

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

УДК 57.043:547.42:577.336

Вплив низьких температур і кріопротекторів на структурний стан
мікросомальних мембран

03.00.19-кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Онищенко Олена Володимирівна

Харків 2006

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник:

Доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Зінченко Олександра Василівна, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, провідний науковий співробітник відділу кріобіофізики, м. Харків

Офіційні опоненти:

Доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Ліннік Тамара Павлівна, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, провідний науковий співробітник відділу кріопротекторів, м. Харків

Кандидат біологічних наук, доцент Гаташ Сергій Васильович, Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, доцент кафедри біологічної і медичної фізики, м. Харків

Провідна установа:

Харківський державний медичний університет МОЗ України, кафедра біохімії

Захист відбудеться 16.05.2006 р. о _13-30__ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015

Автореферат розісланий 14.04.2006 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради, член-кореспондент НАН України Гольцев А.М.

АНОТАЦІЯ

Онищенко О.В. “Вплив низьких температур і кріопротекторів на структурний стан мікосомальних мембран””.- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.-Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2006.

Дисертація присвячена дослідженню впливу кріопротекторів - гліцерину (Гл), диметилсульфоксиду (ДМСО) та 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), низьких температур та озону на стабільність білків і ліпідного бішару, а також на активність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) мікосомальних мембран печінки щурів. Встановлено, що в присутності досліджених кріопротекторів відбуваються зміни конформації білків мікосомальних мембран, змінюється мікрооточення білків, доступність білків розчинникові, підвищується гетерогенність їх структури.

Показано, що ПОЛ в мікосомальних мембранах прискорюється при додаванні 30 – 40 мас. % ДМСО, 1,2-ПД і Гл і уповільнюється після низькотемпературного впливу при додаванні 10 – 15 мас. % Гл.

Показано, що озон в дозах 0,08 - 3,8 мг/л впливає на структурний стан білків і ліпідного бішару мікосом. Зростання дози озону викликає зниження термостабільності мікосомальних білків та посилення активності процесів ПОЛ в мікосомах.

Ключові слова: мікосоми, кріопротектори, білки, термоденатурація, спектроскопія, ПОЛ, охолодження, озон.

АННОТАЦИЯ

Онищенко Е.В “Влияние низких температур и криопротекторов на структурное состояние микросомальных мембран”.- Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология.- Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2006.

Диссертационная работа посвящена исследованию влияния глицерина (Гл), диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), низких температур и озона на состояние белков и липидного бислоя, а также на активность процессов ПОЛ в микросомальных мембранах печени крыс.

В работе использованы методы спектрофотометрии и спектрофлуориметрии для получения информации об изменениях конформации микросомальных белков и состояния липидного бислоя, метод хемилюминесценции - для исследования процессов перекисного окисления липидов и метод дифференциальной сканирующей калориметрии - для изучения термостабильности микросомальных белков.

Анализ спектров поглощения, первых производных спектров поглощения (1ПСП) и сольвентно-пертурбационных дифференциальных спектров (СПДС) белков микросомальных мембран показал, что в присутствии исследованных низкомолекулярных криопротекторов происходят изменения конформации белков микросомальных мембран, изменяется микроокружение белков, изменяется доступность белковых хромофоров для воды. Показано, что ДМСО в концентрациях 30-40 масс% оказывает наиболее пертурбирующее воздействие на белки микросом. После криовоздействия характер влияния криопротекторов на поверхностные хромофорные группы белков микросом в сравнении с контролем сохраняется. Гл и 1,2-ПД уменьшают уровень светорассеяния суспензии по сравнению с контролем, в то время как ДМСО вызывает рост светорассеяния суспензии в области концентраций до 10 масс % с последующим резким снижением при увеличении концентрации криопротектора. При этом глицерин оказывает наименьшее влияние на светорассеяние суспензии.

Исследования состояния липидного бислоя микросомальных мембран в присутствии Гл, 1,2-ПД и ДМСО с использованием флуоресцентного зонда

ФМЕ показали, что в диапазоне концентраций 20-40 масс % для всех исследованных криопротекторов наблюдается рост полярности микроокружения ФМЕ, что отражает увеличение содержания молекул воды в данной области. Охлаждение-нагрев усиливает дестабилизирующее действие криопротекторов на липидный бислой.

В работе определяли кинетические параметры Fe^{2+} -индуцированной и H_2O_2 -индуцированной хемилюминесценции. Показано, что усиление процессов ПОЛ в микросомальных мембранах наблюдается при добавлении ДМСО, 1,2-ПД, глицерина в концентрациях 30-40 масс % и может быть обусловлено нарушением структуры мембран. Процесс охлаждения-нагрева существенно не меняет характер влияния криопротекторов на состояние микросомальных белков. В суспензиях микросом, подвергнутых низкотемпературному воздействию, глицерин в концентрациях 5 и 10 масс % замедляет процессы ПОЛ.

Проведено исследование термической стабильности белков микросомальных мембран в присутствии Гл, 1,2-ПД и ДМСО в концентрациях 5-30 масс% до и после замораживания. Показано, что присутствие в суспензии микросом неэлектролитных криозащитных добавок оказывает как разрыхляющее, так и компактизирующее действие в зависимости от концентрации криопротектора на состояние белков микросом.

Исследовали влияние малых доз озона (от 0,08 до 3,8 мг/л) на структурное состояние белков и липидного бислоя микросомальных мембран. Установлено, что озон влияет на конформационное состояние белков микросом и наиболее выраженные изменения начинаются при дозах озона 1,5 мг/л. Отмечено, что рост концентрации озона вызывает снижение термостабильности микросомальных белков. Обработка озоном в дозах более 1,5 мг/л вызывает изменения функциональной группы (гема) интегрального микросомального белка цитохрома P-450. Показано, что процессы ПОЛ в микросомальных мембранах ускоряются в присутствии озона в дозах 2,5-4,0 мг/л и замедляются при дозах озона 0,5 – 1,5 мг/л.

Ключевые слова: микросомы, криопротекторы, белки, термоденатурация, спектроскопия, ПОЛ, замораживание, озон.

ANNOTATION

Onischenko O.V. The influence of low temperatures and cryoprotectors on the structure state of microsomal membranes. – A manuscript.

The thesis for a candidate of biological science degree (PhD equivalent), in speciality 03.00.19 – Cryobiology. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2006.

The thesis is devoted to the influence of cryoprotectors: glycerol (Gl), DMSO and 1,2-propane diol (1,2-PD); low temperatures and ozone on stability of proteins and lipid bilayer as well as on the activity of lipid peroxidation (LPO) processes in a rat liver microsomal membranes. It has been found that there are changes in conformation of proteins of microsomal membranes, microenvironment of proteins, an increase in heterogeneity of their structure in the presence of the investigated cryoprotectors.

