

ДО ПОРУШЕНЬ ВНУТРІШНЬО- І МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ БІОМАКРОМОЛЕКУЛ ПІД ДІЄЮ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

О. Нардід

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна
e-mail: olnard@mail.ru*

Метою роботи є дослідження впливу низьких температур на внутрішньо- та міжмолекулярні взаємодії в білках. У роботі використовували методи гель-хроматографії, електрофорезу, НВЧ-діелектрометрії, калориметрії, оптичної спектроскопії та ЕПР спінового зонду. Встановлено, що повільне заморожування (1–7 град/хв) природних білкових сумішей (сироватка кордової крові, фолікулярна рідина, екстракти плаценти людини) призводить до порушення внутрішньомолекулярних взаємодій у біомакромолекулах із розпушенням поверхневих поліпептидних ланцюгів і подальшою агрегацією біомакромолекул.

Ключові слова: низькі температури, природні білкові суміші, молекулярні взаємодії, кріопошкодження, кріозахист.

Удосконалення існуючих і створення нових кріобіологічних технологій має важливе народногосподарське й соціальне значення та неможливе без знання фізико-хімічних процесів, які відбуваються у біологічних об'єктах на різних етапах кріоконсервування [1, 5]. Ці процеси та їхні наслідки в більшості випадків обумовлені міжмолекулярними взаємодіями і змінами стану біосистем при різних зовнішніх впливах. Внутрішньо- і міжмолекулярні взаємодії у біологічних системах відіграють вирішальну роль у конформаційній організації біомакромолекул, що позначається на виконанні ними основних функцій, забезпеченні їх стійкості й надмолекулярної організації [2].

Умови, в яких перебувають біомакромолекули на різних етапах кріоконсервування, суттєво впливають, принаймні, на третинну та четвертинну конформацію білка. Це зумовлено тим, що такі внутрішньомолекулярні взаємодії, як гідрофобні, між спіральними та β -структурними ділянками поліпептидного ланцюга і водневі внутрішньо- та міжланцюгові, які визначають і стабілізують третинну та четвертинну конформацію білка, значною мірою залежать від змін рН, діелектричної сталої середовища, іонної сили та складу середовища,

які відбуваються у процесі кріоконсервування. Порушення міжмолекулярних взаємодій у цих умовах може привести до структурної реорганізації у системі, яка проявляється в агрегації окремих біомакромолекул.

Відповідно до цього, метою представленої роботи було вивчення закономірностей впливу низьких температур на внутрішньо- та міжмолекулярні взаємодії білків і визначення ролі цих взаємодій у резистентності біоструктур в умовах низькотемпературного консервування.

Матеріали та методи

У дослідженнях використовували природні білкові суміші, які являють собою сироватку кордової крові, фолікулярну рідину, водно-сольові екстракти плаценти людини.

Сироватку кордової крові (СКК), заготовлену під час пологів, одержували традиційним методом [7]. Фолікулярна рідина (ФР) була надана Центром репродукції людини "Імплант" (м. Харків) від жінок, які проходили курс лікування з приводу безплідності методом екстракорпорального запліднення ооцитів [3]. Водно-сольові екстракти плаценти людини (ЕПЛ) готували методом, який описаний у попередніх роботах [9, 10].

Динамічну структуру водно-білкової системи вивчали в ділянці температур 40–0°C, використовуючи спін-мічену стеаринову кислоту (16-ДС). Спектри ЕПР реєстрували на спектрометрі "Bruker" ER-100 зі стандартним термостабілізатором (точність підтримки температури $\pm 0,5^\circ\text{C}$). Характеристиками конформаційної динаміки сироваткових білків були максимальне розщеплення та значення ширини центрального компонента спектра ЕПР зонда 16-ДС.

Розподіл білків за молекулярними масами проводили методом гель-хроматографії. Концентрацію білка у фракціях визначали на спектрофотометрі "Pye Unicam SP 8000".

