

НОВЫЕ ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

537.634

**МАГНИТНЫЙ ЗАХВАТ ОДИНОЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
КЛЕТОК И МОДЕЛЬНЫХ АГРЕГАТОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН****А. Н. Шалыгин, К. А. Кротов**

(Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова)

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	83
1. Схема эксперимента. Расчетные соотношения	84
2. Магнитный захват клеток	86
3. Магнитная восприимчивость эритроцитов человека	91
3.1. Магнитная восприимчивость внутриклеточного оксигемоглобина. 3.2. Кислород-обменные процессы в эритроцитах. 3.3. Магнитная восприимчивость внутриклеточного метгемоглобина. 3.4. Использование эритроцитов в качестве пробных тел.	
4. Магнитные свойства бислойных липидных мембран	97
4.1. Магнитная восприимчивость липидного бислоя. 4.2. Магнитный захват цилиндрических липосом и анизотропия магнитной восприимчивости липидного бислоя.	
Заключение	101
Примечания к тексту	103
Список литературы	103

Введение. Изучение индивидуальных магнитных свойств функционирующих биологических клеток, клеточных фрагментов и органелл, а также их модельных аналогов типа бислойных агрегатов лиотропных мезофаз, представляется весьма нужным и интересным [1, 2]. Интерес этот обусловлен естественным стремлением к расширению области физических исследований на заведомо неравновесный объект, чье состояние во многом определяется не только такими параметрами как температура и давление, но и составом и состоянием необходимой для его функционирования окружающей буферной среды. Немаловажным условием продвижения в этом направлении является выбор или искусственное создание простейшего объекта, умение измерять его свойства, в частности и магнитные, без нарушения целостности объекта и его внутренних связей. К этому можно добавить, что понимание опережающих и интенсивно развивающихся исследований по влиянию магнитных полей на клетки, ткани и организмы невозможно без знания материальных констант молекулярных и надмолекулярных структур клетки, в частности их статических и динамических магнитных восприимчивостей [3].

Известные способы экспериментального исследования магнитных свойств вещества, такие как магнитные весы Фарадея или, развитая в последнее время, сверхчувствительная СКВИД-магнитометрия не могут быть использованы для измерений столь малых магнитных моментов, как индуцированный внешним с магнитным полем момент отдельной изолированной немагнитной микрочастицы объемом 10^{-10} см³, какой

является биологическая клетка. Исследования магнитных свойств биологических микрообъектов предъявляют ряд требований к технике и методике измерений. Так, исследуемый объект требует для поддержания своего функционального состояния и соответствующего проявления своих специфических свойств определенного окружения — буферной среды, магнитная восприимчивость которой близка к восприимчивости самого объекта. Кроме того, часто необходимо выделить вклад от какой-либо части объекта, составляющей несколько процентов от его массы или объема.

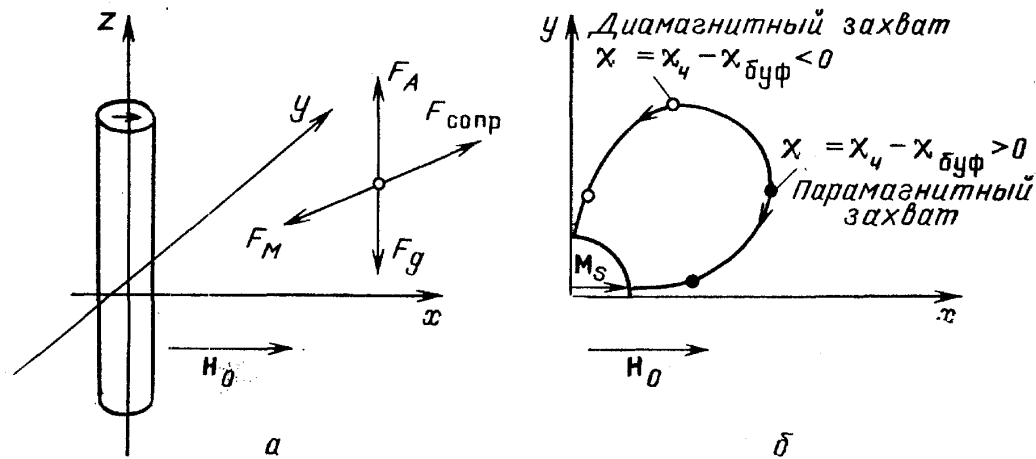


Рис. 1. Схематическое изображение проволочки и частицы в эксперименте по магнитному захвату (а); проекции траекторий движения частиц в плоскости (x, y) при диамагнитном захвате (б) и парамагнитном захвате (б)

Чрезвычайно высокой чувствительностью, достаточной для измерений магнитной восприимчивости одиночных клеток с индуцированным магнитным моментом любого знака относительно среды порядка 10^4 — 10^5 магнетонов Бора в поле $1 \text{ кэ}^{(1)}$, обладает техника, использующая сильно неоднородные поля рассеяния, возникающие вблизи поверхности тонкой магнитной проволочки при ее поперечном намагничивании. В этих экспериментах исследуют параметры движения клетки, обусловленного взаимодействием индуцированного внешним полем магнитного момента клетки с полем рассеяния от поперечно намагниченной тем же полем тонкой магнитной проволочки (рис. 1, а). При этом существенным оказываются величина и знак разности $\chi = \chi_ч - \chi_{буф}$ между магнитными восприимчивостями частицы $\chi_ч$ и буферной среды $\chi_{буф}$. Так для частиц с $\chi > 0$ наблюдается явление парамагнитного захвата — притяжение частиц в область наибольшей напряженности поля вблизи поверхности проволочки, а для частиц с $\chi < 0$ наблюдается диамагнитный захват — притяжение частиц (более диамагнитных, чем среда) в область наименьшей напряженности поля у поверхности проволочки (рис. 1, б). Высокая чувствительность при этих измерениях обусловлена значительным увеличением произведения $H \text{ grad } H$ за счет использования тонких проволочек, диаметр которых сравним с диаметром исследуемых клеток или частиц, а также компенсационным характером измерения: магнитный захват — единственный из известных в практике магнитных измерений компенсационный способ; восприимчивость объекта здесь определяется по отношению к восприимчивости буферной среды, которая считается определенной заранее и, как правило, имеет одинаковый или близкий порядок величины с восприимчивостью исследуемой частицы.

1. Схема эксперимента. Расчетные соотношения. Схема эксперимента по магнитному захвату клеток представлена на рис. 1, а, из которого

видно, что интересующие нас проекции траекторий частиц лежат в плоскости (x, y) , перпендикулярной оси проволоочки и силе тяжести. Движение частицы в этой плоскости определено действием пондеромоторной силы, уравновешенной (в пренебрежении инерциального вклада) силой сопротивления, которая при небольших скоростях движения клеток может быть представлена формулой Стокса.

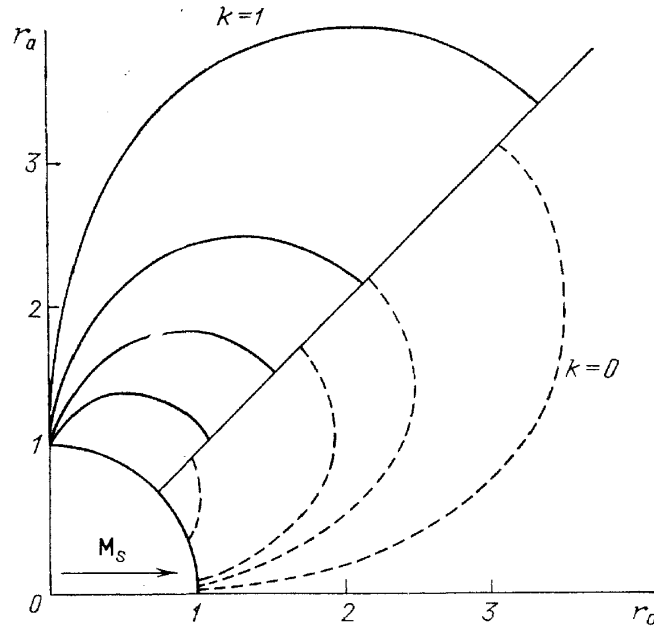


Рис. 2. Семейства траекторий магнитного захвата точечных частиц для случаев $k=1$ (а) и $k=0$ (б)

Уравнение движения однородной сферической частицы радиуса R ($R \ll a$, a — радиус проволоочки) в координатах r, φ с учетом магнитных потенциалов, удовлетворяющих уравнению Лапласа, имеют вид [4, 5]

$$\begin{aligned} \dot{r}_a &= \frac{V_M}{a} \left(\frac{k}{r_a^5} + \frac{\cos 2\varphi}{r_a^3} \right), \\ r_a \dot{\varphi} &= \frac{V_M \sin 2\varphi}{a r_a^5}, \end{aligned} \tag{1}$$

где $r_a = r/a$, $V_M = \chi V M_s H_0 / 6\pi\eta a R_{\text{eff}}$, $k = M_s / 2H_0$, M_s — индукция насыщения материала проволоочки, η — вязкость буфера, V — объем частицы, H_0 — напряженность внешнего магнитного поля, R_{eff} — эффективный гидродинамический радиус частицы.