It has been shown that LPO in microsomal membranes increases with addition of DMSO, 1,2-PD, Gl of 30-40% (w/w) and decreases after a low-temperature influence with addition of Gl of 10-15% (w/w).

It has been shown that ozone of 0,08-3,8 mg/l doses affects the structural state of proteins and lipid bilayer of microsomal membranes. An increase in the dose of ozone results in a decrease in thermostability of microsomal proteins and ncrease in activity of LPO in microsomal membranes.

Key words: microsomes, cryoprotectors, proteins, thermodenaturation, spectroscopy, LPO, freezing, ozone.

1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Як відомо, найбільш імовірним первинним процесом при кріопшкодженні клітини є зміни структурно-функціональних характеристик мембрани (проникності, стану ліпідного бішару, функціональної активності) [Белоус А. М. та ін. 1981, Гулевский А. К. та ін., 1984]. Дія низьких температур призводить до порушення ліпід-білкових і ліпід-ліпідних взаємодій у мембранах [Белоус А. М. та ін., 1982], до просторового перерозподілу білків, порушення їх третинної і четвертинної структури [Луговой В. І., 1981], агрегації з утворенням S–S зшивок [Levitt J.A., 1982], дисоціації ліпопротеїнових комплексів. Характер ліпід-ліпідних, ліпід-білкових і білок-білкових взаємодій – вирішальний фактор для збереження інтегральної цілісності клітин. Загальними властивостями кріопротекторів як захисних агентів є здатність впливати на структуру розчинника, на характер кристалізації, що сприяє утворенню дрібнодисперсного льоду [Зінченко О.В., 1983, Гордієнко О.І. та ін., 2002]. Дія кріопротекторів на біомембрани неоднозначна, вони модифікують бар'єрну функцію біологічних мембран, активність мембрано-зв'язаних ферментів. При певних умовах кріопротектори можуть індукувати порушення нативної конформації мембранних білків, злиття мембран, їх руйнування і виявляти цитотоксичність [He S. et al, 2004 Kopeika J. et al, 2003, Plachinta M. et al, 2004]. Вплив кріопротекторів залежить від цілого ряду факторів, серед яких важливе місце займають їх фізико-хімічні властивості і концентрація [Пічугин Ю. І., 1993, Маркарян Ш. А. та ін., 2002].

Зручним модельним об'єктом для вивчення дії кріопротекторів та інших факторів кріоконсервування на мембранні структури є мембрани ендоплазматичного ретикулуму. Такі мембрани можна виділити з клітини у вигляді фракції мікросом, які седиментуються повільніше від інших частин клітин. Фракцію мікросом можна розглядати як суспензію морфологічно замкнутих пухирців, мембрани яких складаються з ліпідного бішару і

периферичних та інтегральних білків. Вивчення структурно-функціональних особливостей мікосомальних мембран і впливу на них різних фізико-хімічних факторів, пов'язаних з процесом кріоконсервування біологічних систем, є актуальним для кріобіології, оскільки ендоплазматичний ретикулум є структурою, що поєднує частини клітини в цілісну систему.

Відомо, що під дією малих доз озону поліпшуються реологічні властивості і кисень-транспортна функція крові [Воссі V., 2003]. Цей факт зв'язують з дією озону на мембрани еритроцитів [Бояринов Т. А. та ін., 1999, Масленніков О.В. та ін., 2003]. Встановлено також, що у присутності малих доз озону зростає проліферативна активність мікроорганізмів після заморожування-відтавання, підвищується стійкість еритроцитів до гіперосмотичного лізису та до гемолізу після кріоконсервування [Зінченко В.Д., Бєлих І.А., 2005]. Однак механізм впливу озону на мембрани, що є первинною мішенню впливу озону на клітини, багато в чому залишається остаточно не з'ясованим. Такі дослідження мають загальнобіологічний інтерес, а також є актуальними для кріобіології у плані подальшого розвитку технологій, які дозволяють покращити перенесення біологічними системами дії холоду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в межах планових відомчих НДР в ІПКіК НАН України: “Дослідження можливих механізмів профілактичного і терапевтичного впливу озону і перекису водню, які генеруються в газовому розряді при використанні в акушерстві, гінекології, а також як стимуляторів метаболічних процесів у біологічних об'єктах після кріоконсервування”, № держ. реєстрації 0102U002025, “Підвищення ефективності технологій кріоконсервування біологічних систем шляхом інтенсифікації репараційних процесів після дії холоду і зниження ризику мікробної контамінації на різних етапах кріоконсервування” (№ держ. реєстрації 0105U03918).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідження впливу кріопротекторів, низьких температур і озону на структурний стан білків і ліпідного бішару, а також активності процесів перекисного окиснення мікосомальних мембран печінки щурів.

У зв'язку з зазначеною вище метою стояли наступні задачі:

- дослідити вплив низькомолекулярних проникаючих кріопротекторів гліцерину (Гл), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) і диметилсульфоксиду (ДМСО), низьких температур і озону на структурний стан мікосомальних білків та ліпідів методами спектрофотометрії і спектрофлуориметрії,
- дослідити зміни термостабільності мікосомальних білків у присутності кріопротекторів до і після низькотемпературного впливу та після дії малих доз озону,
- визначити вплив Гл, ДМСО і 1,2-ПД, низьких температур та озону на перебіг перекисних процесів у мікосомальних мембранах печінки щурів методом хемілюмінесценції.

Об'єкт дослідження –термоденатурація та конформаційні зміни мікосомальних білків, процеси перекисного окиснення ліпідів у мікосомах у присутності кріопротекторів і під дією низьких температур і озону.

Предмет дослідження – мікосомальна фракція печінки щурів.