Дійсну (ϵ') і уявну (ϵ'') частини комплексної діелектричної проникності вимірювали за допомогою НВЧ-діелектрометра резонаторного типу на частоті 9,2 ГГц [8], у ділянці температур 40–5°C, температуру зразка – за допомогою термопари, з точністю $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Відносна помилка вимірювання діелектричних параметрів становила 0,1% для ϵ' та 0,2% – для ϵ'' . Значення частоти діелектричної релаксації (f_d) молекул води в досліджуваних системах обчислювали за формулами, отриманими з рівнянь Дебая [6].

Зразки заморожували за різних режимів у поліетиленових ампулах «Cryovial» (Канада), які містили 700 мкл розчинів, відігрівали на водяній бані за температури 36°C до появи рідкої фази.

Для статистичної обробки результатів використовували t-критерій Стьюдента-Фішера, при параметричному аналізі, та критерій Вілкоксона-Манна-Вітні, при непараметричному. Результати вважали значимими при $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

На даний час значна увага приділяється вивченню таких природних білкових сумішей, як, наприклад, плазма або сироватка крові, фолікулярна рідина, білкові екстракти різних біологічних тканин і т.п. Такі білкові розчини часто використовуються в клінічній практиці для корегування й лікування низки патологічних станів людини [3, 4, 7, 12]. Тривале ж їх зберігання можливе, переважно, за низьких температур у спеціалізованих кріобанках [7].

Результати досліджень, впливу режимів заморожування на конформаційну динаміку білків СКК методом ЕПР спінових зондів показали, що заморожування сироватки до -20°C , зі швидкістю 1–7 град/хв, приводить до вірогідного зменшення максимального розщеплення та ширини центрального компонента спектра ЕПР зонда 16-ДС, пов'язаного з білковими молекулами (рис. 1). Це свідчить про значну модифікацію конформації білків, яка має характер розпушення поверхневих поліпептидних ланцюгів макромолекул. Заморожування сироватки до -196°C зі швидкістю 300–400 град/хв суттєво не впливає на динаміку мікрооточення радикалів, що свідчить про збереження конформації білків сироватки.

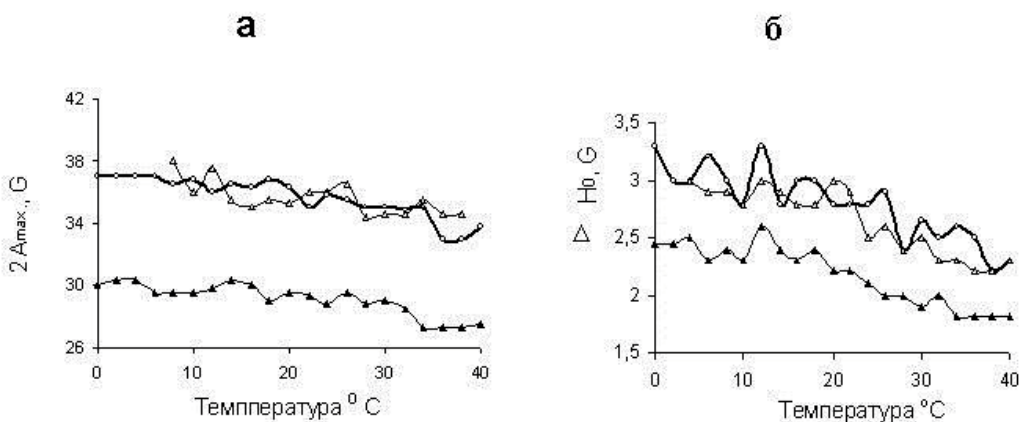


Рис. 1. Температурні залежності максимального розщеплення (а) і ширини центрального компонента спектрів ЕПР зонда 16-ДС в СКК: 1 – контрольний; 2 – після заморожування зі швидкістю 1–7 град/хв до -20°C ; 3 – після заморожування зі швидкістю 300–400 град/хв до -196°C .