Семейство траекторий получается (рис. 2) посредством интегрирования системы уравнений (1)

$$r_a^2 = c \sin 2(\varphi - \alpha), \tag{2}$$

где

$$\begin{aligned} c &= (r_{a1}^4 + 2kr_{a1}^2 \cos 2\varphi_1 + k^2)^{1/2} (\sin 2\varphi_1)^{-1}, \\ \text{tg } 2\alpha &= \frac{k \sin 2\varphi_1}{r_{a1}^2 + k \cos 2\varphi_1}, \quad \sin 2\varphi_1 \neq 0; \end{aligned}$$

r_{a1}, φ_1 — начальные координаты частицы. При $\sin 2\varphi_1 = 0$ частица движется по одной из «прямых» траекторий — вдоль одной из осей x или y . Форма траекторий и характер магнитного захвата определяются величиной параметра $k = M_s / 2H_0$. На рис. 2 представлены семейства траекторий

для $k=1$ и $k=0$. Как видно, характер траекторий двух предельных случаев сильно отличается — при $k=1$ семейство исходит из одной точки $\pi/2$, а при $k=0$ симметрично располагается относительно $\pi/4$. При $k=1$, т. е. в слабых, но намагничивающих проволочку до насыщения полях

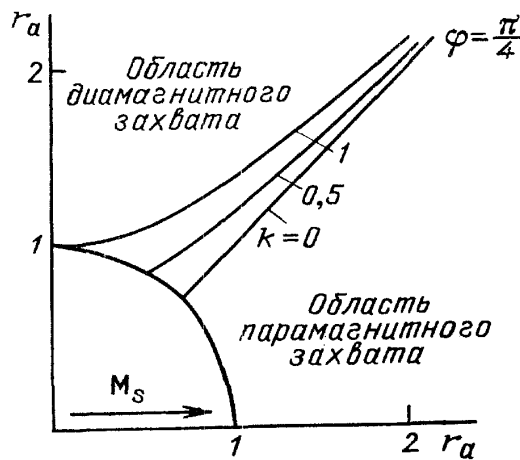


Рис. 3. Зависимость критических углов $\varphi_{кр}(r_a)$ при различных значениях параметра $k = M_s/2H_0$ [7]

лов $\varphi_{кр}$, при которых радиальная компонента, действующей на частицу силы

$$F_{Mr} = -\frac{\chi VM_s a^2}{r^3} \left(H_0 \cos 2\varphi + \frac{M_s a^2}{2r^2} \right), \quad (3)$$

$$F_{M\varphi} = \chi VM_s a^2 H_0 \sin 2\varphi r^{-3}$$

меняет знак, т. е. при

$$\varphi_{кр} = \arctg \left[\frac{1 + (k/r_a^2)}{1 - (k/r_a^2)} \right]^{1/2}. \quad (4)$$

На рис. 3 представлена зависимость $\varphi_{кр}(r_a)$ при различных k [7]. В области $0 < \varphi < \varphi_{кр}$ следует ожидать притяжения частиц с $\chi > 0$ и выталкивания с $\chi < 0$, а в области $\varphi_{кр} < \varphi < \pi/2$, наоборот, притяжение с $\chi < 0$ и выталкивание с $\chi > 0$.

Выражение для χ получается интегрированием (1) по траектории на интервале $[r_{a1}, \varphi_1; r_{a2}, \varphi_2]$; r_{a2}, φ_2 — конечные координаты частицы:

$$\chi = \frac{3\pi\eta R_{eff} a^2}{H_0 M_s V} \frac{F(r_{a1}, r_{a2}, \varphi_1, \varphi_2, k)}{t}, \quad (5)$$

где t — время прохождения частицей указанного отрезка траектории ($t < 0$), а

$$F(r_{a1}, r_{a2}, \varphi_1, \varphi_2, k) = 2c^2 \left[\sin(\varphi_1 + \varphi_2 - 4\alpha) \times \right. \\ \left. \times \sin(\varphi_1 - \varphi_2) + \frac{1}{2} \sin^2 2\alpha \cdot \ln \frac{\operatorname{tg} \varphi_1}{\operatorname{tg} \varphi_2} \right] \quad (6)$$

при $\sin 2\varphi_1 \neq 0$ и для «прямых» траекторий, т. е. при $\sin 2\varphi_1 = 0$

$$F(r_{a1}, r_{a2}, k) = \mp \frac{1}{2} (r_{a1}^4 - r_{a2}^4) \mp k (r_{a1}^2 - r_{a2}^2) + k^2 \ln \frac{k \pm r_{a1}^2}{k \pm r_{a2}^2}. \quad (7)$$

2. Магнитный захват клеток. Семейство траекторий (2) и расчетные соотношения (5) получены для частицы с $R \ll a$ в приближении обтека-

H_0 , область диамагнитного захвата на поверхности проволочки, к которой притягиваются частицы с $\chi < 0$, вырождается в линию вдоль образующей, соответствующую $\varphi = \pi/2$. При этом почти вся поверхность проволочки представляет собой область захвата парамагнитных частиц, для которых $\chi > 0$. С ростом H_0 зона диамагнитного захвата на поверхности проволочки увеличивается и в предельно большом поле стремится сравняться с зоной парамагнитного захвата ($k=0$) (2).

Разделение пространства вокруг проволочки на области магнитных захватов разных знаков, определяется значениями критических уг-

ния невязким потоком. Возможность их использования для определения клеток изучалась в основном на красных клетках крови — эритроцитах человека. Эритроциты — легко доступные безъядерные клетки крови [8]. дискоидного типа, диаметром ~8 мкм, однородные по составу (содержат ~71% воды и ~28% гемоглобина (Hb)) и, что немало важно, могут иметь на порядок отличающуюся по величине и знаку [9, 10] восприимчивость относительно буфера, которая однозначно определяется состоянием содержащегося в них гемоглобина и, в случае его основных форм, легко может контролироваться спектрофотометрически.

Наблюдение и регистрацию параметров траекторий движения клеток вблизи поверхности поперечно намагниченной проволоочки при магнитном захвате проводят в герметичных кюветах объемом несколько десятых мл. (см., например, [11, 12, 13]). Кювету с закрепленной в ней проволоочкой помещают на предметном столике микроскопа между полюсными наконечниками электромагнита так, чтобы обеспечить указанное на рис. 1 расположение проволоочки, частицы и направление намагничивающего поля H_0 (3).

Луч подсветки, распространяясь вдоль оси проволоочки (рис. 4), передает изображение поперечного сечения проволоочки и находящихся в поле зрения микроскопа клеток на видикон видеокамеры, сопряженной с видеоманитофоном. Движение клеток при магнитном захвате фиксируется посредством видеозаписи, обработка которой позволяет определить начальную и конечную координаты частицы и время ее движения между ними. На рис. 5 представлены типичные траектории диамагнитного захвата эритроцитов, содержащих ~99% оксигемоглобина и парамагнитного захвата эритроцитов, содержащих дезокси- и метгемоглобин [14]. Там же штриховой линией даны подогнанные под эксперимент траектории, рассчитанные согласно (2) с учетом реальных параметров эксперимента. Как видно из рисунка наилучшее согласие наблюдается для клеток двигавшихся при захвате по «прямым» или близким к ним траекториям.

Как следует из (5), отношение F/t с точностью до постоянного коэффициента определяет магнитную восприимчивость частицы относительно среды. Величина этого коэффициента зависит от отношения R_{eff}/V , которая в случае клеток является эффективной из-за локальных искажений формы, наличия поверхностного заряда и ионной оболочки, а так же вследствие неабсолютной упругости и гладкости мембраны клетки, проявляющихся при ее движении в жидкости. Что касается эритроцитов, то их недостатком как модельных клеточных частиц является отсутствие сферической симметрии формы клетки и чрезмерная эластичность, что сказывается на точности определения R_{eff}/V . Однако ввиду дискоидной формы при седиментации и магнитном захвате в сильно разбавленной суспензии эритроцит движется в плоскости своего диска. Определение отношения R_{eff}/V проводят обычно в отдельных экспериментах, например, по оседанию клеток в поле сил тяжести.

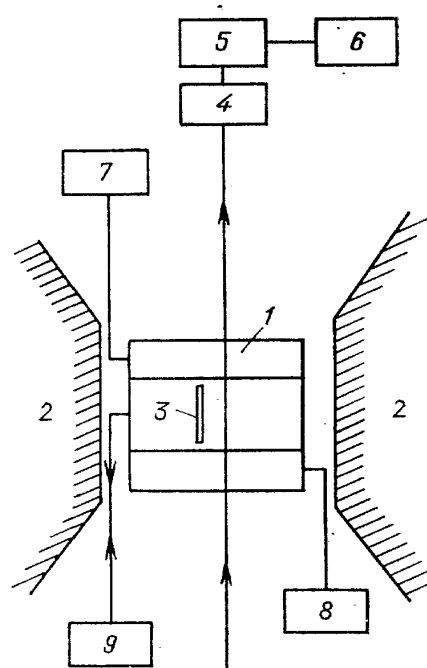


Рис. 4. Схема экспериментальной установки для наблюдения и регистрации траекторий магнитного захвата. 1 — термостатируемая кювета, 2 — полюсные наконечники электромагнита, 3 — тонкая магнитная проволоочка, 4 — видеокамера, 5 — видеоманитофон, 6 — телемонитор, 7 — термостат, 8 — термопара, 9 — перистальтический насос

Таким образом, с точностью до отношения R_{eff}/V распределение клеток по F/t соответствует их распределению по магнитной восприимчивости. Определение отношения F/t клетки проводят следующим образом. Траекторию магнитного захвата частицы разбивают на отрезки. Для каждого отрезка определяют координаты начала и конца и время прохождения его частицей, после чего строят зависимость $F(t)$. Типичный вид

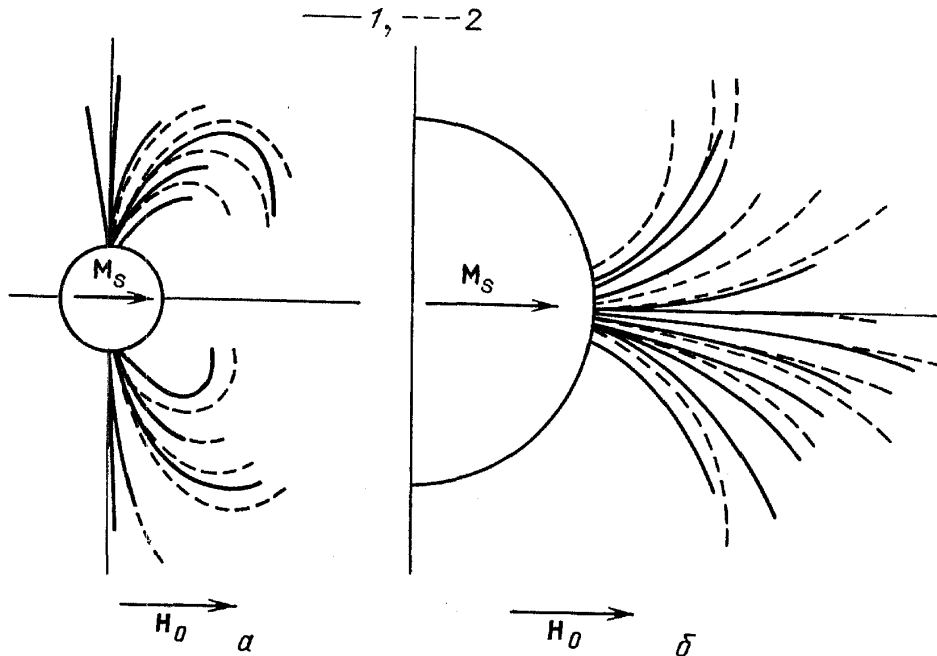


Рис. 5. Экспериментальные (1) и расчетные (2) траектории клеток при диамагнитном захвате ($a=10$ мкм, $k=0,18$) (а) и при парамагнитном захвате ($a=55$ мкм, $k=0,23$) (б) [14]