Методи дослідження – Метод диференційної скануючої калориметрії (ДСК) використаний для визначення термодинамічних параметрів теплової денатурації мікосомальних білків. Методи спектрофотометрії і УФ-спектрофлуориметрії застосовані для одержання інформації про зміни конформації мікосомальних білків і структурного стану ліпідного бішару. Метод хемілюмінесценції (ХЛ) використаний для дослідження процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в мікосомах під впливом кріопротекторів і низьких температур та озону.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведені комплексні дослідження спектральних характеристик білків мікосом у присутності кріозахисних речовин – Гл, 1,2-ПД і ДМСО в широкому концентраційному

діапазоні – від 0 до 40 мас. %. Визначено параметри термоденатурації: температуру і ентальпію термоденатурації мікросомальних білків у присутності зазначених кріопротекторів до і після охолодження до

–196°C. Встановлено, що в присутності вказаних кріопротекторів змінюється термостабільність і конформаційний стан мікросомальних білків. Характер дії кріопротекторів на мембрани обумовлений особливостями будови їх молекул. Методом хемілюмінесценції показано, що кріопротектори в концентрації 30-40 мас. % викликають підвищення активності процесів перекисного окиснення ліпідів мікросомальних мембран. За дестабілізуючою дією на мікросомальні мембрани кріопротектори можна розташувати в ряд ДМСО > 1,2-ПД > Гл. Вперше досліджена дія озону в дозах 0,08 – 3,8 мг/л на стан білків і ліпідів і на процеси ПОЛ у мікросомальних мембранах. Показано, що озон у дозах 0,5-1,5 мг/л сповільнює, а при більш високих дозах прискорює процеси ПОЛ у мікросомальних мембранах. При дозах вище 1,5 мг/л озон спричиняє зміни конформаційного стану мікросомальних білків, впливає на мікрров'язкість ліпідного бішару мікросом та призводить до деградації функціональної групи цитохрома Р-450.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження впливу низьких температур і кріопротекторів на процеси термоденатурації та конформаційні зміни мікросомальних білків, ПОЛ та на агрегацію мікросом дозволяють оцінити ступінь впливу цих факторів на мікросомальні мембрани, що має практичне значення при розробці технологій кріоконсервування біологічних об'єктів. Результати дослідження впливу малих доз озону на процеси ПОЛ у мікросомальних мембранах можуть знайти застосування при розробці методів відновлення втрачених функцій клітинних мембран у складі біологічних об'єктів після впливу на них холоду або технологічного процесу кріоконсервування, а також при розробці методів лікування із застосуванням озону.

Особистий внесок здобувача полягає у виконанні експериментів, узагальненні й аналізі результатів досліджень і підготовці статей до публікації.

В опублікованих зі співавторами роботах [1-9] здобувачеві належить участь у плануванні дослідницької роботи, в постановці експерименту, його виконанні, обробці й аналізі отриманих результатів. Здобувачеві належить:

у роботах [1, 3, 5, 6] – проведення досліджень мікросомальній фракції методами спектрофотометрії і спектрофлуориметрії, участь в обговоренні результатів;

у роботі [2] – проведення досліджень методом хемілумінесценції, аналіз отриманих результатів;

у роботах [4, 7] – дослідження термоденатурації білків мікросомальної фракції методом ДСК;

у роботах [8, 9] – експериментальне дослідження впливу озону на білки і ліпіди мікросомальних мембран методами спектрофотометрії, спектрофлуориметрії, мікрокалориметрії.

Також при виконанні всіх робіт, виконаних у співавторстві, здобувачем проводилось отримання мікросом печінки щурів методом диференційного ультрацентрифугування.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень дисертаційної роботи були представлені і обговорені на конференції молодих вчених при засіданні кафедри кріобіології ЮНЕСКО “Холод у біології та медицині” (14-15 травня 2002 р., м. Харків, Україна); міжнародній конференції Cryobiomol 2003. Low temperature biology (14-18 September, 2003, Coimbra – Portugal); ювілейній конференції молодих учених ІПКіК НАН України, присвяченій 350-річчю Харкова “Холод у біології й медицині” (11-12 травня 2004 р., м. Харків, Україна); 1 Укр. наук. конф. “Проблеми біол. і мед. фізики”, 20-22 вересня 2004 р.; конференції молодих учених ІПКіК НАН України “Холод у біології і медицині”, м. Харків, 17-18 травня 2005 р., IV Українській науково-практичній конференції “Современные аспекты

применения озона в медицине и экологии”, 21–23 вересня 2005 г., м. Євпаторія, Україна, міжнародній конференції “Актуальні проблеми і досягнення кріобіології і кріомедицини. Структурна і функціональна організація стовбурових клітин під дією низьких температур” (м. Харків, Україна, 22-24 листопада 2005 р.); 5 Харківській конференції молодих науковців “Радіофізика та НВЧ електроніка”, 14-16 грудня 2005 р., м. Харків.

Публікації. Результати роботи опубліковані в 9 наукових працях, у тому числі в 5 статтях і в 4 тезах доповідей на конференціях.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків і списку літератури.

Робота викладена на 144 сторінках машинописного тексту, з яких 122 сторінки основного тексту, включає 42 рисунка і список використаних джерел, що містить 193 праці.

2. ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Спектральні дослідження виконували в Харківському національному університеті ім. В.Н. Каразіна, хемілюмінесцентні – в Інституті проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського. Експерименти були виконані на щурах-самцях лінії Вістар масою 180-200 г. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1985 р.). Мікросомальну фракцію з гомогенату печінки щурів отримували методом диференційного центрифугування. Вміст білка в суспензії мікросом визначали за методом Лоурі.

У роботі використали 1,2-ПД (ВО “Хімпром”, Кемерово) марки “х.ч.”, ДМСО, Гл і КСІ “ч.д.а”. (“Реахім”, Москва), ЕДТА “ч.д.а.” (“Sigma”, США). Перед використанням Гл і 1,2 ПД додатково очищували вакуумною дистиляцією, ДМСО – попередньою адсорбцією з окисом алюмінію з наступною вакуумною дистиляцією. Інкубацію мікросом у розчинах кріопротекторів проводили при 20°C протягом 20 хвилин. Охолодження зразків здійснювали в полістиролових ампулах зануренням у рідкий азот, нагрів – при перемішуванні на водяній бані (40°C). Швидкість охолодження становила близько 200°C /хв.

Для дослідження зворотності структурних змін мікросомальних мембран під дією кріопротекторів суспензію мікросом відмивали від кріопротекторів. З цією метою зразки суспензії мікросом після інкубації з кріопротекторами протягом 20 хв. розчиняли тріс-буфером у співвідношенні 1:9 і центрифугували при 105000 g протягом 60 хвилин.

Введення дозованих кількостей озону в суспензію мікросом здійснювали шляхом змішування суспензії з фізіологічним розчином, що містив розчинений озон у концентрації до 4 мг/л (0,02÷0,79 мкМ О₃/мг білку). Озон одержували з чистого кисню методом електросинтезу за допомогою генератора з розрядною трубкою бар'єрного типу.