Дослідження сироватки кордової крові, проведені методом калориметрії, також свідчать про порушення конформації білкових молекул СКК після заморожування з низькими швидкостями до -20°C . Як видно з рис. 2, заморожування сироватки кордової крові з високими швидкостями істотно не змінює криву теплопоглинання. У той самий час,

після заморожування сироватки з низькою швидкістю, спостерігається зсув піка денатурації альбуміну в ділянку низьких температур з більш вираженим проявом плеча при 66°C. Зниження температури теплової денатурації альбуміну, яке відбувається після використання такого режиму заморожування, вказує на зміну конформації поліпептидних ланцюгів макромолекул, що й приводить до більш раннього процесу денатурації білків СКК.

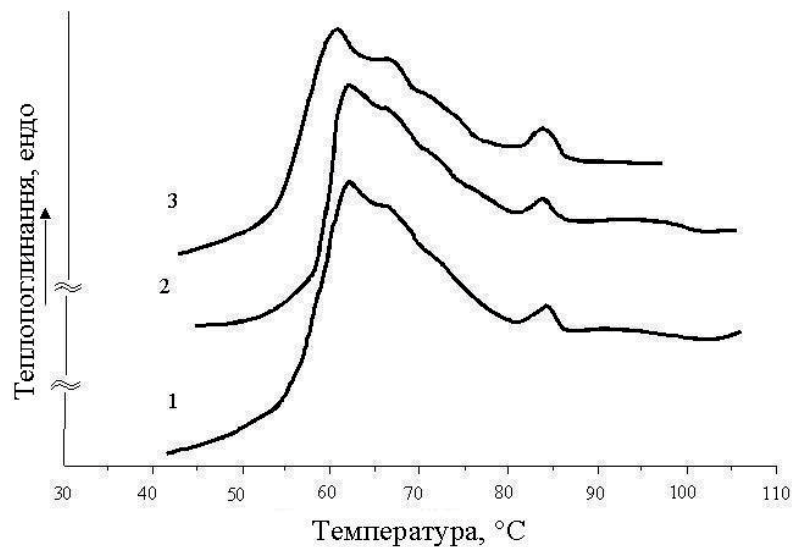


Рис. 2. Криві теплоглиниання СКК людини: 1 – контроль; 2 – після заморожування зі швидкістю 300–400 град/хв до -196°C ; 3 – після заморожування зі швидкістю 1–7 град/хв до -20°C .

Таким чином, заморожування СКК за несприятливими режимами приводить до порушення внутрішньомолекулярних взаємодій у біомакромолекулах, унаслідок якого розпушуються поверхневі поліпептидні ланцюги.

Дослідження впливу заморожування на розподіл білків сироватки кордової крові за молекулярними масами методом гель-хроматографії виявило й інші прояви порушень внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій у цій білковій системі. При заморожуванні з низькими швидкостями до -20°C було виявлено, що максимуми на гель-хроматограмі змістилися в ділянку більших молекулярних мас, а це може свідчити про агрегацію біомакромолекул сироватки (рис. 3). Враховуючи склад СКК, а також вид гель-хроматограм, можна припустити, що в агрегації білків, у першу чергу, беруть участь альбумін та імуноглобуліни. Але зменшення вмісту низькомолекулярних білків підтверджує і їх участь в агрегації. Після охолодження сироватки кордової крові до -196°C зі швидкістю 300–400 град/хв (рис. 4) її гель-хроматограма близька до хроматограми нативної сироватки. Агрегація в цьому випадку практично відсутня.