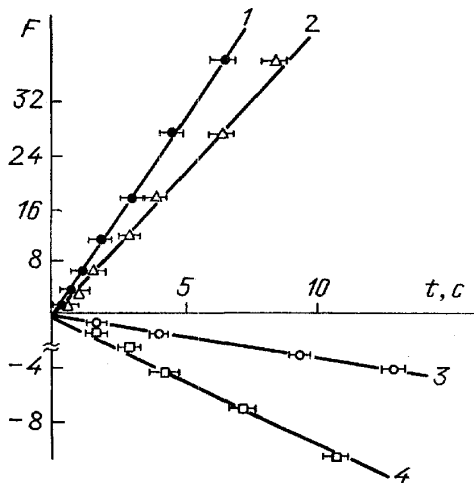


Рис. 6. Примеры зависимостей $F(t)$ для эритроцитов, содержащих метгемоглобин (1), деоксигемоглобин (2), оксигемоглобин (3) и лимфоцитов человека (4) [13]

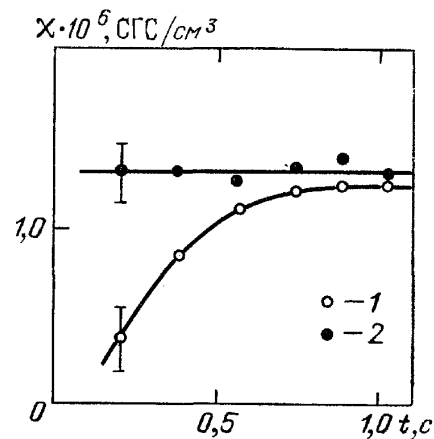


Рис. 7. Относительная магнитная восприимчивость эритроцита в зависимости от расстояния его до проволоки (измеренная в различные моменты времени магнитного захвата), рассчитанная по данным захвата без учета (1) и с учетом (2), тормозящего действия поверхности проволоки [12]

таких зависимостей, полученных при магнитном захвате эритроцитов, содержащих гемоглобин основных форм, а также лимфоцитов человека при их движении по «прямым» или близким к ним траекториям, представлен на рис. 6. Как видно из рисунка, F линейно изменяется со вре-

менем, что находится в согласии с (5) и позволяет использовать это обстоятельство для определения χ клеток.

Отклонение от линейной зависимости $F(t)$ наблюдается либо вдали от проволоочки при больших радиусах захвата, что обусловлено неопределенностью в установлении времени прохождения частицей удаленных отрезков траекторий [13], либо в непосредственной близости к проволоочке [11, 12], за счет торможения, обусловленного несжимаемостью жидкости. В последнем случае в силу Стоксова сопротивления возможно введение корректирующего параметра λ [15], «компенсирующего» тормозящее действие стенки (рис. 7):

$$\lambda = \frac{4}{3} \operatorname{sh} \alpha \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+1)}{(2n-1)(2n-3)} \left\{ \frac{2 \operatorname{sh} (2n+1) \alpha + (2n+1) \operatorname{sh} 2\alpha}{4 \operatorname{sh}^2 [n+(1/2)] \alpha - (2n+1) \operatorname{sh}^2 \alpha} - 1 \right\},$$

$$\alpha = \operatorname{arcch} \frac{r-a}{R}. \quad (8)$$

Отклонения от линейной зависимости $F(t)$ наблюдались также и для тех клеток, для которых наблюдалась худшая подгонка расчетных

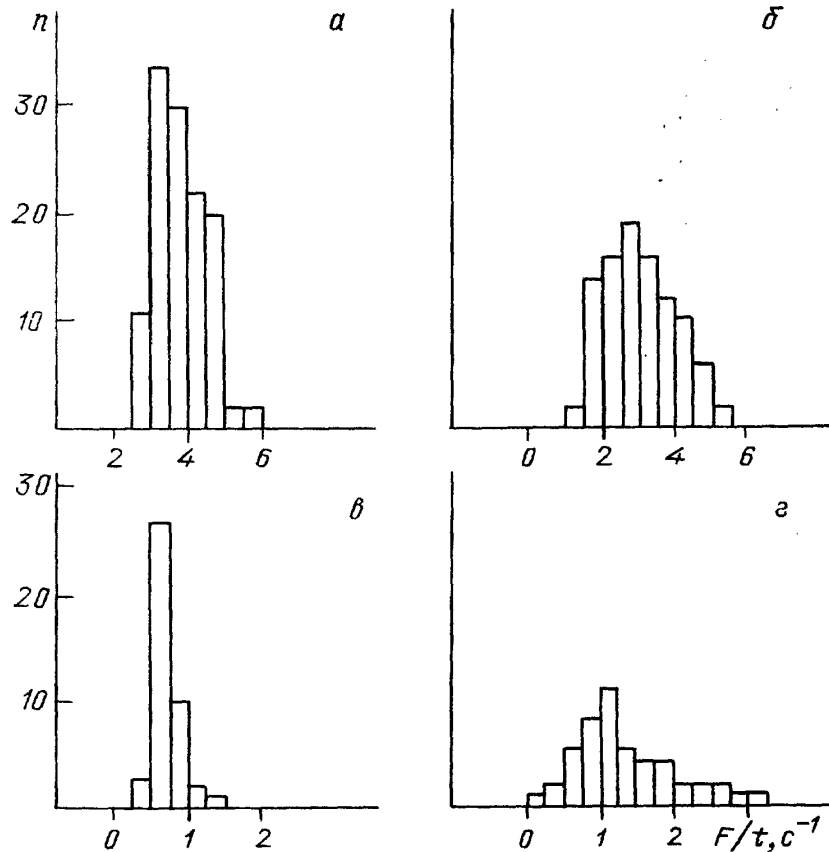


Рис. 8. Типичные гистограммы величин $F(t)$ эритроцитов, содержащих метгемоглобин (а), деоксигемоглобин (б), оксигемоглобин (в), и лимфоцитов (г) [13]

траекторий к экспериментально наблюдаемым (см. рис. 5), т. е. для клеток, двигавшихся по «кривым» траекториям, причем тем большее отклонение, чем большей кривизной обладала траектория движения клетки. Оба обстоятельства, возможно, связаны с необходимостью учета вязкостных поправок и конечных размеров клеток, проявляющихся при их движении по «кривым» траекториям.

Учет конечных размеров частиц, имеющих форму диска и двигающихся по прямым траекториям, ведет к незначительным поправкам, про-

являющимся у поверхности проволоочки и для частиц с $R = 5$ мкм у проволоочек с $\phi 20$ мкм оказывается меньше ошибки измерения параметров захвата [13].

Анализ траекторий эритроцитов при захвате показал [13], что клетки, проходящие через одну и ту же точку координатной плоскости (r, φ) , далее, до момента захвата, двигаются по одной и той же траектории независимо от магнитной восприимчивости клетки. Это позволяет считать, что различие во времени прохождения близкими по размеру клетками одного и того же отрезка траектории обусловлено различной величиной их магнитной восприимчивости.

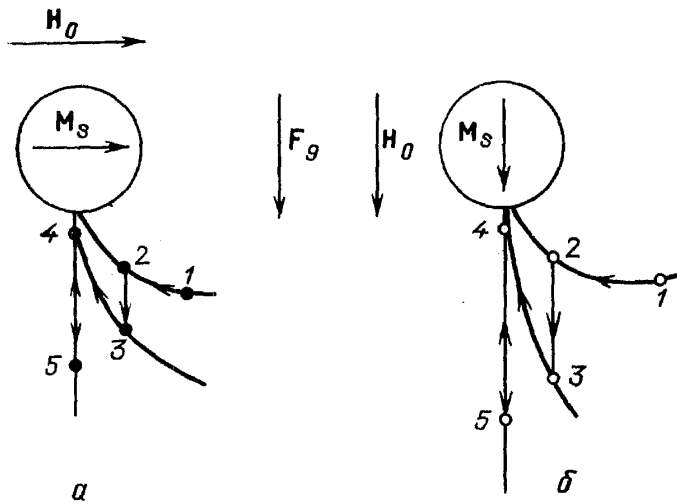


Рис. 9. Взаимное расположение проволоочки, частицы и направления намагничивающего поля H_0 в эксперименте по магнитному захвату, позволяющее производить многократные измерения магнитного захвата отдельной клетки с диамагнитной (а) и парамагнитной (б) восприимчивостью относительно буферной среды

Магнитная восприимчивость исследуемой группы клеток определяется с помощью вероятных значений скоростей их оседания и величин F/t , определяемых из соответствующих гистограмм, полученных из данных наблюдений «прямых» или близких к ним траекторий магнитного захвата клеток. Примеры гистограмм величин F/t эритроцитов, содержащих гемоглобин основных форм, приведены на рис. 8 [13]. Положение максимумов гистограмм и их форма отражают однородность состава каждой исследованной группы эритроцитов и позволяют определить величины их средней магнитной восприимчивости. Значение F/t весьма чувствительно к содержанию в клетках различных примесей. Так, при тех же, что и на рис. 8 условиях эксперимента, разница расчетного времени прохождения идеализированной клеткой, содержащей весь гемоглобин в оксиформе, и такой же клеткой с примесью 0,5% метгемоглобина (4) одинакового отрезка траектории при захвате, равного диаметру клетки, составляет $\sim 2,5$ с [17]. На том же рисунке представлена гистограмма распределения F/t лимфоцитов человека, подтверждающая чрезвычайно широкий спектр магнитных свойств этих клеток [18]. При исследовании клеток с малым индуцированным магнитным моментом, как например, оксигенированные эритроциты или свежесыведенные лимфоциты человека необходимо добиваться наибольшей чувствительности по моменту. Величина $\text{grad } H$, определяющая действующую на частицу силу, ограничена кривизной источника градиентного поля, которая должна несколько превышать размер исследуемой клетки, с тем чтобы ее дрейф при захвате составлял по крайней мере несколько ее диаметров (обычно 3–5), необходимых для измерения F/t . Таким образом, чувствительность по моменту при заданной индукции насыщения материала проволоочки, диаметр которой выбран, исходя из размеров клетки, определяется только величиной внешнего магнитного поля. Наименьшая измеренная величина момента составила $\sim 10^5$ магнетонов. Бора в поле 1 кЭ у оксигенированных эритроцитов человека [14].