Спектри поглинання білків мікросомальних мембран в області 250÷650 нм реєстрували на спектрофотометрах Hitachi U-3210 (Японія) і Lambda 35, фірми Perkin Elmer (США). Аналізували перші похідні спектрів поглинання (1ПСП) білків мікросомальних мембран, а також диференційні сольвентно-пертурбаційні спектри (СПДС) поглинання білків мікросом у присутності органічних добавок [Herskovits T., 1968]. Положення максимумів спектрів поглинання білків мікросом визначали по точці обернення в нуль 1ПСП. Графіки СПДС будували як залежність від концентрації кріопротекторів відношення різниці значень СПДС у максимумі спектрів поглинання (на довжині хвилі 270 нм) мікросом у присутності кріопротекторів і значень СПДС у максимумі спектрів поглинання мікросом

без кріопротекторів (A270-A0270) до відповідного значення у максимумі спектра поглинання мікросом без кріопротектора (A0270). Величину світлорозсіювання суспензії мікросом визначали в області відсутності власного поглинання білків на довжині хвилі 650 нм.

Реєстрацію спектрів флуоресценції проводили на спектрофлуориметрах Hitachi F-4010 (Японія) і Cary Eclipse (Varian, США) з автоматичною корекцією спектрів. Ширина вхідної і вихідної щілин монохроматора становили відповідно 3 і 5 нм. Для усунення ефекту “внутрішнього фільтра” при флуориметричних вимірюваннях зразки розводили так, щоб оптична густина суспензії на довжині хвилі збудження флуоресценції не перевищувала 0,1. Всі спектральні вимірювання виконували при кімнатній температурі (20 °C) у стандартних кварцових кюветах 1×1×3 см. Флуоресцентний зонд пірен (“Sigma”, США) готували у вигляді спиртового розчину (1 мкМ) і додавали по 10 мкл цього розчину до 3 мл суспензії мембран за 15 хв. до початку вимірів. У роботі використаний флуоресцентний зонд 3-гідроксі-4-(N,N-диметиламіно)-флавіон (ФМЕ) групи гідроксіфлавіонів, який був люб’язно наданий Пивоваренком В.Г. (Київський національний університет ім. Т. Г. Шевченка). Для отримання спектрів флуоресценції в суспензію мікросом додавали 10 мкл 1мМ спиртового розчину ФМЕ, кінцева концентрація зонду в розчині становила 5×10^{-6} М. Отримані розчини інкубували 20 хв. при кімнатній температурі. Спектри флуоресценції реєстрували в діапазоні довжин хвиль 425-700 нм при довжині хвилі збудження 405 нм.

Спектри власної флуоресценції білків збуджували світлом з довжиною хвилі 280 нм (тирозинова і триптофанова флуоресценція). Аналізували параметри спектрів флуоресценції білків мікросомальних мембран – довжину хвилі ($\lambda_{\text{макс}}$) та інтенсивність ($F_{\text{макс}}$) у максимумі флуоресценції. Досліджували також другі похідні спектрів флуоресценції (2ПСФ) у зв'язку з тим, що вони, порівняно з вихідними спектрами, дають можливість одержати більше детальну інформацію про стан мікрооточення ароматичних залишків

білків, а в ряді випадків і розділити внесок тирозинової і триптофаної складових спектру [Демченко А.П., 1988]. Статистичну обробку результатів виконували з використанням методу Ст'юдента [Лакін Г.Ф., 1990]. Обробку спектрів виконували в програмі Microcal Origin 6.0.

Дослідження процесів ПОЛ мікросом печінки щурів проводили на хемілюмінометрі АК-01. Інтенсивність хемілюмінесценції визначали шляхом додавання в кювету, що містила 1 мл 50 мМ трис-НCl, 0,1 мл мікросомальної суспензії, 50 мкл 3%-ного розчину H₂O₂ або 50 мкл розчину, що містив FeSO₄ (кінцева концентрація Fe²⁺ становила 5 мМ), і протягом 2 хвилин реєстрували інтенсивність світіння. Всі хемілюмінесцентні показники перераховували в імп×с-1 ×мг-1 білка.

Калориметричні дослідження проводили на диференційному адіабатичному скануючому мікрокалориметрі ДАСМ-4 виробництва СКТБП РАН (Пущино, Росія). Рівень шуму при скануванні становив 5×10⁻⁷ Вт. Термограми плавлення мікросом реєстрували в діапазоні температур 5–130°C при швидкості сканування 1°C/хв. і надлишковому тиску 2,5 атм. Визначали температури (Td) і теплоти (ΔH) плавлення білків мікросомальних мембран.

Результати досліджень і їх обговорення

Дослідження конформаційних змін білків мікросомальних мембран під дією низькомолекулярних проникаючих кріопротекторів (Гл, 1,2-ПД і ДМСО) на етапі еквілібрації, а також у поєднанні з впливом низькотемпературного фактора (охолодження-нагріву) виконували з використанням методу Уф-спектрофотометрії. На підставі аналізу отриманих спектрів показано, що після охолодження суспензії мікросом без кріопротекторів на фоні деякого підвищення загальної інтенсивності спектра спостерігаються зрушення близько 1 нм (p<0,01) як основного мінімуму 1ПСП, так і окремих смуг зі зміною співвідношення їх інтенсивностей. Значення інтенсивностей 1ПСП мікросом для піку 286 нм мають тенденцію до зниження при збільшенні концентрації кріопротектора. При цьому також спостерігається зрушення в довгохвильову область положення максимумів спектрів поглинання, яке

свідчить про утворення водневих зв'язків. Зазначені зміни спектрів можуть свідчити про зміну проникності мікосомальних мембран, внаслідок чого змінюється доступність білків мікосомальних мембран розчинників. Охолодження і наступний нагрів суспензії мікосом у присутності кріопротекторів посилюють ступінь дії кріопротекторів на мікосомальні мембрани.

Сольвентно-пертурбаційні диференційні спектри використовували в даній роботі для дослідження впливу складу розчинника на стан мембранних білків. В суспензіях мікосом з добавками 1,2-ПД і ДМСО відзначаються злами і зміни нахилу на графіках залежності зміни відносної інтенсивності СПДС від концентрації кріопротекторів при 10 і 30 мас. % 1,2-ПД та 10 мас.% ДМСО. Зміни нахилу на залежностях відносної інтенсивності СПДС від концентрації кріопротекторів вказують на те, що під впливом кріопротекторів зазнають змін хромофорні групи білків мікосом, причому, скоріше за все, зміни настають у поверхневих хромофорних групах білків, які більше від інших зазнають дії кріопротекторних добавок.

Після кріовпливу загальний вигляд залежностей відносних інтенсивностей СПДС від концентрації кріопротекторів зберігається, тобто після кріовпливу характер дії кріопротекторів на поверхневі хромофорні групи білків мікосом не змінюється. За ступенем впливу на структуру білків мікосомальних мембран досліджені кріопротектори можна розташувати в ряд: Гл<1,2-ПД<ДМСО.