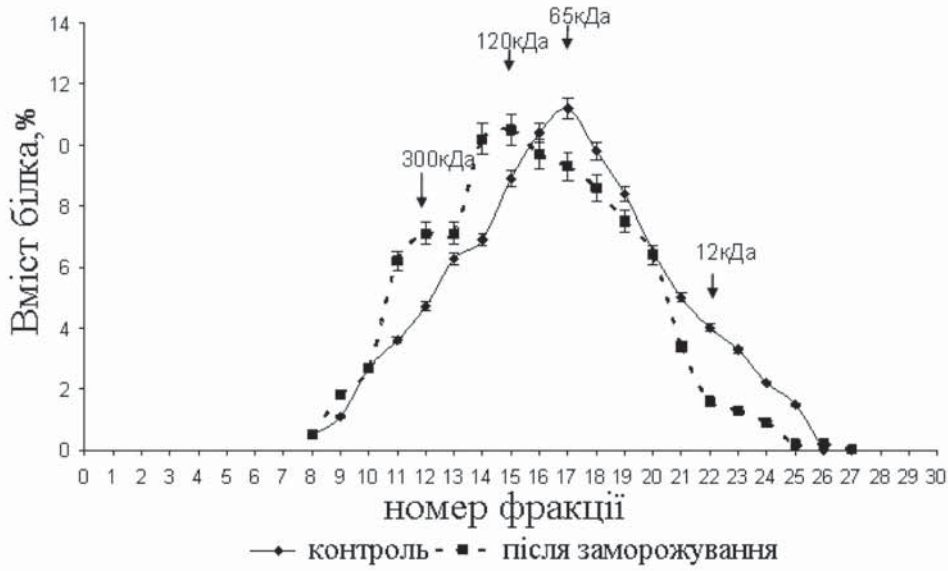


Рис. 3. Гель-хроматограми нативної та замороженої зі швидкістю 1-7 град/хв до -20°C сироватки кордової крові.

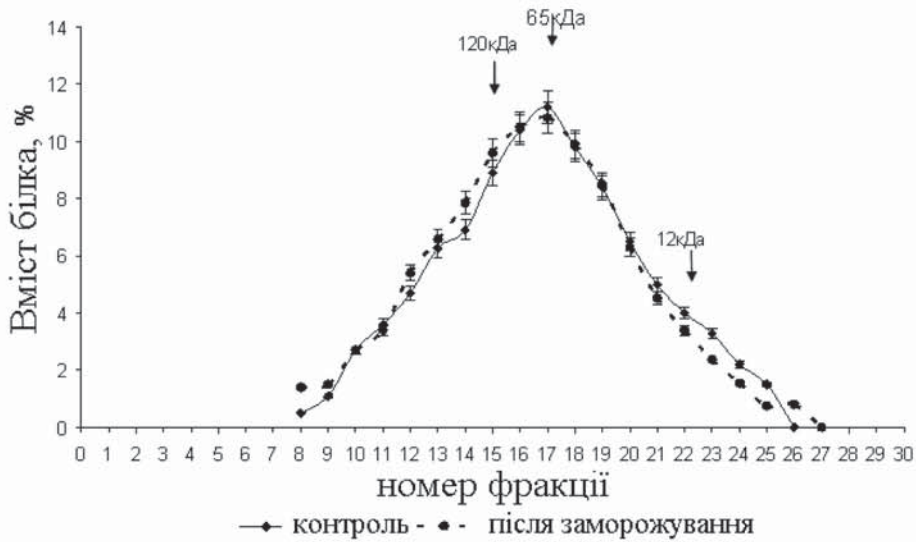


Рис. 4. Гель-хроматограми нативної та замороженої зі швидкістю 300-400 град/хв до -196°C сироватки кордової крові.

Результати дослідження впливу заморожування на агрегацію білків сироватки кордової крові методом гель-хроматографії добре узгоджуються з даними вивчення сироватки, отриманими методом гель-електрофорезу (рис. 5). Аналіз площ білкових піків електрофореграм показав, що після заморожування СКК за низькими швидкостями збільшується вміст високомолекулярних білкових фракцій сироватки. Цей режим охолодження приводить, крім того, до зменшення фракцій, які містять білки з молекулярною масою 60–80 кДа. У той самий час після заморожування до -196°C зі швидкістю 300–400 град/хв і подальшого відігрівання СКК вигляд електрофореграм не змінюється порівняно з електрофореграмою нативної сироватки. Результати досліджень свідчать, що охолодження СКК зі швидкостями 100 град/хв і більше, як до кінцевої температури -196°C , так і до -80°C , не приводить до вірогідних змін у розподілі білків за молекулярними масами. Тому для збереження нативних властивостей біомакромолекул при кріоконсервуванні білкових розчинів без кріопротекторів рекомендується використовувати охолодження зі швидкістю не менше 100 град/хв.