При необходимости многократных измерений магнитного захвата одной и той же клетки следует использовать несколько иное взаимное расположение проволоочки по отношению к направлению намагничивающего поля и силе тяжести. Схема такого эксперимента будет также различаться ориентацией намагничивающего поля по отношению к направлению силы тяжести для клеток с разным знаком восприимчивости по отношению к буферу (рис. 9). Поскольку плотность клеток слегка превышает плотность буфера (плотность эритроцитов $1,096 \text{ г/см}^3$), то для схем, представленных на рис. 9, и клеток с любым знаком χ , манипулируя включением и выключением магнитного поля (не допуская захвата клетки) можно сцентрировать ее движение вдоль вертикальной оси. В дальнейшем можно проводить многократные измерения вертикальных перемещений выбранной клетки при захвате, измеряя при включении поля параметры захвата, а при выключении — величину эффективного гидродинамического радиуса. В уравнение движения частицы при этом следует ввести силу тяжести, что приведет к тому, что выражения для χ клетки не будут иметь аналитического вида и будут определяться путем простых численных расчетов, также зависящих от начальных и конечных координат клетки при захвате и времени прохождения между ними.

3. Магнитная восприимчивость эритроцитов человека. В исследованиях магнитного захвата, лежащего в основе высокоградиентной магнитной сепарации [19, 20] можно отметить несколько моментов использования эритроцитов как модельных клеточных систем:

— для изучения возможности магнитного разделения биологических клеток с помощью высокоградиентных магнитных фильтров [21—23],

— для экспериментальной проверки разрабатываемых представлений ВГМ сепарации [24],

— для обработки этих представлений в частном случае остановленного потока как способа измерения магнитной восприимчивости биологических клеток [10, 11] и, наконец,

— для исследований магнитных свойств конкретных одиночных клеток без нарушения их целостности и условий функционирования. Последнее проиллюстрируем примерами исследований магнитных свойств эритроцитов человека, проведенных нами.

Эритроциты считаются сравнительно простыми клетками. Основная их функция — перенос кислорода к тканям организма, которую они выполняют с помощью гемоглобина (5). Активными центрами молекулы Hb являются четыре атома железа, обеспечивающие кооперативный характер связывания Hb с кислородом. В стереохимической модели гемоглобина [26] основой кооперативного связывания Hb с кислородом является взаимосвязь четвертичной структуры белка и спинового состояния гемового железа. Магнитная восприимчивость всегда служила средством исследования свойств гемоглобинов в растворах. Поэтому исследования магнитных свойств отдельных эритроцитов, содержащегося в них гемоглобина и его производных, чье состояние обусловлено спиновым состоянием железа, его изменением при обмене лигандами, а также изменением условий функционирования белка представляют как самостоятельный интерес, так и в сравнении со свойствами растворов гемоглобина.

3.1. Магнитная восприимчивость внутриклеточного оксигемоглобина. Измерения магнитной восприимчивости растворов гемоглобина [27] показали, что оксигемоглобин (окси Hb) диамагнитен и эффективный момент комплекса гемового железа с кислородом равен нулю. Существует несколько моделей [28—30], объясняющих диамагнетизм HbO₂. Некоторое предпочтение отдается модели [30], в

сти клетки. Полагая, что эритроцит содержит раствор гемоглобина с концентрацией c_c^{Hb} из соотношения

$$6\pi v_s \eta R_{eff} = g (\rho_{Hb} - \rho_{буф}) c_c^{Hb} \quad (10)$$

при неизменном количестве внутриклеточного Hb, т. е. $c_c^{Hb} \cdot V$ видно, что величина $1/v_s \eta$, где v_s — скорость седиментации клетки, пропорциональна R_{eff} . На рис. 11 представлена зависимость $1/v_s \eta$ той же разбавленной суспензии клеток от температуры. На этой зависимости также в областях 7—12; 20—25 и 35—37 °C видны особенности оседания эритроцитов, которые коррелируют с особенностями их магнитного захвата: построенная по (5) из данных рисунков 10 и 11 магнитная восприимчивость внутриклеточного Hb относительно буфера (рис. 12) имеет уже монотонный характер от температуры. Особенности, наблюдаемые на зависимостях $1/(v_s \eta)$ и F/t от температуры, обусловлены, по-видимому, особенностями термотропных свойств эритроцитарных мембран [36], приводящих к изменениям R_{eff} клеток.

Не останавливаясь, однако, на обсуждении этих особенностей, отметим чувствительность к ним магнитного захвата, что оказывается существенным при исследовании модельных аналогов биологических мембран (см. ниже).

Магнитная восприимчивость внутриклеточного Hb, как оказалось, практически не зависит от температуры в области 2—30 °C и составляет $\chi = -(0,774 \pm 0,005) \cdot 10^{-6}$ СГС/см³. Близкие результаты получены и другими авторами как при исследовании клеток [35, 37], так и растворов [33, 34]. Выше 35 °C наблюдается резкое увеличение восприимчивости Hb (см. рис. 12) [38]. Измерения, выполненные после барботирования суспензии кислородом в течении 30 мин при 45 °C, показали, что возрастание восприимчивости обусловлено изменением парциального давления растворенного кислорода с увеличением температуры и термической деоксигенацией Hb, приводящим к сдвигу равновесия присоединения кислорода к Hb в сторону исходных реагентов. Обратимость восприимчивости при многократных изменениях температуры от 20 до 40 °C характеризует термическую деоксигенацию, а наличие гистерезиса — метгемоглобинезацию, т. е. необратимость окисления Hb с переходом Fe²⁺ в Fe³⁺.

Высокая чувствительность магнитного захвата, превышающая чувствительность спектрофотометрических методов при измерении растворов, позволяет исследовать устойчивость эритроцитов от времени и при различных условиях функционирования. Так, при инкубировании эритроцитов в течение трех часов в буфере с pH от 6,0 до 9,5 при 20 °C показало, что изменение восприимчивости клеток соответствует накоплению ими за это время менее 1 % мет Hb.

Высокая чувствительность магнитного захвата, превышающая чувствительность спектрофотометрических методов при измерении растворов, позволяет исследовать устойчивость эритроцитов от времени и при различных условиях функционирования. Так, при инкубировании эритроцитов в течение трех часов в буфере с pH от 6,0 до 9,5 при 20 °C показало, что изменение восприимчивости клеток соответствует накоплению ими за это время менее 1 % мет Hb.

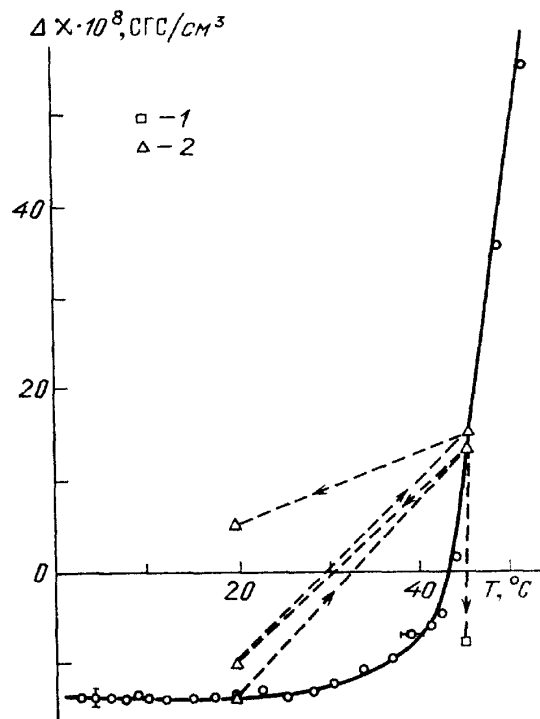


Рис. 12. Температурная зависимость магнитной восприимчивости внутриклеточного окси-Hb—O (pH ~ 7,4). 1 — изменение восприимчивости после барботирования кислородом в течение 30 мин при 45 °C, 2 — изменение восприимчивости при изменениях температуры в направлениях, указанных стрелками [38]

3.2. Кислород-обменные процессы в эритроцитах. Методом магнитного захвата можно изучать кислород-обменные процессы на отдельных клетках, измеряя их магнитофоретическую подвижность в зависимости от парциального давления кислорода в суспензии. Зависимость восприимчивости отдельных эритроцитов относительно буфера от времени диффузии кислорода через газопроницаемую мембрану при обдувании измерительной ячейки аргоном представлена на

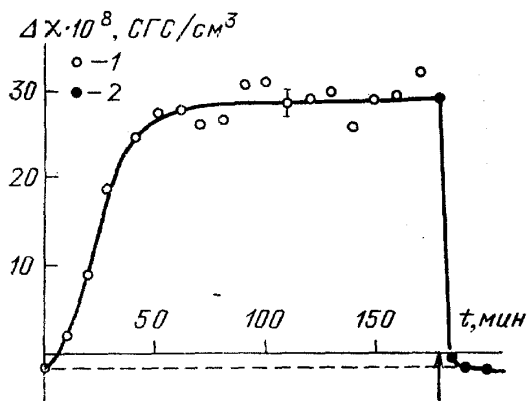


Рис. 13. Восприимчивость отдельных эритроцитов относительно буфера (25°C , $\text{pH} \sim 7,4$) от времени диффузии кислорода через газопроницаемую мембрану. 1 — диффузия кислорода из суспензии при обдувании ячейки аргоном, 2 — диффузия в деоксигенированную суспензию при обдувании ячейки воздухом

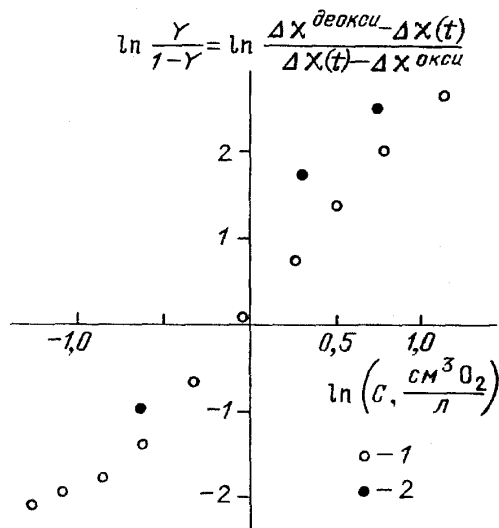


Рис. 14. График Хилла для диссоциации (1) и связывания (2) внутриклеточного гемоглобина с кислородом (25°C , $\text{pH} \sim 7,4$)

рис. 13 ($\text{pH} = 7,4$; 25°C). На том же рисунке дана зависимость восприимчивости клеток от времени диффузии кислорода в суспензию при обдувании ячейки воздухом ($P_{\text{O}_2} = 150$ мм рт.ст.). Представленные зависимости характеризуют изменение магнитной восприимчивости отдельных клеток при диссоциации и связывании внутриклеточного гемоглобина с кислородом. Из рисунка видно, что деоксигенация суспензии в течение ~ 1 часа приводит к «насыщению» восприимчивости, при которой внутриклеточный Нб полностью деоксигенируется. Тривжды проводимые диссоциация — связывание одной и той же суспензии в пределах точности дают одинаковые результаты восприимчивости, что указывает на отсутствие необратимых изменений, в частности, метгемоглобинезации.