Дію кріопротекторів і охолодження-нагріву на конформаційний стан мікосомальних білків досліджували також на підставі аналізу власної флуоресценції мікосом. Аналізували зміни інтенсивності в максимумі власної флуоресценції $F_{\text{макс}}$ і положення основного мінімуму 2ПСФ, що відповідає максимуму на основному спектрі флуоресценції $\lambda_{\text{макс}}$ при збудженні на довжині хвилі 280 нм у залежності від концентрації кріопротекторів і після охолодження-нагріву.

На рис. 1 наведені залежності $F_{\text{макс}}$ і $I_{\text{макс}}$ від концентрації Гл і ДМСО без охолодження і після охолодження-нагріву.

Довгохвильовий зсув спектру флуоресценції мікросомальних білків в області 340-350 нм у присутності кріопротекторів у високих концентраціях вказує на збільшення внеску в спектр частини доступних розчинникові триптофанових залишків.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що підвищення інтенсивності спектрів у присутності кріопротекторів зумовлено не лише зміною властивостей розчинника в оточенні білків, але і його безпосередньою взаємодією з поверхнево локалізованими триптофановими залишками білків мікросом. Охолодження-нагрів дає додатковий внесок у конформаційні перебудови білків мікросом. Було встановлено, що при концентраціях, які не перевищують 30 мас. % для Гл, 20 мас. % для 1,2-ПД і 10 мас. % для ДМСО, зміни $F_{\text{макс}}$ і $I_{\text{макс}}$ незначні, звідки випливає, що дані кріопротектори у вказаних концентраціях не призводять до сильного пертурбаційного впливу на білки мікросом. При більш високих концентраціях даних кріопротекторів спостерігаються істотні зміни спектрів власної флуоресценції білків мікросом. Було встановлено, що спектри власної флуоресценції і 2ПСФ білків мікросом, відмитих від гліцерину, 1,2-ПД і ДМСО в концентраціях 30-40 мас. %, вірогідно не відрізняються від тих, які отримані до процедури відмивання. Вигляд спектрів власної флуоресценції, характерний для білків мікросом без кріопротекторів, не відновлюється після інкубації мікросом у розчинах кріопротекторів вказаних концентрацій і наступного відмивання. Отже, відмивання від кріопротекторів не призводить до відновлення структури білків мікросом. Тому при застосуванні Гл, 1,2-ПД і ДМСО як кріозахисних речовин їх доцільно використовувати в концентраціях, що не перевищують наступних значень: 30 мас.% для Гл, 20 мас.% для 1,2-ПД і 10 мас.% для ДМСО з метою мінімального порушення структурного стану білків, вбудованих у мембранні структури.

Дослідження стану ліпідного бішару мікросомальних мембран у присутності Гл, 1,2-ПД і ДМСО до та після охолодження-нагріву виконували з застосуванням флуоресцентного зонду ФМЕ, який є гідрофобним зондом, здатним вбудовуватись в ліпідний бішар в області полярних голівок і початків вуглеводневих хвостів ліпідів і дуже чутливий до стану його оточення.

На рис. 2 показана залежність відношення інтенсивностей флуоресценції зонду ФМЕ у мікросомальних мембранах на довжинах хвиль 515 і 575 нм (I_{515}/I_{575}) від концентрації Гл, 1,2-ПД і ДМСО без охолодження та після охолодження-нагріву.

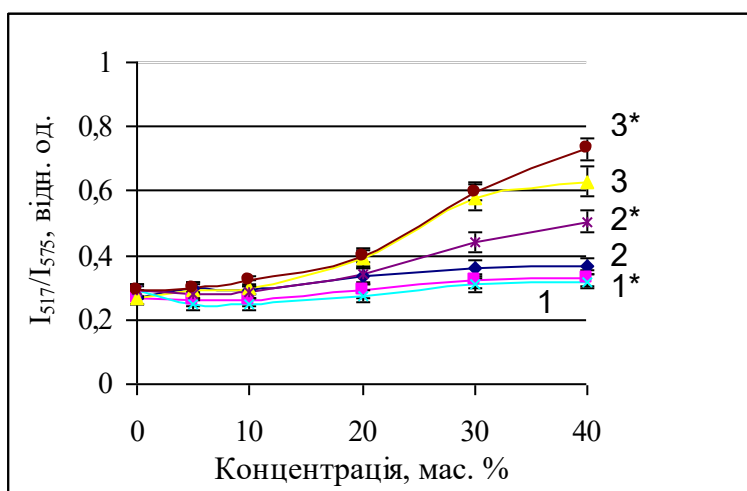


Рис. 2 Залежність відношення інтенсивностей смуг флуоресценції (I_{515}/I_{575}) зонду ФМЕ в мембранах мікросом печінки щурів від концентрації Гл, 1,2-ПД і ДМСО до (1, 2, 3) та після охолодження-нагріву (1*, 2*, 3*)

Збільшення відношення I_{515}/I_{575} відповідає збільшенню полярності мікрооточення ФМЕ, тобто збільшенню концентрації води в його мікрооточенні. Як видно з рис. 2, сильні зміни відношення I_{515}/I_{575} з ростом концентрації криопротекторів спостерігаються в діапазоні 20-40 мас. % для всіх криопротекторів, які досліджуються. Для Гл ці зміни найменш виражені.

З наведених на рис. 2 даних можна зробити висновок, що Гл, 1,2-ПД і ДМСО в концентраціях 5–20 мас. % не спричиняють істотного впливу на мікрооточення ФМЕ, а отже, і на структуру ліпідного бішару. З ростом

концентрації кріопротекторів відбувається підвищення полярності мікрооточення зонду ФМЕ, який знаходиться в мікросомальних мембранах, що може бути обумовлено збільшенням його доступності для молекул води.

Дестабілізуюча дія 1,2-ПД і ДМСО на бішар проявляється при концентраціях більше 20 мас. %, у той час як Гл не спричиняє значних порушень. Охолодження-нагрів посилює дестабілізуючу дію кріопротекторів на ліпідний бішар.

Отримані результати вказують на те, що 1,2-ПД і ДМСО активно взаємодіють з мікросомальними мембранами вже при кімнатній температурі, призводячи до зміни конформаційного стану білків мікросомальних мембран.