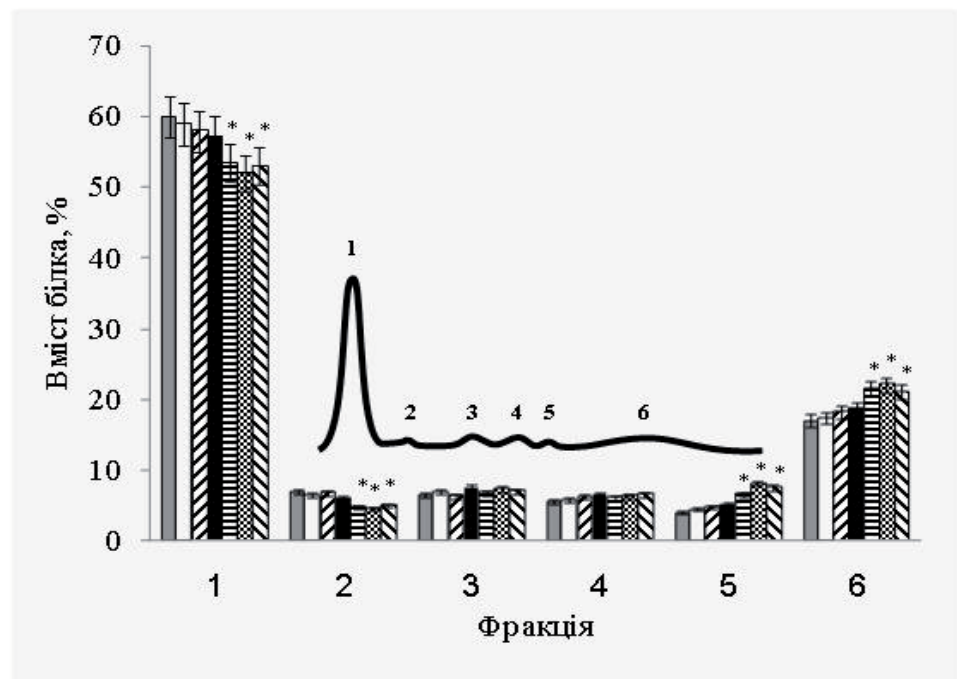


Рис. 5. Електрофореграма СКК і діаграма зміни фракцій СКК при дії різних режимів заморожування (n=6):
 — електрофореграма нативної СКК; □ – нативна СКК; □ – СКК заморожена до -196°C зі швидкістю 300–400 град/хв; ▨ – СКК заморожена до -80°C зі швидкістю 300–400 град/хв; ■ – СКК заморожена до -80°C зі швидкістю 100 град/хв; ▩ – СКК заморожена до -80°C зі швидкістю 35 град/хв; ▧ – СКК заморожена до -80°C зі швидкістю 1–7 град/хв; ▦ – СКК заморожена до -20°C зі швидкістю 1–7 град/хв. * - відмінність вірогідна щодо нативної СКК, $p < 0,05$.

Представлені результати дають змогу припустити такий механізм конформаційно-структурних порушень. При заморожуванні за повільними швидкостями відбувається розпушення поверхневих поліпептидних ланцюгів білкових молекул. У результаті формується така конформація біомакромолекул, при якій частина неполярних амінокислотних залишків білка переходить із внутрішньої ділянки глобули на її поверхню. Зближення таких макромолекул у процесі виморожування вільної води приводить до взаємодії їхніх гідрофобних ділянок, спричиняючи агрегацію біомакромолекул. Існує думка, що агрегація білків при заморожуванні належить до поверхнево-індукованих процесів і відбувається в результаті розгортання білків на поверхнях розділу лід-вода й вода-повітря [11, 13]. При високих швидкостях охолодження агрегація відсутня або значно знижується. Це можна пояснити як недостатнім розпушенням, так і скороченням часу перебування системи в умовах, які сприяють агрегації, а також зменшенням дифузії в граничні ділянки, в яких відбуваються ці поверхнево-індуковані процеси.