Степень насыщения кислородом внутриклеточного Нб (Y) связана с магнитной восприимчивостью эритроцита относительно буфера χ , при условии аддитивного вклада в восприимчивость окси- и деоксигемоглобина, соотношением

$$Y = \frac{\chi - \chi_{\text{деокси-Нб}}}{\chi_{\text{окси-Нб}} - \chi_{\text{деокси-Нб}}}, \quad (11)$$

где $\chi_{\text{окси-Нб}}$ и $\chi_{\text{деокси-Нб}}$ — магнитные восприимчивости полностью оксигенированных и деоксигенированных клеток относительно буфера. Используя определяемую из эксперимента зависимость концентрации растворенного кислорода в области магнитного захвата от времени газообмена и зависимость на рис. 13, можно построить графики Хилла (см. рис. 14) для оксигенации и деоксигенации внутриклеточного Нб. Поскольку время измерений магнитного захвата ~ 10 с, а время связы-

вания и (освобождения) кислорода с гемом ~50 мс [39], то зависимости на рис. 13 имеют равновесный характер. Из данных, приведенных на рис. 14, видно, что сродство внутриклеточного Hb к кислороду P_{50} (парциальное давление кислорода, при котором насыщено 50% участков связывания) и параметр кооперативности Хилла n (характеризующий крутизну при $Y=0,5$) при уменьшении парциального давления кислорода в суспензии ($n=2,4$; $P_{50}=0,68 \text{ см}^3 \text{ O}_2/\text{л}$) отличаются от n и P_{50} при увеличении давления кислорода ($n=2,8$; $P_{50}=0,45 \text{ см}^3 \text{ O}_2/\text{л}$). Отмеченная необратимость кривых диссоциации и связывания, вероятно, обусловлена изменением проницаемости мембраны эритроцита при обмене кислородом [40].

3.3. Магнитная восприимчивость внутриклеточного метгемоглобина. Для некоторых Fe^{3+} -комплексов гемоглобина различие в энергиях высоко- и низкоспиновых состояний при комнатных температурах настолько мало, что между ними становятся возможны взаимные равновесные переходы. Измерения магнитной восприимчивости показали, что Fe^{3+} -ион имеет эффективный момент, равный $4,5 \mu_B$ при $\text{pH} \sim 9,5$ и $5,8 \mu_B$ при $\text{pH} \sim 7,0$. Эти значения являются промежуточными между значениями, найденными для высокоспинового Fe^{3+} в HbF ($5,9 \mu_B$) и низкоспинового — в HbCN ($2,3-2,5 \mu_B$) [41].

Анализ температурной зависимости магнитной восприимчивости Fe^{3+} иона в четвертичных R- и T-структурах (6) между 300 и 90 К показал [41], что при низких температурах (90–250 К) восприимчивость изменяется согласно закону Кюри и Fe^{3+} -ион остается в низкоспиновом состоянии. В области 200–250 К наблюдались заметные отклонения от закона Кюри, отражающие сдвиг равновесия в сторону образования высокоспиновых состояний.

При всех температурах магнитный момент в T структуре был выше, чем в R-структуре. При 0–30 °C магнитная восприимчивость отражает наличие, зависящего от температуры, спинового равновесия и может быть представлена в виде

$$\chi = \frac{1}{8T} \frac{k\mu_H^2 + \mu_L^2}{k + 1}, \tag{12}$$

где k — константа равновесия между высоко и низкоспиновыми состояниями, μ_H и μ_L — соответственно магнитные моменты этих состояний. Подгонка экспериментальных данных дает наилучшее согласие для χ согласно (12) при k , выраженном через энергию Гиббса (ΔG):

$$k = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right) \tag{13}$$

с эмпирически подобранными значениями ΔH и ΔS .

На рис. 15 представлена температурная зависимость молярной магнитной восприимчивости внутриклеточного нитритного мет Hb, получен-

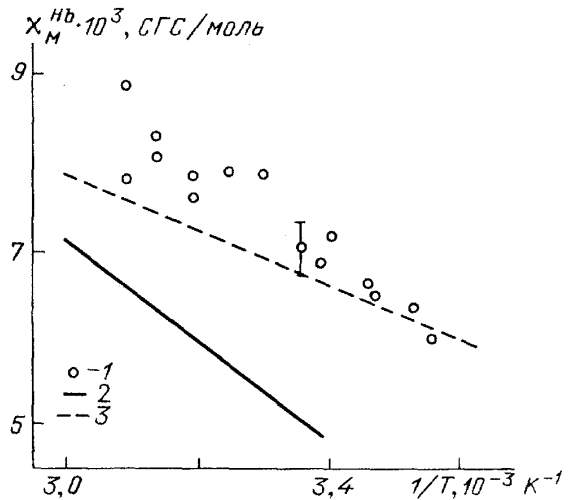


Рис. 15. Температурная зависимость молярной магнитной восприимчивости нитритного метгемоглобина. 1 — внутриклеточного, 2 — в растворе [41], 3 — расчетная зависимость по (12) и (13) при $\Delta H=5,9$ ккал/моль и $\Delta S=15$ ккал. град/моль

ная с помощью магнитного захвата отдельных эритроцитов. Для сравнения там же приведены результаты измерений χ_m , полученные на растворах нитритного мет Hb [41], удовлетворительно описываемые (12) и (13) с подгонными значениями энтальпии $\Delta H=2,6$ ккал/моль и энтропии $\Delta S=5,7$ ккал-град/моль. Как видно, восприимчивость нитритного мет Hb имеет тот же наклон, что и восприимчивость раствора, но несколько превышает ее по абсолютным значениям. Попытка описать поведение внутриклеточного метHb выражениями (12) и (13) дала наилучшее согласие при $\Delta H=5,9$ ккал/моль, $\Delta S=15$ ккал-град/моль (штриховая линия через экспериментальные точки), но с меньшей, чем экспе-

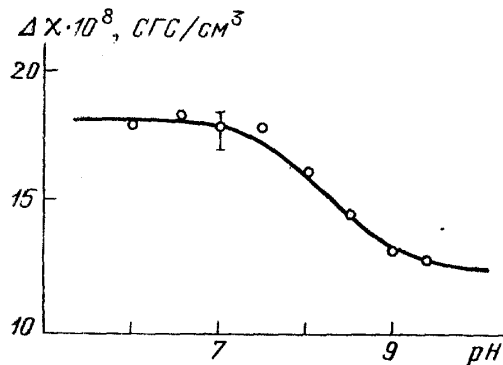


Рис. 16. Магнитная восприимчивость эритроцитов, содержащих нитритный метгемоглобин относительно буфера при различных pH (20 °C)

римент крутизной. Отмеченные количественные несоответствия между поведением $\chi(T)$ нитритного мет Hb в растворах и в клетках могут быть обусловлены чрезвычайно высокой чувствительностью Hb к действию окислителя (7), приводящему к изменению спинового состояния гемового железа [26]: при присоединенном Fe—ONO преобладает высокоспиновое состояние, а при Fe—NO₂—низкоспиновое. По-видимому, в клетках при повышении температуры равновесие смещается в сторону низкоспиновых состояний. Спиновое равновесие нитритного мет Hb в клетках наблюдается и при титровании. На рис. 16 приведена pH зависимость магнитной восприимчивости эритроцитов, содержащих нитритный мет Hb относительно буфера при 20°, полученная способом магнитного захвата. Увеличение восприимчивости при протонировании связано со стабилизацией высокоспиновой T-формы.

3.4. Использование эритроцитов в качестве пробных тел. Способом магнитного захвата восприимчивость частицы измеряется относительно восприимчивости буфера, которая считается известной. Возможно и обратное: измерение восприимчивости среды при

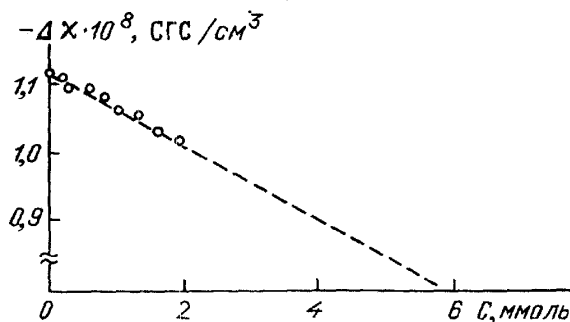


Рис. 17. Относительная магнитная восприимчивость оксигенированных эритроцитов в зависимости от концентрации оксигемоглобина в буферной среде

захвате частицы с известной восприимчивостью. Так, в [42] таким образом была измерена восприимчивость плазмы крови, а в качестве пробного тела использовался пузырек водорода. В качестве пробного тела с известными магнитными и гидродинамическими характеристиками мож-

но использовать и эритроцит. На рис. 17 приведена зависимость магнитной восприимчивости оксигенированных эритроцитов относительно буфера, содержащего разные концентрации окси Hb($c_{буф}^{Hb}$). Измерения проводились до концентрации меньших 2 мМ, поскольку при больших концентрациях наблюдались изменения формы клетки. Из (5) в предположении аддитивности вкладов получим, что восприимчивость клетки относительно буфера

$$\chi = (c_c^{Hb} - c_{буф}^{Hb}) (\chi_{Hb} - \chi_{буф}). \quad (14)$$

Точка пересечения экстраполированной зависимости с осью абсцисс соответствует концентрации гемоглобина в клетке, а тангенс угла наклона — величине магнитной восприимчивости оксиформы Hb.

4. Магнитные свойства бислойных липидных мембран.

