

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ДЮБКО Татьяна Станиславовна

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА И КРИОПРОТЕКТОРОВ
НА СТРУКТУРУ ЦИТОХРОМА P-450 И СОДЕРЖАЩИХ ЕГО МЕМБРАН

03.00.22 - криобиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Харьков - 1992

Работа выполнена в Институте проблем криобиологии
и криомедицины АН Украины

Научный руководитель: кандидат физ.-мат. наук,
старший научный сотрудник

О.А.Нардид

Научный консультант: доктор биологических наук,
профессор

В.А.Моисеев

Официальные оппоненты: доктор физ.-мат. наук,
профессор

Ю.П.Благой

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Л.Ф.Розанов

Ведущая организация: Институт фотобиологии АН Беларуси,
г.Минск

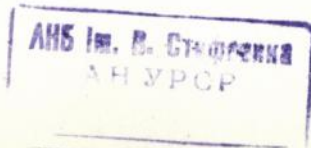
Защита состоится "23" декабря 1992 г. в 15 час. 30 мин.
на заседании Специализированного совета Д 016.60.01 по спе-
циальности "криобиология" в Институте проблем криобиологии и
криомедицины АН Украины по адресу: ЗІ0015, г.Харьков, ул.Пе-
реяславская, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Институ-
та проблем криобиологии и криомедицины АН Украины.

Автореферат разослан "20" ноября 1992 г.

Ученый секретарь Специализированного
совета, доктор медицинских наук


А.Н.Гольцев



ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00816965 (Z)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Исследование механизмов криорезистентности и криповреждений, поиск оптимальных условий криозащиты на различных уровнях структурной организации биологических объектов является актуальной задачей современной криобиологии, имеющей теоретическое и прикладное значение (В.И.Грищенко, 1985).

Анализ многочисленных экспериментальных исследований свидетельствует о том, что криповреждение биологических мембран сводится в основном к нарушению взаимодействия между главными структурообразующими элементами мембран – белками и липидами (А.М.Белоус, В.А.Бондаренко, 1982). В то время как термоиндуцированным структурным перестройкам липидного компонента мембран посвящено множество работ, влияние низких температур и криопротекторов на изменение структурно-функционального состояния мембранных, в особенности, интегральных белков, мало изучено. Сложность структурной организации природных мембран и, как следствие этого, неоднозначность интерпретации получаемых результатов, позволяющие лишь косвенно оценить роль интегральных белков в реакции биомембран на действие замораживания-отогрева и криопротекторов, диктует необходимость проведения исследований на модельных системах. В качестве такой системы нами были выбраны протеолипосомы, образованные фосфолипидами и интегральным микросомальным белком цитохромом P-450 LM2 (КФ I.14.14.I).

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение влияния замораживания-отогрева и низкомолекулярных криопротекторов на структурно-функциональное состояние изолированного и встроенного в искусственные мембраны цитохрома P-450, а также на структурное состояние искусственных фосфолипидных мембран, содержащих цитохром P-450.

В задачи работы входило:

- изучение влияния замораживания-отогрева на структурно-функциональное состояние изолированного цитохрома P-450;
- изучение влияния замораживания-отогрева, а также глицерина (ГЛ), 1,2-пропандиола (ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО) на структурно-функциональное состояние цитохрома P-450 в составе

искусственных мембран из яичного фосфатидилхолина (ФХ) и его смеси с фосфатидилсеринном (ФХ+ФС);

- изучение влияния замораживания-отогрева, солей и криопротекторов на структуру липидных бислоев, модифицированных цитохромом Р-450.

Научная новизна. Впервые установлено, что замораживание-отогрев цитохрома Р-450 в растворе, содержащем глицерин, и в составе ФХ-липосом приводит к конформационным перестройкам белка, выражающимся в повышении полярности окружения его гемовой группы и снижении структурной жесткости белковой глобулы. При этом наблюдается также снижение каталитической активности фермента. Показано, что действие замораживания-отогрева на структурно-функциональное состояние мембраносвязанного цитохрома Р-450 зависит от состава среды инкубации и липидного окружения белка. Наибольшую ферментативную активность цитохром Р-450 проявляет после замораживания-отогрева в условиях высокой ионной силы в липосомах, содержащих ФС. Обнаружено, что присутствие в бислое цитохрома Р-450 приводит к модификации взаимодействия искусственных мембран с низкомолекулярными криопротекторами, которая выражается в увеличении площади поверхности и объема неполярной области мембран. Наблюдаемые эффекты усугубляются при замораживании-отогреве протеолипосом в средах, содержащих исследованные криопротекторы.