Рівень ПОЛ часто використовується дослідниками, як один з тестів на ступінь ушкодження біологічних об'єктів [Барабой В. А. і ін., 1991]. Тому в даній роботі методом хемілюмінесценції вивчали процеси ПОЛ у мікросомальних мембранах печінки щурів у присутності Гл, ДМСО і 1,2-ПД і після дії низьких температур з метою порівняння ступеня деструктивної дії різних кріопротекторів з указаної групи і охолодження-нагріву на мікросомальні мембрани. Показник світлосуми Fe^{2+} -індукованої ХЛ мікросом, що піддавалися впливу низьких температур, зростає в 2 рази в порівнянні з контролем, що свідчить про виражене збільшення активності перекисного окиснення в мікросомальних мембранах внаслідок прискорення процесів ліпопероксидації і паралельного уповільнення окиснення продуктів ПОЛ (рис. 3).

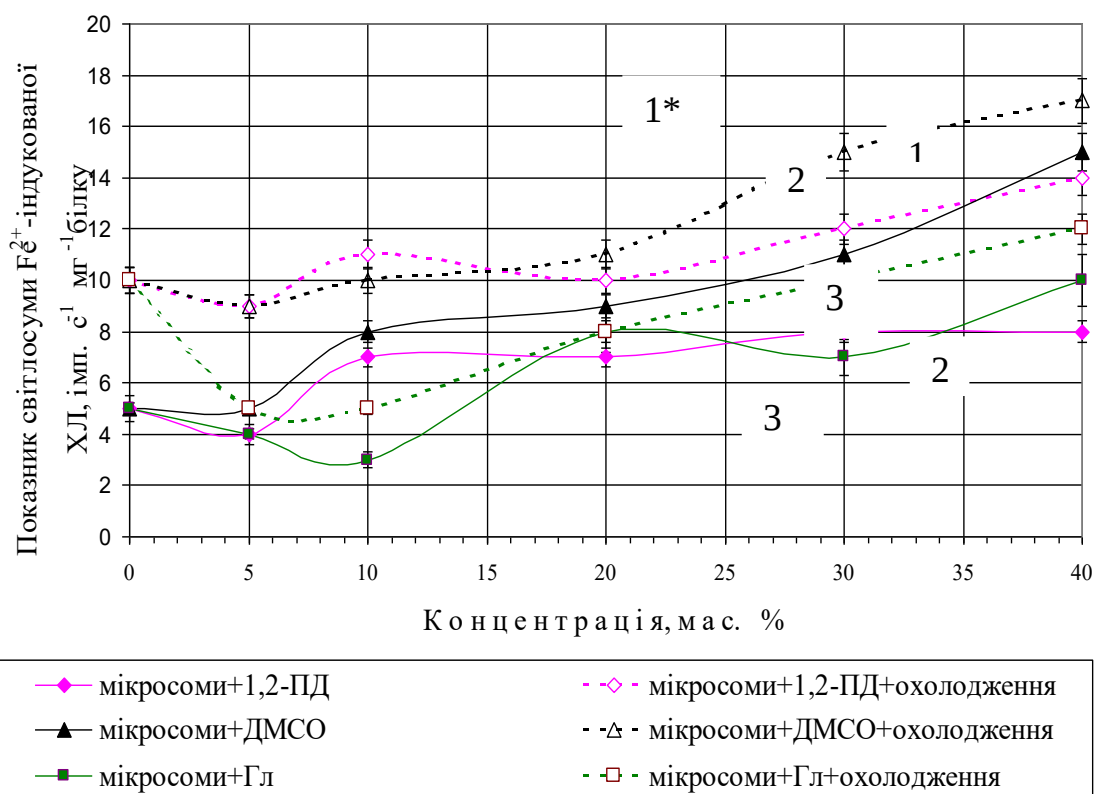


Рис. 3 Залежність показника світлосуми Fe^{2+} -індукованої хемілюмінесценції від концентрації ДМСО, 1,2-ПД і Гл до охолодження (1,2,3) та після охолодження-нагріву (1*, 2*, 3*)

Присутність Гл, 1,2-ПД і ДМСО суспензії мікросом в концентраціях 40 мас. % викликає збільшення показника світлосуми. Додаткове збільшення показника світлосуми спостерігається, якщо суспензію мікросом з додаванням 30–40 мас. % ДМСО піддати охолодженню до -196°C і наступному нагріву. Отже, спостерігається синергізм двох факторів впливу на мікросоми – високих концентрацій ДМСО і охолодження-нагріву.

Активність системи антиоксидантного захисту у мікросомах вивчали на підставі аналізу амплітуди спалаху і світлосуми світіння H_2O_2 –індукованої ХЛ, що інтегрально відбиває кількість антиоксидантів у суспензії мікросом. Для мікросом з печінки щурів у розчинах в присутності Гл, 1,2-ПД і ДМСО в концентраціях 5 – 40 мас. % спостерігається монотонне зростання показників амплітуди спалаху зі зростанням концентрації кріопротекторів. Після дії низьких температур спостерігається зростання показника амплітуди спалаху

H₂O₂ –індукованої ХЛ в суспензіях мікросом в 2 рази. В присутності кріопротекторів, починаючи з 30 мас.% і вище в суспензії мікросом, підданих низькотемпературному впливу, збільшується показник світлосуми H₂O₂ –індукованої ХЛ. Це вказує на те, що при концентрації менше 20–30 мас.%, імовірно, спостерігається стабілізація мікросомальних мембран, у той час як більш високі концентрації кріопротекторів призводять до посилення активності перекисного окиснення в мікросомальних мембранах, що може бути спричинено порушенням їх структури. Низькотемпературний вплив призводить до посилення активності перекисного окиснення в мікросомальних мембранах. Це відбувається, імовірно, внаслідок прискорення процесів ліпопероксидації і паралельного сповільнення окиснення продуктів ПОЛ.

Методом диференційної скануючої калориметрії (ДСК) проведено дослідження термічної стабільності білків мікросомальних мембран у присутності Гл, 1,2 – ПД і ДМСО до і після охолодження. Реєстрували термограми мікросом у діапазоні температур 10-100°C без кріопротекторів і у присутності Гл, 1,2-ПД і ДМСО у концентраціях 5–30 мас. %. Термограми мікросом без кріопротекторів до та після охолодження-нагріву мають один розмитий пік плавлення при температурі 54,5 и 53,0 °C відповідно, який зумовлений денатурацією білкової компоненти мікросомальних мембран [Lerock J.R. et al., 1980] і являє собою суперпозицію теплових ефектів плавлення окремих білкових компонентів. Температура денатурації T_d мікросомальних білків зростає при збільшенні концентрації всіх досліджених нами кріопротекторів у середовищі в діапазоні від 10–15 до 30 мас.% (рис. 4).

Видно, що в області концентрацій близько 20 мас. % для гліцерину і ДМСО спостерігається максимум температури денатурації мікросомальних білків, який більшою мірою виражений у присутності ДМСО.