Слід зазначити, що навіть при швидкому заморожуванні, коли зміни макромолекул мінімальні, методом НВЧ діелектрометрії виявляються порушення конформації біомакромолекул СКК. Наведені на рис. 6 дані підтверджують, що швидке заморожування (ШЗ) СКК істотно не впливає на кількість зв'язаної молекулами сироватки води, тобто не приводить до їхніх структурно-конформаційних змін. Разом із цим, ареніусова залежність частоти діелектричної релаксації f_d диполів води швидко замороженої сироватки в ділянці 10°C має злам, і при температурах нижче цього значення частота релаксації менша, ніж у контрольних зразках. Це свідчить про гальмування обертання диполів води у НВЧ полі в результаті їхнього структурування або зв'язування. Таким чином, незначні зміни конформації молекул сироватки відбуваються навіть під час швидкого заморожування.

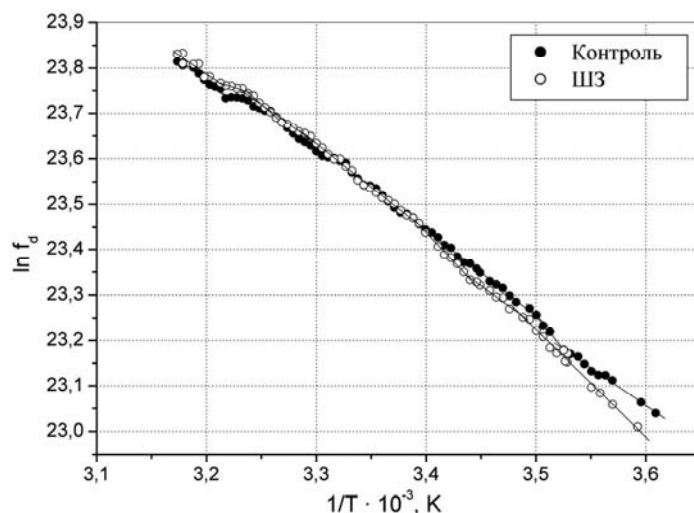


Рис. 6. Ареніусові залежності частоти діелектричної релаксації диполів води в СКК.

Було встановлено, що середнє значення частоти діелектричної релаксації ФР, як і у СКК, після швидкого заморожування (ШЗ) і подальшого відігрівання, а також після зберігання зразків ФР у зрідженому азоті вірогідно ($p < 0,05$) зменшується, порівняно з контролем (рис. 7). Зниження f_d ФР при заморожуванні свідчить про зменшення кількості вільної води в системі, що може бути результатом підвищення ступеня гідратації окремих компонентів ФР. Це зумовлено появою додаткових ділянок зв'язування для молекул води і може бути наслідком зміни конформації біомакромолекул, у результаті порушення внутрішньомолекулярних зв'язків, навіть при такому режимі заморожування. При цьому дисперсія величини f_d у нативній і замороженій ФР однакова, що свідчить про відсутність істотних індивідуальних проявів після низькотемпературного впливу. Це може підтверджувати, що після такого низькотемпературного впливу не спостерігається порушень міжмолекулярних взаємодій, які приводять до агрегації біомакромолекул ФР.