Практическая ценность работы. Полученные экспериментальные данные найдут применение в разработке общей теории криозащиты биологических объектов, в создании эффективных методов криопротекции биологических мембран и цитохрома Р-450, а также в обосновании научных подходов к выбору основных компонент криозащитных сред.

Апробация работы. Основные положения и материалы диссертационной работы докладывались на конференциях молодых ученых Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины (Харьков, 1989, 1991), VI Всесоюзной конференции "Органические люминофоры и их применение в народном хозяйстве" (Харьков, 1990), VII Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1991), IV Всесоюзном совещании "Люминесцентный анализ и его аппаратное обеспечение" (Москва, 1992), II Международной конференции "Успехи современной криобиологии" (Харьков,

1992).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано II работ.

Структура и объем диссертации. Выполненные исследования являются частью плановых научных работ Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины по теме: "Исследование влияния температуры на структурное состояние изолированных и мембраносвязанных белков, в том числе в составе цитозоля и цитоскелета, на физико-химические процессы в среде инкубирования и на метаболизм в клетках с целью изучения криорезистентности клеточных структур" (шифр 2.2.6.9).

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 315 источников. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков и 17 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитохром P-450, форму LM2 выделяли из микросом печени индуцированных фенobarбиталом кроликов по методу *Hauger, Coon*, 1976. Очищенные препараты белков имели удельное содержание цитохрома P-450, равное 17-18 нм/мг белка и характеризовались одной полосой при электрофорезе в денатурирующих условиях.

В работе использовали яичный ФХ, ФС из мозга крупного рогатого скота (Предприятие по производству бактериальных препаратов, г. Харьков), пирен ("Serva", Германия), 4-диметиламинохалкон (ДМХ), 4-(*n*-диметиламиностирил-(1-додецилпиридиний *n*-толуолсульфонат (ДСП-12), *n*-терфенил (ПТФ) ("Zonde -I", г. Рига), глицерин ч.д.а. ("Реахим", г. Москва), 1,2-пропандиол (Кемеровское ПО "Химпром"), фармакопейный препарат диметилсульфоксида. Криопротекторы перед использованием дополнительно очищали.

Бислойные протеолипосомы, содержащие цитохром P-450 и фосфолипиды (ФХ или его смесь с ФС, 4:1, вес.%), а также безбелковые липосомы, необходимые для контрольных экспериментов,

получали методом диализа с холатом натрия (А.А.Ахрем и др., 1988). Протеолипосомы имели средний диаметр 80-100 нм, а соотношение белок:липид в них составляло 1:500, 1:1000, М/М.

Эффективность *N*-деметилирования амидопирина цитохромом Р-450 определяли спектрофотометрически по методу *Nashe* (1953).

Содержание цитохрома Р-450 в растворе и протеолипосомах рассчитывали из разностного спектра поглощения его карбокси-комплекса при 450 нм с коэффициентом экстинкции $91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометрах СФ-46 ("ЛОМО", г. Ленинград) и *Pye Unicam SP-8000* (Англия). Флуоресцентные измерения выполняли на спектрофлуориметрах *Hitachi MPF-2A* и *Hitachi F-4010* (Япония).

Замораживание-отогрев образцов объемом 1-3 мл со скоростью 150-200 °С/мин проводили быстрым погружением в азот в пластмассовых ампулах, отогрев - на водяной бане (40 °С) со средней скоростью ~ 40 °С/мин.

Эффективность тушения флуоресценции цитохрома Р-450 акрил-амидом оценивали по методу Штерна-Фольмера (Дж. Лакович, 1986).

Для характеристики эмиссионного спектра флуоресценции цитохрома Р-450 использовали параметры

$$A = (F_{315}/F_{365})_{296}, \quad B = (F_{315}/F_{365})_{280}, \quad \Delta = B - A, \quad (1)$$

Здесь F_{315} и F_{365} - интенсивность флуоресценции в спектре при длинах волн 315 и 365 нм соответственно, индексы при скобках - длины волн возбуждающего света; величина A определяется триптофановой флуоресценцией цитохрома Р-450, а величина Δ характеризует вклад тирозиновых остатков в спектр при $\lambda = 315$ нм (К.К. Туроверов и др., 1970; А.А. Ахрем и др., 1988).