Встановлено, що при вмісті ДМСО 20–30 мас.% ентальпія денатурації мікросомальних білків ΔH збільшується в 2 рази у порівнянні з ΔH для мікросомальних білків без ДМСО. Максимальне підвищення температури

денатурації білків зареєстровано в присутності 20 мас. % ДМСО і становить 5,5°C. Ці факти дають нам підстави говорити про сильну взаємодію ДМСО з гідратною оболонкою мікросомальних білків, імовірно, як за гідрофільним, так і за гідрофобним механізмами. З отриманих результатів видно, що кріопротектори, які вивчалися, у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій значно впливають на термостабільність мікросомальних білків. Вірогідно, такі зміни обумовлені структурними перебудовами мікросомальних білків – розпушенням у присутності Гл і 1,2-ПД і згортанням у присутності ДМСО білкової глобули.

Відомо, що озон O_3 , на відміну від кисню в звичайній молекулярній формі O_2 , має більшу окиснювальну здатність і істотно відрізняється від кисню за характером біологічної дії. Останнім часом з'явилися повідомлення про те, що малі дози озону сприяють прискоренню процесів відновлення не летальних ушкоджень після кріоконсервування біологічних систем [Зінченко В.Д., Белих І.А., 2005]. Оскільки мембрана є тією первинною мішенню у клітині, з якою взаємодіє озон, то в даній роботі з метою вивчення особливостей дії озону на мембранні структури, досліджували вплив малих доз озону (від 0,08 до 3,8 мг/л) на структурний стан білків і ліпідного бішару мікросомальних мембран, на термостабільність мікросомальних білків і на процеси ПОЛ у мікросомах з печінки щурів.

Встановлено, що введення озону в суспензію мікросом призводить до збільшення напівширини спектрів 1ПСП, що відбиває збільшення гетерогенності хромофорів (рис. 5). Озон діє як гасник власної флуоресценції білків. Ефективність дії гасника на флуорофори може бути оцінена із графіка Штерна-Фольмера (рис. 6) для гасіння загальної флуоресценції білків мікросом озоном при збудженні на довжині хвилі 280 нм і власної флуоресценції триптофанових залишків білків при збудженні на довжині хвилі 296 нм.

Видно, що нахил графіка для триптофанової флуоресценції (рис. 6, 2) більший, ніж для загальної флуоресценції (рис. 6, 1), звідки випливає, що

ефективність гасіння озоном флуоресценції триптофанових залишків білків мікросом вища. Подібний ефект може бути наслідком зростання доступності мікросомальних білків для молекул розчинника в результаті дії озону на конформацію білків.

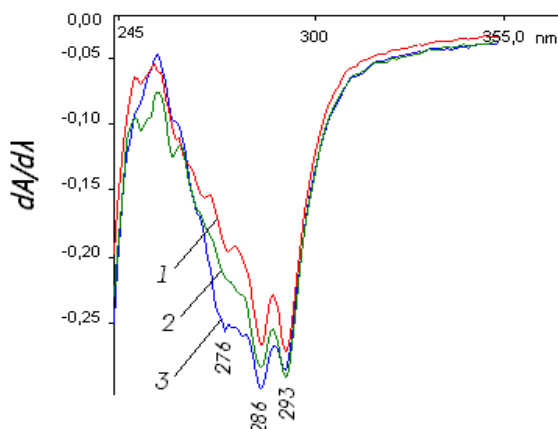


Рис. 5 Перші похідні спектрів поглинання білків мікросомальних мембран у розчині без озону (1) і у присутності різних доз озону: 2 – 1,3 мг/л; 3 – 3,8 мг/л

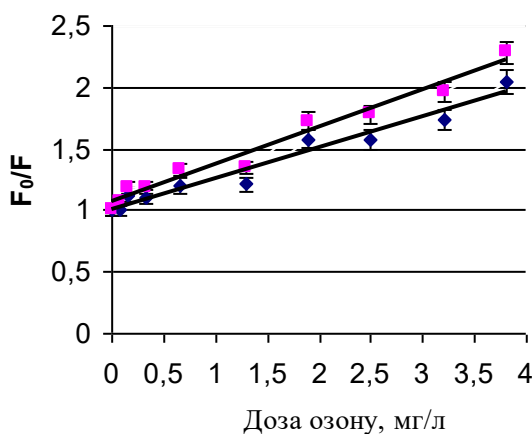


Рис. 6 Графіки Штерна-Фольмера для гасіння власної флуоресценції білків мікросомальних мембран озоном

1 - загальна флуоресценція білків мікросом, яка реєструється при збудженні на довжині хвилі 280 нм;

2 - флуоресценція триптофанових залишків, яка реєструється при збудженні на довжині хвилі 296 нм. F_0 і F - інтенсивності флуоресценції за відсутності і у присутності озону відповідно

На підставі аналізу співвідношення інтенсивностей флуоресценції пірену в мікосомальних мембранах на довжинах хвиль 373, 393 і 476 нм отримували інформацію про зміну мікров'язкості в полярній і неполярній областях основного пулу ліпідів мембран. Показано, що відношення F_{476}/F_{393} , яке характеризує коефіцієнт ексімеризації пірену, зменшується зі збільшенням дози озону. Спостерігаються збільшення мікров'язкості ліпідів основного пулу і анулярних ліпідів при зростанні дози озону.

Аналізуючи спектри поглинання и 1ПСП гему цитохрому Р-450, гідрофобного інтегрального білку, функціонально активна гемова група якого розташована близько від поверхні бішару, в мікосомах в присутності різних доз озону, встановили, що конформаційні зміни гему цитохрому Р-450 збільшуються по мірі зростання дози озону.

Дію озону на процеси ПОЛ у мікосомальних мембранах вивчали, визначаючи кінетичні параметри Fe^{2+} - індукованої і H_2O_2 – індукованої хемілюмінесценції і спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ) в суспензії мікосом у присутності озону в дозах 0,5–4,0 мг/л.

На підставі аналізу кінетичних показників H_2O_2 – індукованої ХЛ показано, що озон у дозах 2,5–4,0 мг/л призводить до посилення процесів ПОЛ порівняно з цими процесами у зразках без озону внаслідок вповільнення окиснення продуктів ПОЛ.

Як видно з рис. 7, під дією озону в дозах 0,5 – 1,5 мг/л відбувається достовірне зниження СХЛ, а в діапазоні концентрацій 2,0 - 3,0 мг/л – зростання показника СХЛ. Отже, дія озону в дозах 0,5-1,5 мг/л призводить до сповільнення, а в дозах 2,0 - 4,0 мг/л – до прискорення процесів ПОЛ у мікосомах. При дозах озону 0,5-2,0 мг/л кінетичні показники ХЛ, індукованої

Fe²⁺ (рис. 7, б) в межах похибки експерименту не відрізняються від подібних показників у зразках мікросом без озону.