4.1. Магнитная восприимчивость липидного бислоя. В системе липид — вода при малой концентрации липида самопроизвольно могут образовываться мультислойные сферические или цилиндрические агрегаты — липосомы (рис. 18). Каждый бислой — два

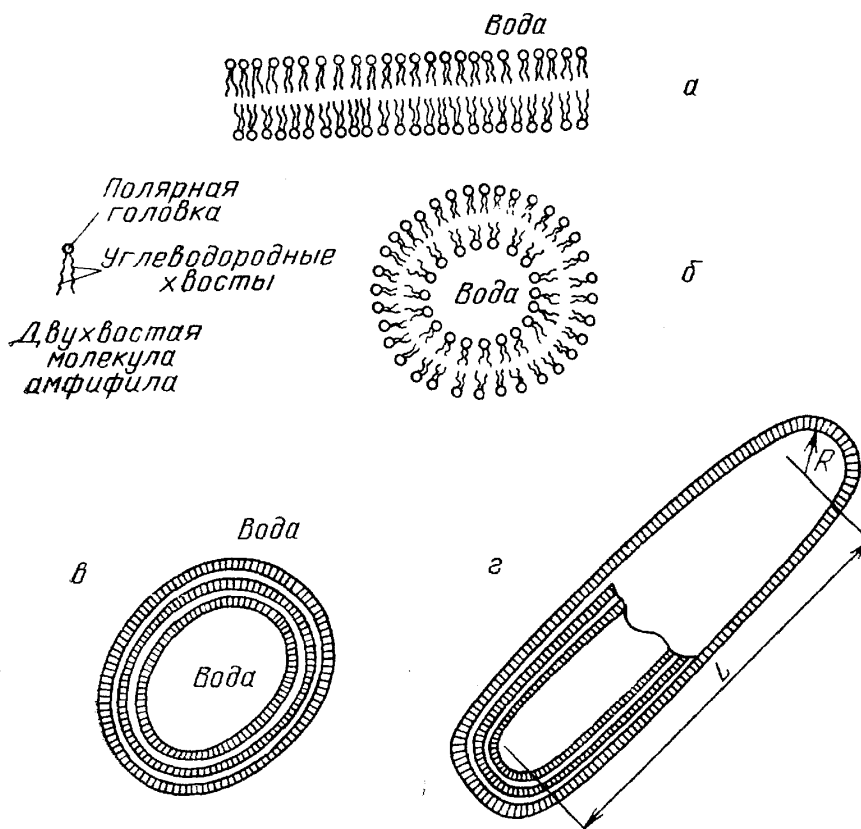


Рис. 18. Схематическое изображение бислойных агрегатов, образуемых фосфолипидами в водных средах: а — фрагмент ламеллярной структуры, б — однослойной и в — мультислойной сферических липосом, г — мультислойной цилиндрической везикулы. Показаны параметры формы цилиндрической везикулы, подлежащие измерениям

монослоя Гиббса амфифилов с обращенными друг к другу олеофильными «хвостами» в виде одной или двух углеводородных цепей [43]. Толщина бислоя ~ 50 Å. Такая бислойная пленка представляет собой простейшую искусственно созданную надмолекулярную структуру, и является моделью остова биологической мембраны. К настоящему времени имеется весьма скудная информация относительно магнитных свойств таких пленок [1, 2]. При измерении магнитной восприимчивости суспензии липосом собственно мембранную часть восприимчивости необходи-

мо выделять из общего сигнала, в котором липидная часть составляет величину порядка процента или нескольких процентов, если липид находится в ламеллярной фазе. По всей вероятности, именно по этой причине известные исследования выполнены при одной температуре—комнатной.

Высокая чувствительность магнитного захвата позволила осуществить измерения параметров захвата одиночных мультислойных сферических липосом из природного липида — яичного лецитина (ЯЛ) и оценить магнитную восприимчивость образованного этим липидом бислоя

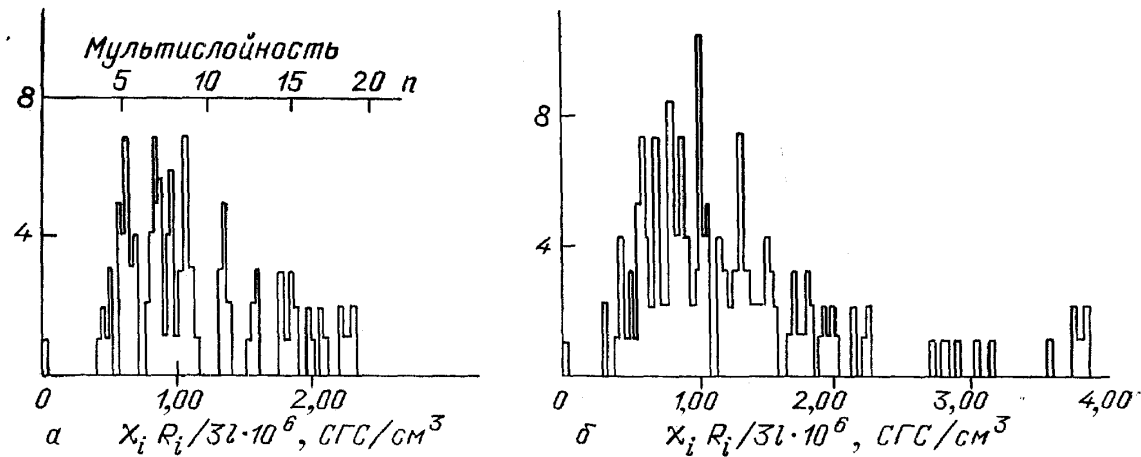


Рис. 19. Типичные гистограммы распределения липосом из ЯЛ (а) и ДПЛ (б) по величинам $\chi R_i / 3e$ [45]

[44]. В дальнейшем число исследованных таким образом липидов дополнилось синтетическим фосфолипидом — дипальмитоил лецитином (ДПЛ) и природным — липидом эритроцитарных мембран (ЛЭМ) [45, 46]. Компенсационный характер измерений при магнитном захвате позволяет определять восприимчивость непосредственно мембранной части везикулы, которая зависит от магнитных моментов образующих бислои липидов, их взаимного расположения, взаимодействия друг с другом внутри бислоя, между слоями и с окружающей их водой. Водная суспензия липосом содержит везикулы разного размера (радиусом ~3—4 мкм) с разным числом концентрических бислоев. Плотность липидов близка к плотности воды. Липидные везикулы практически не седиментируют, что существенно затрудняет определение величин их эффективного Стоксова радиуса — R_{eff} . Поэтому при расчете магнитной восприимчивости сферической липосомы относительно буфера по данным ее магнитного захвата по (5), значение R_{eff} липосомы считали равным значению ее геометрического радиуса, которое определяли посредством измерения радиуса на экране монитора (рис. 19).

Магнитная восприимчивость i -й липосомы χ_i относительно буфера связана с восприимчивостью среды $\chi_{\text{буф}}$ и липида $\chi_{\text{л}}$ очевидным соотношением

$$\chi_i = (\chi_{\text{л}} - \chi_{\text{буф}}) \frac{v_i}{V_i}, \quad (15)$$

где V_i — объем измеряемой i -й везикулы, v_i — объем липидной части в ней. Полагая, что липосома состоит из целого числа концентрических бислоев n одинаковой толщины l , при $nl \ll R_i$ ⁽⁸⁾ получим, что произведение для каждой i -й липосомы пропорционально числу бислоев в ней n_i , т. е.

$$\chi_i \frac{R_i}{3e} = n_i (\chi_{\text{л}} - \chi_{\text{буф}}). \quad (16)$$

Коэффициент пропорциональности равен магнитной восприимчивости бислоевой упаковки липидных молекул относительно буферной среды. Таким образом, экспериментально определяемые значения $\chi_i R_i / 3l$ исследуемых везикул должны совпадать с рядом дискретных значений $n_i (\chi_{л} - \chi_{буф})$ при целочисленных значениях n_i .

На рис. 19 представлены типичные гистограммы распределения липосом из ЯЛ и ДПЛ по величинам $\chi_i R_i / 3e$. На каждой гистограмме видно несколько максимумов. Обработка результатов измерений величин $\chi_i R_i / 3e$ большого числа липосом позволила найти такие средние значения коэффициентов пропорциональности $(\chi_{л} - \chi_{буф})$, для которых произведение $(\chi_{л} - \chi_{буф})$ наилучшим образом совпадало при целочисленных n_i с максимумами на гистограммах. Именно эти целочисленные значения трактовались как ламеллярность, т. е. как число концентрических бислоев в измеренных липосомах, а коэффициент пропорциональности $(\chi_{л} - \chi_{буф})$ — как относительная восприимчивость единицы объема бислоевой упаковки липидных молекул.

На гистограммах отсутствуют данные о распределении липосом с малым числом бислоев. В экспериментах наблюдались и медленно перемещающиеся везикулы, однако, времена магнитного захвата таких частиц определяются с большей ошибкой, поэтому их восприимчивость не определялась. Отсутствие максимумов, соответствующих липосомам с большим числом бислоев, обусловлено как дефектами, число которых нарастает с увеличением липида в липосоме (нарушение концентрической упаковки, включение сухого вещества липида и т. д.), так и нарушением условия $n_i l \ll R_i$.

На рис. 20 представлены измеренные таким образом магнитные восприимчивости бислоев ДПЛ и ЛЭМ, ЯЛ в зависимости от температуры. Каждая точка этих зависимостей — результат обработки соответствующей гистограммы распределения исследованных везикул по величинам $\chi_i R_i / 3l$, причем при определении χ_i по (5) учитывали изменение с температурой вязких свойств среды и не учитывали изменение ее магнитных свойств, так что каждое значение $\chi(T)$, приведенное на рис. 20, получено с учетом восприимчивости среды, которую считали не зависящей от температуры и равной восприимчивости чистой воды.

Как видно из рис. 20, *а* с понижением температуры наблюдается температурно-независимое поведение $\chi_{дпл}$ вплоть до температуры основного перехода из жидкокристаллического состояния в фазу геля при $T_c \sim 41^\circ\text{C}$. При этом наблюдалась смена знака магнитного захвата — ниже T_c липосомы становились более диамагнитными, чем буфер, и двигались к проволочке в область с максимальной редуцией магнитного поля около нее. Ниже T_c восприимчивость оказалась близкой к восприимчивости ДПЛ в кристаллическом состоянии [47]. Согласно [48] при затвердевании бислоя ДПЛ претерпевает переход в P_β -фазу, сопровождающийся уменьшением молекулярного объема примерно на 7%. Наблюдаемое же изменение восприимчивости ДПЛ при этом переходе (см. рис. 20, *а*) существенно больше и не может быть объяснено одним только изменением молекулярного объема, как это считали в [49], где данные по $\chi_{дпл}(T)$, полученные СКВИД-магнитометрией, приведены в относительных единицах.

Интересно поведение $\chi(T)$ бислоев ЛЭМ и ЯЛ, находящихся в жидкокристаллическом состоянии и полученные при повышении температуры суспензии (см. рис. 20, *б* и *в*). Температурные зависимости восприимчивости обоих природных бислоев имеют сходные, необычные по форме, ярко выраженные особенности при некоторых, свойственных для каждого из них, температурах. При исследовании восприимчивости ЛЭМ при охлаждении от 40°C , отмеченные при нагревании особенности не

наблюдались. К сожалению, изучение восстановления значений $\chi_{\text{ЛЭМ}}$ со временем не проводилось.