Изменение площади поверхности мембран оценивали по переносу энергии между пиреном и ДСП-12, а изменение объема гидрофобной области мембран - по переносу энергии между ПТФ и пиреном, используя соотношения (Г.Е. Добрецов, 1989)

$$\frac{S_{\text{м}}}{S_0} \approx \frac{\ln(F_{\text{ФФ}}/F_{\text{ФДЛ}})}{\ln(F_{\text{ПТФ}}/F_{\text{ПДЛ}})} \cdot \left(\frac{F_{\text{ПТФ}}}{F_{\text{ФФ}}}\right)^{1/3}, \quad (2)$$

$$\frac{V_M}{V_0} \approx \frac{\ln(F_{00}/F_{00M})}{\ln(F_{MB}/F_{MBM})} \cdot \left(\frac{F_{MB}}{F_{00}}\right)^{1/2}, \quad (3)$$

где F_0 , F_{00} - интенсивность флуоресценции донора в отсутствие и в присутствии акцептора, а индексы "о" и "м" относятся к немодифицированным и модифицированным мембранам соответственно.

Статистическую обработку результатов производили по методу Фишера-Стьюдента на ЭВМ СМ-4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние замораживания-отогрева на структурно-функциональные свойства изолированного цитохрома Р-450

Исследования, выполненные на изолированном цитохроме Р-450 показали, что в результате замораживания-отогрева происходит снижение скорости \mathcal{N} -деметилирования амидопирина после 1-, 3- и 10-кратных циклов замораживания-отогрева (табл. I). При этом наблюдался также рост содержания каталитически неактивной формы фермента - цитохрома Р-420.

Таблица I

Влияние замораживания-отогрева
на активность цитохрома Р-450 в растворе

Количество циклов замораживания-отогрева	Активность цитохрома Р-450, % к контролю	P
I	82 ± 1,1	> 0,1
3	81 ± 1,3	> 0,1
10	72 ± 0,5	< 0,05

Анализ первых производных спектров поглощения цитохрома Р-450 в области Core показал, что после замораживания-происходит их смещение в коротковолновую область и снижение интенсивности, что отражает изменение микроокружения активного центра, обусловленное увеличением доступности гема цитохрома Р-450 ра-

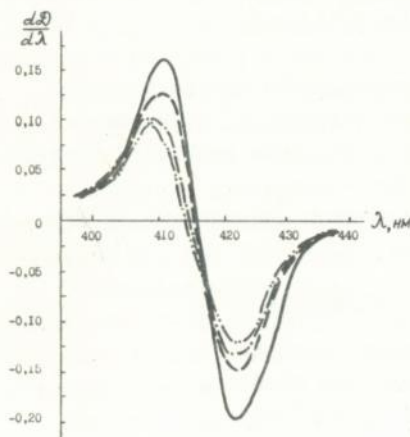


Рис. 1. Первые производные спектров поглощения изолированного цитохрома Р-450 после 1- (---), 3- (----) и 10-кратного (-·-·-) замораживания-отогрева.

зательством снижения структурной устойчивости фермента после замораживания является также обнаруженное увеличение его доступности денатурирующим агентам - перекиси водорода и мочевины. В то же время, после замораживания доступность белковых хромофоров изолированного цитохрома Р-450 нейтральному динамическому тушителю - акриламиду не изменилась (рис. 2), что может быть следствием изначальной доступности акриламиду тех поверхностных остатков, которые не тушатся водой до замораживания белка.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наблюдаемое в результате замораживания-отогрева снижение ферментативной активности цитохрома Р-450 в растворе сопровождается изменением его конформационного состояния, проявляющегося в увеличении доступности и полипептидных частей белковой глобулы растворителю.

створителю (Д.И.Метелица, 1982) (рис. 1).

Замораживание-отогрев изолированного цитохрома Р-450 приводят к длинноволновому смещению максимума его спектра флуоресценции, причиной которого является снижение вклада тирозиновой флуоресценции в суммарный эмиссионный спектр (табл.2). Поскольку положение, интенсивность и форма триптофановой флуоресценции при этом не изменились, наблюдаемое тушение тирозиновой флуоресценции мы связываем с повышением доступности растворителю поверхностных индольных групп в результате вызванного замораживанием-отогревом конформационного изменения белка. Косвенным доказательством снижения структурной устойчивости фермента после замораживания является также обнаруженное увеличение его доступности денатурирующим агентам - перекиси водорода и мочевины. В то же время, после замораживания доступность белковых хромофоров изолированного цитохрома Р-450 нейтральному динамическому тушителю - акриламиду не изменилась (рис. 2), что может быть следствием изначальной доступности акриламиду тех поверхностных остатков, которые не тушатся водой до замораживания белка.

