dużej ruchliwości.

FIG. 1. EPR spectra of the spin label 4-isothiocyanato-Tempo connected with native samples (N) and samples cross-linked with ferro(II) sulfate, ferro(III) sulfate and chromium(III)-potassium oxalate, during 0,5 h or 2 h; W and S - spectrum-components related to the low and great-mobility label, respectively.

wiej S jest znacznie większa, niż składowej W, - w porównaniu z tkanką niemodyfikowaną, a stosunek S/W uległ istotnemu zmniejszeniu.

Ponieważ rodnik nitroksylowy ITCTO wiąże się z grupami ϵ -aminowymi lizyny [6], natomiast siarczany żelaza(III) powoduje sieciowanie tkanki w wyniku reakcji jonu metalu z grupami karboksylowymi kolagenu [5] (i być może innych białek), mniejsza intensywność składowej S nie może być interpretowana jako skutek zmniejszenia liczby ϵ -aminowych grup lizyny. Obserwowane efekty mogą być skutkiem sieciowania kolagenu oraz innych białek posiadających aktywne grupy COOH, czego następstwem była zmiana struktury przestrzennej zarówno cząsteczek kolagenu, jak i całej tkanki. Mogło to spowodować zmniejszenie ruchliwości znacznika spinowego, który uległ związaniu ze zmodyfikowaną tkanką osierdzia świni.

Podsumowanie

W rezultacie przeprowadzonych badań wykazano, że tkanka osierdzia świni ulega modyfikacji pod wpływem jonów Cr(III), Fe(II) oraz Fe(III). Na podstawie badań makroskopowych oraz wyników badań EPR stwierdzono, że spośród zastosowanych substancji modyfikujących strukturę tkanki, największą efektywność sieciowania wykazuje siarczan żelaza (III).

Ponadto wyniki badań EPR - metody znaczników spinowych sugerują, że szczawian chromowo(III)-potasowy modyfikuje tkankę osierdzia świni na innej drodze, niż związki żelaza, jednak wyjaśnienie tego mechanizmu wymaga dalszych badań.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną. Pomiary EPR prowadzono w Katedrze Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji ŚAM, kierowanej przez Prof. Tadeusza Wilczoka.

the narrow low-field line S is considerably greater than of the line W - as compared with non-modified tissue, and the S/W ratio was essentially decreased.

As the nitroxyl radical ITCTO forms bonds with ϵ -amino groups of the lysine [6], whereas the ferro(III) sulphate causes the tissue crosslinking as a result of the metal ion reaction with carboxylic groups of the collagen [5] (and probably also with other proteins), the less intensity of the S component should not be interpreted as a result of the lysine ϵ -amino groups diminution. Observed effects can be result of crosslinking of collagen and other proteins possessing active COOH- groups, followed by changes in spatial structure both particles of the collagen and all the tissue. This might cause decrease in the mobility of spin label connected with the modified porcine pericardium tissue.

Summary

As a result of investigations carried out, it has been showed that the porcine pericardium tissue undergoes modification under the action of selected metal ions: Cr(III), Fe(II) and Fe(III). Based on the macroscopic examinations and results of EPR-investigations, it was ascertained that from among substances used for the tissue modification, the highest crosslinking efficiency showed the ferro (III) sulphate.

Besides, results of the EPR investigations - method of spin labeling suggest that the chromium(III)-potassium oxalate modifies the porcine pericardium tissue on other way, than the ferro compounds. Explanation of this mechanism requires further researches.

Acknowledgements

This work was financially supported by Medical University of Silesia. EPR-measurements have been carried out in Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy (Medical University of Silesia) headed by Prof. Tadeusz Wilczok.

Piśmiennictwo

References

- [1] Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 1998; 45:113-136.
- [2] Khor E. Method for the treatments of collagenous tissue for bio-prostheses. Biomaterials, 1997; 18: 95-105.
- [3] Sung HW, Chang Y, Chiu CT, Chen CN, Liang HC. Crosslinking characteristics and mechanical properties of bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. J. Biomed. Mater. Res. 1999; 47: 116-126.
- [4] Cheung D.T., Perelman N., Ko E. C., Nimni M.E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. III. Reaction with collagen in tissues. Connect Tissue. Res. 1985; 13:109-115.
- [5] Lasek W. Kolagen. Chemia i wykorzystanie. Wydawnictwo Naukowe - Techniczne, Warszawa 1978.
- [6] Cwalina B., Dul L. Porcine pericardium crosslinking-effects investigated by EPR spectroscopy - spin labeling method. Engineering of Biomaterials. 2002; 23-25: 57-61.
- [7] Berliner L.J. Spin labeling. Theory and applications. Acad. Press, New York-San Francisco-London, 1976 (tłum. ros. 1979)
- [8] Surewicz K.W. Metody interpretacji widm EPR znakowanych spinowo błon biologicznych. Zagadnienia Biofizyki Współczesnej. 1978; 3:21-44.