В настоящее время трудно каким-либо иным способом провести измерение восприимчивости липидного бислоя по измерениям водной суспензии липосом, содержащей менее 1% липида. Исходя из величины особенности $\chi(T)$ в ЯЛ при $\sim 41^\circ\text{C}$, можно ожидать разрешение этой

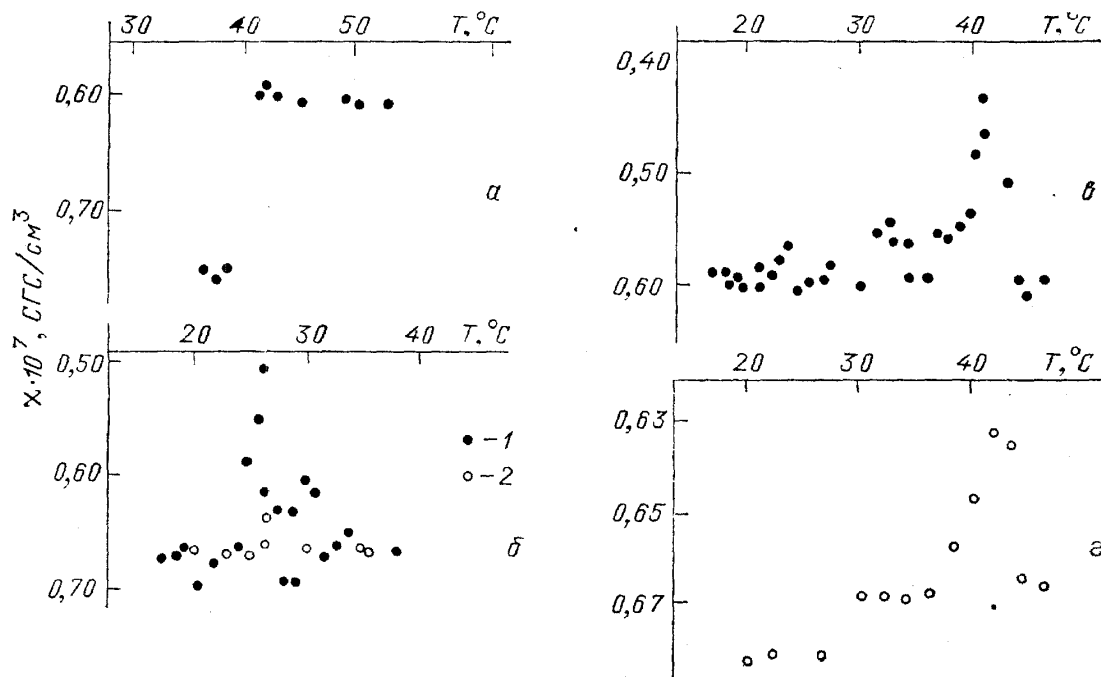


Рис. 20. Температурные зависимости магнитной восприимчивости бислоев. *а* — ДПЛ. *б* — ЛЭМ (1 — при нагревании, 2 — при охлаждении суспензии). *в* — ЯЛ, полученные методом магнитного захвата. *г* — то же 15% водной суспензии ЯЛ, полученной измерением на магнитных весах. Случаи рис. *в* и *г* получены при нагревании

особенности при исследовании 15% водной суспензии ЯЛ высокочувствительными магнитными весами Фарадея. Исследования такой суспензии, в которой как полагали ЯЛ находился в неупорядоченной ламеллярной фазе, были проведены. Результаты этих исследований представлены на рис. 20, *г*. Как видно, в области 30°C наблюдается небольшое изменение восприимчивости, которое коррелирует с изменением $\chi(T)$, полученной способом магнитного захвата. В области 40°C наблюдается особенность, сходная с особенностью, полученной с помощью магнитного захвата, по обе стороны от которой также не наблюдалось заметной разности в величинах χ . Измерения на весах показали, что в ЯЛ как и в ЛЭМ имеется температурная необратимость $\chi(T)$ — при понижении температуры от 45°C особенности не наблюдалось.

4.2. Магнитный захват цилиндрических липосом и анизотропия магнитной восприимчивости липидного бислоя. В [50] был предложен метод определения анизотропии магнитной восприимчивости бислоя в L_α фазе. Величина разности продольной χ_{\parallel} (вдоль директора) и поперечной χ_{\perp} (перпендикулярно директору) компонент тензора восприимчивости определялась из условия равенства магнитного момента механическому при повороте цилиндрических липосом в однородном магнитном поле H_0 :

$$(\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}) \delta_i = \frac{kT (\ln \operatorname{tg} \theta_0 - \ln \operatorname{tg} \theta_i)}{L_i R_i D_k H_0^2 t}; \quad (17)$$

здесь $\delta_i = l_{pi}$ толщина липидного слоя липосомы, θ_0 и θ_t — углы между направлениями поля и длинной осью цилиндра в момент включения поля и через время t соответственно, D_h — коэффициент вращательной диффузии, L_i — длина цилиндрической части, R_i — радиус замыкающей цилиндр полусферы.

Магнитный захват цилиндрических везикул так же позволяет определить величину анизотропии липидного бислоя $\chi_{||} - \chi_{\perp}$.

Процесс захвата цилиндрической везикулы начинается с фазы ее поворота в поле, который происходит гораздо быстрее собственно захвата частицы провололочкой. Регистрация параметров поворота и захвата такой частицы позволяет не только определить величину диамагнитной анизотропии $\chi_{||} - \chi_{\perp}$ бислоя, но и значительно упростить эту процедуру ввиду возможности независимого определения ламеллярности: число

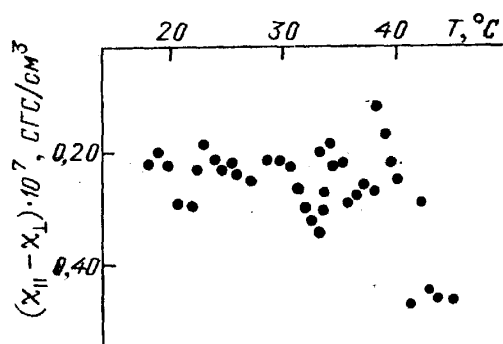


Рис. 21. Температурные зависимости анизотропии магнитной восприимчивости ($\chi_{||} - \chi_{\perp}$) бислоя ЯЛ, полученной при нагревании суспензии

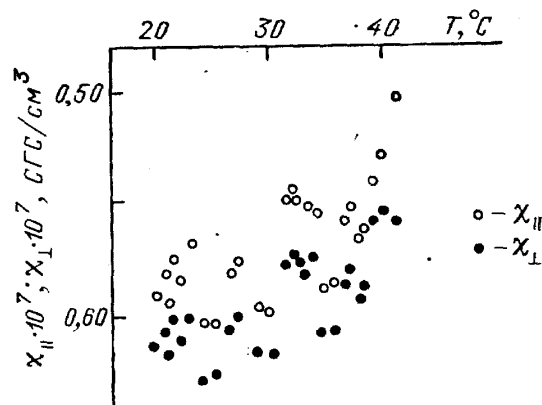


Рис. 22. Расчетные значения продольной $\chi_{||}$ и поперечной χ_{\perp} компонент тензора магнитной проницаемости бислоя ЯЛ в зависимости от температуры

бислоев n_i определяется из величины восприимчивости измеренной цилиндрической липосомы и восприимчивости бислоя, полученной ранее из измерения сферических везикул. Затем с помощью (17) и экспериментально определенных величин θ_0 , θ_t , D_h , L_i , R_i и t вычисляют значение разности $\chi_{||} - \chi_{\perp}$. Оба способа: и магнитный захват цилиндрических везикул и их поворот в однородном магнитном поле в пределах точности измерений дают одинаковый результат. На рис. 21 приведены результаты измерений температурной зависимости $\chi_{||} - \chi_{\perp}$ бислоя ЯЛ, полученные обоими методами. Эта зависимость, как видно, имеет особенности при тех же температурах, что и $\chi_{ЯЛ}(T)$. Из данных независимых измерений диамагнитной анизотропии $\chi_{||} - \chi_{\perp}$ и магнитной восприимчивости бислоя χ , которая для сферических везикул равна $(\chi_{||} + 2\chi_{\perp})/3$, можно оценить компоненты тензора диамагнитной восприимчивости, образующих бислой липидных молекул. Так, для ЯЛ, полученные из данных рис. 20, в и 21 компоненты тензора χ приведены на рис. 22. Можно видеть, что в области особенностей наблюдается одновременное уменьшение обеих компонент $\chi_{||}$ и χ_{\perp} , причем χ_{\perp} уменьшается сильнее. Отметим, что компоненты тензора χ в липидных системах определялись только для кристаллов ДПЛ при комнатной температуре [47] по повороту микрокристаллитов в однородном поле и по измерению их средней восприимчивости на вибрационном магнитометре.

Заключение. Магнитный захват относится к тем немногим способам, которые позволяют получать информацию от одиночной функционирующей клетки и искусственно созданного агрегата, моделирующего клеточную мембрану без нарушения их целостности. Высокая чувствитель-

ность и универсальность — возможность измерения как диа-, так и парамагнитных индуцированных моментов, а также относительная простота интерпретации трансляционного перемещения микрочастицы при ее магнитном захвате, выгодно отличают этот способ исследований. Однако, несмотря на определенную уникальность, магнитный захват долгое время не находил должного практического применения, что было связано в основном не только с отсутствием готовых лабораторных установок или некоторых ювелирно-тонких их комплектующих, но во многом определялось и отсутствием необходимой регистрирующей — вычислительной техники, способной существенно упростить процесс измерений. Именно появление такой надежной видеозаписывающей техники, обладающей необходимым разрешением, и достаточно мощных компьютеров с телевизионным вводом данных может дать сильный толчок к широкому использованию магнитного захвата. Отметим на наш взгляд некоторые основные направления таких исследований.

Во-первых, это исследования индивидуальных магнитных свойств клеток, проводимые также и с целью идентификации их физиологических состояний, направленные на диагностику и магнитную сепарацию. Здесь представляется широкий ряд исследований метаболизма клеток, влияния на их функционирование внешних воздействий и разного рода лигандов, искусственно вводимых в буферную среду. Так, уже сейчас можно отметить возможность магнитофоретической регистрации кинетики ферментативного восстановления метгемоглобина в единичных эритроцитах и магнитного тестирования гетерозиготного носительства ферментативной недостаточности [51]. Особенно перспективны на наш взгляд исследования магнитного тестирования иммунологического связывания антител, белков или вирусных частиц без предварительной их химической модификации. Полученные в нашей лаборатории результаты начатых в этом направлении исследований, позволяют надеяться на создание иммунодиагностикомов нового типа, выгодно отличающихся от широко применяемых радиоизотопных, иммуноферментных и иммунофлуоресцентных методов.