При дії озону в дозах 2,5-4,0 мг/л спостерігається різке збільшення амплітуди і світлосуми Fe²⁺ - індукованої ХЛ ($p < 0,05$). Оскільки амплітуда спалаху Fe²⁺- індукованої ХЛ пропорційна кількості гідроперекисів, можна говорити про зростання кількості гідроперекисів в мікросомальній суспензії при дозах озону більше 2,5 мг/л.

Виявлений ефект сповільнення процесів ПОЛ у мікросомальних мембранах під дією малих доз озону може являти собою інтерес для подальших досліджень з метою його застосування в кріобіології для зменшення пошкоджень біологічних об'єктів після низькотемпературних впливів.

Вплив різних доз озону в діапазоні 0 – 2 мг/л на структурну стабільність білків мікросом досліджували на основі аналізу процесу термоденатурації білків у присутності озону методом ДСК. Було встановлено, що температура термоденатурації в дослідженому діапазоні доз озону знижується від 54–55°C до 48°C. Значення теплоти термоденатурації ΔH монотонно знижується при зростанні дози озону і при дозі 2 мг/л зменшується в 2 рази порівняно зі значенням ΔH для зразків, не оброблених озоном. Отже, з ростом дози озону в діапазоні 0–2 мг/л в суспензії мікросом відбувається зниження термостабільності мікросомальних білків.

ВИСНОВКИ

В дисертації представлено теоретичне і експериментальне узагальнення наукової проблеми, націленої на дослідження дії Гл, 1,2-ПД і ДМСО, охолодження-нагріву та озону на структурні перебудови мікросомальних мембран.

1. Експериментально показано, що в присутності Гл, 1,2-ПД і ДМСО відбуваються зміни конформації білків мікросомальних мембран, змінюється мікрооточення білків; Гл, 1,2-ПД і ДМСО змінюють структуру мікросомальних мембран, утворюючи водневі зв'язки з білками мікросом, і змінюють доступність білків мікросом розчинників; за ступенем впливу на мікросомальні мембрани кріопротектори можна розташувати в ряд ДМСО > 1,2-ПД > Гл.

2. При застосуванні Гл, 1,2-ПД і ДМСО як кріозахисних речовин їх бажано застосовувати у концентраціях, які не перевищують: ДМСО – 10 мас. %, 1,2-ПД – 20 мас. % і Гл – 30 мас. % з метою кращого збереження мембранних структур.

3. Гл, 1,2-ПД і ДМСО в концентраціях 20-40 мас. % впливають на стан ліпідного бішару мікросомальних мембран, викликаючи збільшення полярності ліпідного бішару, що пояснюється зростанням вмісту води в бішарі; охолодження-нагрів підсилює дестабілізуючу дію кріопротекторів на ліпідний бішар.

4. Показано, що при додаванні Гл, 1,2-ПД і ДМСО в концентраціях 30-40 мас. % відбувається посилення процесів перекисного окиснення мікросомальних мембран, що може бути обумовлено порушенням їх структури.

5. Процес охолодження-нагріву мікросомальних мембран посилює вплив кріопротекторів на конформаційний стан мікросомальних білків та на процеси ПОЛ.

6. Встановлено, що озон впливає на конформаційний стан білків мікросом, і зокрема гему цитохрому Р-450, причому істотні зміни відбуваються при дозах озону вище 1,5 мг/л.

7. Показано, що озон в дозах 2,5-4,0 мг/л призводить до посилення активності процесів перекисного окиснення в мікросомальних мембранах внаслідок прискорення процесів ліпопероксидації і паралельного сповільнення окиснення продуктів ПОЛ. Озон у дозах 0,5 – 1,5 мг/л сповільнює процеси ПОЛ в мембранах мікросом. Використання останньої властивості малих доз озону може бути рекомендовано для розробки способів покращення збереження біологічних об'єктів у процесі їх кріоконсервування.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

1. Онищенко Е.В., Зинченко А.В. Исследование влияния некоторых проникающих криопротекторов на белки микросом методом хемилюминесценции // Проблемы криобиологии.- 2005.- Т.15.- №1.- С.50-55.
2. Онищенко Е.В., Дюбко Т.С. Влияние замораживания на белки микросом в присутствии низкомолекулярных криопротекторов по данным УФ-спектрофотометрии // Проблемы криобиологии.- 2005.- Т.15.- №2.- С.184-194.
3. Зинченко А.В., Онищенко Е.В. Термоденатурация микросомальных белков в присутствии глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида // Проблемы криобиологии.- 2005.- Т.15.- №3.- С.316-319.
4. Онищенко Е.В., Дюбко Т.С., Зинченко А.В. Спектрофотометрическое исследование влияния некоторых проникающих криопротекторов на белки микросом // Вісник Харк. ун-ту.- 2004.- №637. Біофізичний вісник.– Вип.1-2 (14).- С.105-111.
5. Онищенко Е.В., Дюбко Т.С., Семенченко А.Ю. Влияние низкомолекулярных криопротекторов и замораживания на флуоресцентные свойства микросомальных белков // Актуальные проблемы медицины и биологии.-Сб. науч. работ. Киев: КНМУ, 2004. - №1.- С. 106-117.
6. Onischenko E., Djubko T., Zinchenko A. Study of low temperature effect on rat liver microsomes using spectrofluorimetry // Proc. Internat. Conf. Criobiomol. – 2003. Low temperature biology, Coimbra – Portugal. 14-18 sept. 2003.- P.24-25.
7. Онищенко Е.В., Зинченко А.В. Влияние диметилсульфоксида на состояние белков микросомальных мембран // Тези доповідей 1 Укр. наук.конференції “Проблеми біологічної і медичної фізики”, ХНУ, Харків, Україна, 20-22 вер. 2004 р.- С.137.
8. Онищенко Е.В., Дюбко Т.С., Зинченко В.Д., Зинченко А.В. Влияние озона на компоненты микросомальных мембран // Сборник научных трудов IV Укр.

научно-практ. конф. “Совр. аспекты применения озона в медицине и экологии“, Вестник физиологии и курортологии.- 2005.- №5.- С.30-31.

9. Мусина И.А., Белых И.А., Онищенко Е.В., Зинченко В.Д., Дюбко Т.С.

Исследование влияния озона на биологические системы методами оптической спектроскопии // Тези доповідей 5 Харк. конф. мол. наук. “Радіофізика та НВЧ електроніка“, 14-16 грудня 2005 р., Харків.- С.51.