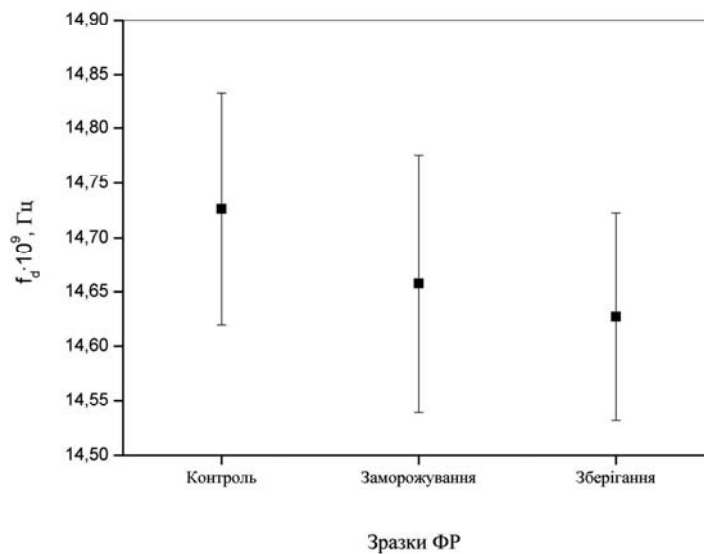


Рис. 7. Частота діелектричної релаксації молекул води нативної ФР (контроль), замороженої до -196 °С і після зберігання упродовж 1 місяця.

Утворення агрегатів при використанні несприятливих режимів заморожування спостерігається і у водно-сольових екстрактах плаценти людини. Після заморожування екстрактів із низькою швидкістю відбувалося статистично значиме збільшення відносного вмісту білків у зоні більших молекулярних мас, що пояснюється агрегацією білків у екстрактах (рис. 8). Зміна білкового профілю свідчить про те, що в утворенні агрегатів

беруть участь переважно білки з молекулярними масами, близькими до 65 і 12 кДа. Очевидно, саме у цих білках спостерігаються порушення внутрішньомолекулярних взаємодій, які викликають достатній рівень розпушення для утворення агрегатів.

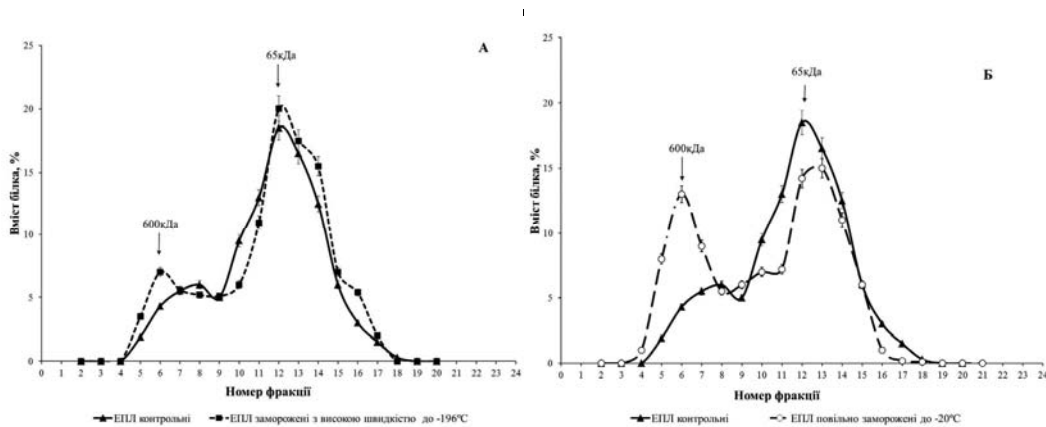


Рис. 8. Вплив заморожування при високих (А) і низьких (Б) швидкостях охолодження з подальшим відігріванням на білковий профіль ЕПЛ.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу установити, що заморожування природних білкових сумішей (сироватки кордової крові, фолікулярної рідини, водно-сольових екстрактів плаценти) за несприятливих режимів (від 1 до 7 град/хв) приводить до розпушення поверхневих поліпептидних ланцюгів і агрегації біомакромолекул. Показано, що разом з утворенням агрегатів із молекулярними масами 120 і 300 кДа високомолекулярними білками в агрегації можуть брати участь і біомакромолекули з молекулярною масою 12 кДа і нижче. На основі аналізу експериментальних даних запропоновано механізм конформаційно-структурних кріопшкоджень біомакромолекул. Отримані результати дають можливість рекомендувати для збереження нативних властивостей біомакромолекул при кріоконсервуванні білкових розчинів без кріопротекторів, використати охолодження зі швидкістю не менше 100 град/хв.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. К.: Наук. думка, 1994. 432 с.
2. Брандс Дж. Конформационные переходы белков в воде и смешанных растворителях. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: [б.и.], 1973. С. 174–254.