Исследования магнитных свойств липосом — бислойных агрегатов, моделирующих клеточную мембрану — другое, совершенно новое применение магнитного захвата. Пока еще не все безупречно здесь с точки зрения «чистоты» эксперимента. Тонким местом является величина Стоксова сопротивления, которую в рассмотренных выше примерах считали неизменной и определяли из геометрических размеров везикулы. Как видно на примере эритроцитов, процессы, происходящие внутри мембраны, могут изменить величину R_{eff} клетки. Это может произойти, например, за счет изменения площади, приходящейся на молекулу в бислое (о чем говорит наблюдаемое в ЯЛ изменение компонент тензора χ), что, в свою очередь, может изменить состояние приповерхностного слоя модельного агрегата или клетки за счет изменения констант разного типа связываний. В случае эритроцитов, содержащих окси-Нb (см. рис. 12), температурные особенности времен магнитного захвата, при определении восприимчивости клетки с помощью (5), компенсируются наблюдаемыми при тех же температурах особенностями величин R_{eff} и, в целом, обуславливают независимость от температуры восприимчивость всей клетки. Знание конкретных значений эффективных радиусов липосом, измерение которых представляется вполне разрешимой задачей, могут как ослабить, так и усилить наблюдаемые особенности $\chi(T)$ липидного бислоя.

Опуская обсуждение результатов исследований магнитных свойств бислойных липидных пленок, как выходящие за рамки статьи, отметим, что особенности $\chi(T)$, наблюдаемые в бислоях из ЯЛ и ЛЭМ, носят явно неравновесный характер, скорее близкий к неким диссипативным

структурам, чем к структурным фазовым переходам, как их принято называть в настоящее время [52]. Магнитный захват, вероятно, является единственно возможным способом исследования магнитных свойств липосом, возникающих в водной среде при концентрациях липида меньше одного процента. Можно надеяться, что на основе этих исследований удастся получить новые данные, приближающие нас к пониманию природы как наблюдаемых особенностей, так и липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, определяющих структуру и свойства клеточной мембраны.

ПРИМЕЧАНИЯ К ТЕКСТУ

¹ Такие широко известные методы, как магнитные весы, ЭПР или СКВИД магнитометрия, обладают по меньшей мере на два порядка меньшей чувствительностью по моменту.

² На возможность диамагнитного захвата и определения магнитной восприимчивости малых частиц по характеру их движения в жидкой среде вблизи поверхности намагниченного цилиндра, указывалось в [6]. Там же экспериментально было измерено распределение поля вблизи намагниченного цилиндра (по действию силы на подвешенную висмутовую частичку), приведено графическое решение уравнения (1), сделано предположение о возможности диамагнитного захвата и наблюдался парамагнитный захват полистироловых частиц диаметром 25–50 мкм поперечно намагниченным стержнем.

³ Для многократных измерений магнитного захвата одной и той же клетки используют иную схему захвата (см. также рис. 9).

⁴ Информация о содержании метгемоглобина в здоровых эритроцитах и его изменениях при патологии в пределах 0,3–2,0% представляется весьма важной [16]. Известные спектрофотометрические способы определения метгемоглобина позволяют обнаружить наличие метгемоглобина в клетках на уровне 0,8–1,0%, причем неперенным является освобождение вещества клетки и удаление мембран.

⁵ Сведения о эритроцитах, структуре и функциях Hb можно найти, например, в [25].

⁶ Два различных конформационных состояния молекулы Hb: *T* — напряженное («tense») и *R* — ненапряженное («relaxed»), различающиеся степенью сродства к кислороду.

⁷ В качестве окислителя использовался 23-мМ раствор NaNO₂. Наличие метформы контролировалось по спектрам поглощения гемолизатов и составляло 97–99%.

⁸ Толщина бислоя ~40 Å [43], так что для везикул радиусом ~4 мкм и $n \sim 10$ это условие легко выполняется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Веденов А. А., Левченко Е. Б.//УФН. 1983. Т. 141. С. 3.
2. Соинин А. С.//УФН. 1987. Т. 153. С. 273.
3. Biophysical Effects of Steady Magnetic Fields: Proceedings of the Workshop. Les Houches, France.— Berlin a. o.: Springer-Verlag, 1987.
4. Watson J. H. P.//J. Appl. Phys. 1973. V. 44. P. 4209.
5. Uchiama S., Kondo S., Takayasu M., Eguchi I.//IEEE Trans. Magn. 1976. V. MAG-12. P. 895.
6. Gill S. J., Malone C. P.//Rev. Sci. Instr. 1963. V. 34. P. 788.
7. Birss R. R., Parker M. R.//IEEE Trans. Magn. 1979. V. MAG-15. P. 1523.
8. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. Механика кровообращения.— М., Мир, 1981.
9. Кондорский Е. И., Норина С. Б., Шалыгин А. Н.//Биофизика, 1980. Т. 25. С. 353.
10. Кондорский Е. И., Норина С. Б., Литвинчук Н. В., Шалыгин А. Н.//Биофизика 1981. Т. 26. С. 1104.
- [11] Paul F., Melville D., Roath S.//IEEE Trans. Magnet. 1982. V. MAG-18. P. 792.
12. Плявинь Ю. А., Блум Э. Я.//Магн. гидродинамика. 1983. № 4. С. 3.
13. Шалыгин А. Н., Норина С. Б., Кондорский Е. И.//Биофизика. 1984. Т. 29. С. 845.
14. Shalygin A. N., Norina S. B., Kondorsky E. I.//J. Magn. and Magn. Mater. 1983. V. 31–33. P. 555.
15. Ханпель Ж., Бреннер Х.//Гидродинамика при малых числах Рейнольдса.— М.: Мир, 1976. С. 630.
16. Кушиковский М. С.//Клинические формы повреждения гемоглобина.— Л., Медицина, 1968.— С. 325.
17. Шалыгин А. Н., Норина С. Б., Гинзбург В. Б., Чекаев А. М., Рыков С. В.//Авторское свидетельство № 1198431; Бюл. изобретений СССР. 1985. № 46. С. 172.

18. *Плявинь Ю. А., Блум Э. Я., Якорковский Л. И., Медне И. Т., Озолс Р. Я.*//Магн. гидродинамика. 1979. № 1. С. 140.
19. *Friedlaender F. J., Takayasu M., Nakano T., Kelland D. R.*//J. Magn. and Magn. Mater. 1980. V. 15—18. P. 1555.
20. *Мирошников В. А., Озолс Р. Я.*//Магн. гидродинамика. 1982. №4 С. 5
- [21] *Melville D.*//Nature, London, 1975. V. 268. P. 706.
22. *Owen C. S.*//Biophys. J. 1978. V. 22. P. 171.
23. *Graham M. D.*//J. Appl. Phys. 1981. V. 52. P. 2578.
24. *Owen C. S.*//Ibidem. 1982. V. 53. P. 3884.
25. Нормальное кроветворение и его регуляция/Под ред. М. А. Федорова.— М: Медицина, 1976.
26. *Perutz M. F.*//Ann. Rev. Biochem. 1979. V. 48. P. 327.
27. *Pauling L., Coryell C. D.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1936. V. 22. P. 210
28. *Pauling L.*//Nature, London, 1964. V. 203. P. 182.
29. *Griffit J. S.*//Proc. Roy. Soc. Ser. A. 1956. V. 235. P. 23.
30. *Wittenberg J. B., Wittenberg B. A., Peisach J., Blumberg W. E.*//Proc. Nat. Ac Sci. USA. 1970. V. 67. P. 1846.
- [31] *Bacci M., Cerdonio M., Vitale S.*//Biophys. Chemistry. 1979. V. 10. P. 113.
32. *Cerdonio M., Morante S., Torresani D., Vitale S., De Yong A., Noble R. W.*//Proc Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 102.
33. *Philo J. S., Dreyer U., Schuster T. M.*//Biochemistry. 1984. V. 23. P. 865.
34. *Savicki J. P., Lang G., Ikeda-Saito M.*//Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984. V. 81. P.5417.
35. *Пирузян Л. А., Кузнецов А. А., Чиков В. М., Плотникова И. Т.*//Изв. АН СССР. Сер. биол. 1984. № 6. С. 894.
36. *Черницкий Е. А., Воробей А. В.*//Структура и функции эритроцитарных мембран.— Минск; Наука и техника. 1981. С. 216.
37. *Блум Э. Я., Озолс Р. Я., Плявиньш Ю. А.*//Изв. АН Латв. ОСР. 1987. № 1. С. 127.
38. *Шалыгин А. Н., Кротов К. А.*//Биофизика. 1988. Т. 33. С. 529.
39. *Vandegriff K. D., Olson J. S.*//J. Biolog. Chem. 1984. V. 259. P. 1269.
40. *Фок М. В., Зарицкий А. Р., Прокопенко Г. Л.*//Биофизика. 1988. Т. 33. С. 622.
- [41] *Messana C., Cerdonio M., Chenkin P., Noble P. W., Fermi G., Perutz P. N., Perutz M. F.*//Biochemistry. 1978. V. 17. P. 3652.
42. *Takayasu M., Duske N., Ash S. R., Friedlaender F. J.*//IEEE Trans. Magn. 1982. V. MAG-18. P. 1520.
43. *Де Же В.* Физические свойства жидкокристаллических веществ. М., Мир. 1982.
44. *Шалыгин А. Н., Вышенская Т. В., Переведенцева Е. В.*//Биофизика. 1987. Т. 32. С. 683.
45. *Шалыгин А. Н., Переведенцева Е. В., Тяжелова Т. В.*//ЖХФ. 1990. Т. 64. С. 1337.
46. *Шалыгин А. Н., Переведенцева Е. В., Барышев М. А.*//Ibidem. С. 1623.
47. *Katamura K., Sakurai I., Jkegami A., Iwayanagi S.*//Mol. Cryst.-Liq. Cryst. 1981. V. 61. P. 77.
48. Handbook of Lipid Research: The Physical Chemistry of Lipids/Ed. D. M. Small — New York: Plenum Press, 1986.— P. 487.
49. *Kunze R. K., Ho J. J. T., Day E. P.*//Biophys. J. 1980. V. 30. P. 359.
50. *Boroske E., Helfrich W.*//Biophys. J. 1976. V. 24. P. 863.
- [51] *Терентьев А. Н.*//Автореферат диссертации канд. ... хим. наук.— М.: ИХФ АН СССР, 1989.
52. *Ивков В. Г., Берестовский Г. Н.* Липидный бислои биологических мембран.— М.: Наука, 1982.