3. Грищенко В. И., Геродес А. Г., Петрушко М. П. и др. Использование фолликулярной жидкости человека на этапе культивирования гамет и эмбрионов в программе ЭКО // Проблемы репродукции. 1999. № 6. С. 43–46.
4. Грищенко В. И., Гольцев А. Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. 2002. № 1. С. 54–84.
5. Грищенко В. И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя нации // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18. С. 269–274.
6. Дебай П. Полярные молекулы. М.; Л.: ГНТН, 1931. 245 с.
7. Мошко Ю. А. Криоконсервирование сыворотки кордовой крови, определение ее биологической активности и клинической эффективности в терапии хронических сальпингоофоритов: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.35. Харьков, 2003. 161 с.
8. Николов О. Т., Жилиякова Т. А. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями // Журнал физ. хим. 1991. Т. 65. С. 1312–1316.
9. Погожих Д. Н., Розанова Е. Д., Нардид О. А. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18. С. 22–26.
10. Репина С. В., Нардид О. А., Розанова Е. Д. и др. ЭПР-исследование окислительно-восстановительных реакций водно-солевых экстрактов плаценты человека: влияние температуры хранения и времени экстрагирования // Проблемы криобиологии. 2005. Т. 15. С. 591–598.
11. Cao E., Chen Y., Cui Z. et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // J. Biotechnol. Bioenerg. 2003. Vol. 82. N 6. P. 684–690.
12. Sur T., Biswas T., Ali L. et al. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // Acta Pharmacol Sin. 2003. Vol. 24. N 2. P. 117–125.
13. Zhongshui Y., Garcia A., Jonston K. et al. Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructures microparticles // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004. Vol. 58. N 3. P. 529–537.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 10.09.14

прийнята до друку 11.09.14

DISORDERS OF INTRA- AND INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF BIOMACROMOLECULES UNDER EFFECT OF LOW TEMPERATURES**O. Nardid***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine**23, Pereyaslavskaya St., Kharkiv 61015, Ukraine**e-mail: olnard@mail.ru*

The research aim is to study the effect of low temperatures on the intra- and intermolecular interactions in proteins. We used the methods of gel chromatography, electrophoresis, SHF-dielectrometry, calorimetry, optical spectroscopy and EPR of spin probe. We have found that slow (1–7 deg/min) freezing of natural protein mixtures (cord blood serum, follicular fluid, human placenta extracts) induces the disorder of intramolecular interactions in biomacromolecules with the loosening of surface polypeptide chains and the following aggregation of biomacromolecules .

Keywords: low temperatures, natural protein mixtures, molecular interactions, cryodamages, cryoprotection.

К НАРУШЕНИЯМ ВНУТРИ- И МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР**O. Нардид***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины**ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина**e-mail: olnard@mail.ru*

Целью работы являются исследования влияния низких температур на внутри- и межмолекулярные взаимодействия в белках. В работе использовали методы гель-хроматографии, электрофореза, СВЧ-диэлектрметрии, калориметрии, оптической спектроскопии и ЭПР спинового зонда. Установлено, что медленное (1–7 град/мин) замораживание естественных белковых смесей (сыворотка кордовой крови, фолликулярная жидкость, экстракты плаценты человека) приводит к нарушению внутримолекулярных взаимодействий в биомакромолекулах с разрыхлением поверхностных полипептидных цепей и дальнейшей агрегацией биомакромолекул.

Ключевые слова: низкие температуры, естественные белковые смеси, молекулярные взаимодействия, криоповреждения, криозащита.