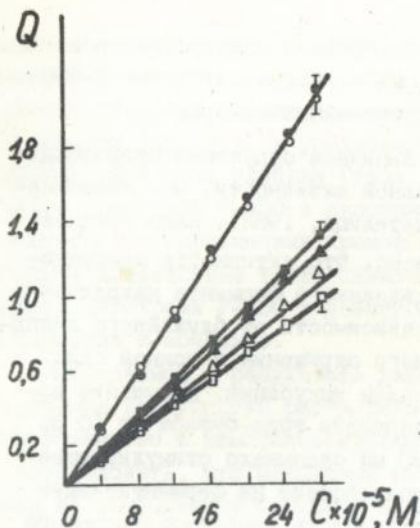


Рис. 2. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции цитохрома Р-450 акриламидом в растворе (о ●), в ФХ- (Δ ▲) и в ФХ+ФС-липосомах (□ ■). Заштрихованные обозначения относятся к замораживанию-отогреву.

Таблица 2.

Влияние замораживания-отогрева на форму и положение спектров флуоресценции цитохрома Р-450 в растворе и мембранах

Среда	А	В	Δ	λ макс. фл., нм	
				λ _{возб.} = 280 нм	λ _{возб.} = 296 нм
Трис-бу- фер	0,92	1,86	0,94	324,5	334,0
*	0,92	1,80	0,86	325,5	334,0
ФХ-липо- сомы	1,00	2,46	1,46	315,2	332,4
*	0,94	2,41	1,47	315,5	332,4
ФХ+ФС-ли- посомы	0,89	2,93	2,04	314,0	332,1
*	0,88	2,80	1,92	315,0	332,1

Примечание: * - после замораживания-отогрева. Среда инкубации - 30 мМ трис-буфер, рН 7,4.

Влияние замораживания-отогрева и криопротекторов на структурно-функциональные свойства цитохрома Р-450 в составе искусственных мембран

Перевод цитохрома Р-450 в липидное окружение сопровождается увеличением его ферментативной активности, что характерно для мембранных белков (Д.И.Метелица, 1982). Нами установлено,

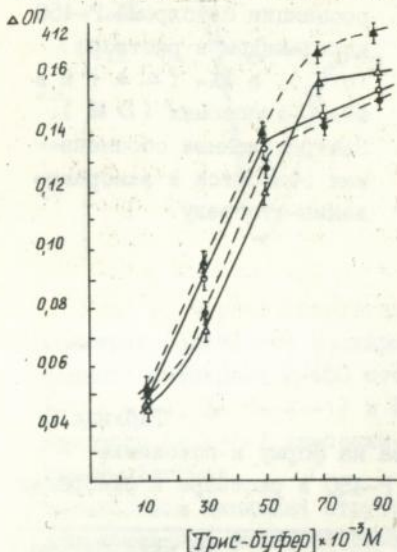


Рис. 3. Влияние замораживания-отогрева в условиях различной ионной силы на активность цитохрома Р-450 в ФХ- (о ●) и в ФХ+ФС- (Δ ▲) липосомах. Заштрихованные обозначения относятся к замораживанию-отогреву.

что активность мембрано-связанного фермента находится в зависимости от ближайшего липидного окружения и ионной силы среды инкубации. Повышение молярности трис-буфера от 10 до 90 мМ оказывало стимулирующее воздействие на ферментативную активность мембрановстроенного цитохрома Р-450 (рис. 3). Наблюдаемый эффект может быть обусловлен усилением под влиянием ионной силы гидрофобных взаимодействий в области активного центра цитохрома Р-450 (Л.М.Райхман и др., 1973), повышающих его сродство к субстрату I типа — амидопирину. Характер влияния замораживания-отогрева на активность цитохрома Р-450 в основном зависел от липидного окружения фермента и в меньшей степени — от ионной силы среды. Наибольшую каталитическую активность цитохром Р-450 проявлял при замораживании-отогреве в условиях высокой (70-90 мМ) ионной силы в липосомах, содержащих ФС. По-видимому, замораживание-отогрев индуцирует в ФХ+ФС-липосомах перестройки, приводящие в итоге к формированию более каталитически активной конформации фермента.

В результате замораживания-отогрева мембрановстроенного цитохрома Р-450 его спектры поглощения претерпевают коротко-

волновый сдвиг, а спектры флуоресценции белка смещаются в длинноволновую сторону, что обусловлено, как и в случае растворимого фермента, повышением полярности микроокружения гемовой области фермента и увеличением доступности растворителю полипептидной цепи глобулы (табл. 2). При этом, замораживание-отогрев цитохрома Р-450 в липосомах приводит к повышению доступности его тирозиновых хромофоров акриламиду. Низкотемпературное воздействие также снижает устойчивость мембраносвязанного цитохрома Р-450 к денатурирующему воздействию перекиси водорода и мочевины.

Наблюдаемое в результате действия замораживания-отогрева увеличение доступности растворителю гемовой и белковой частей изолированного и мембраностроенного цитохрома Р-450 позволяет предположить, что механизмы воздействия замораживания-отогрева на конформацию фермента в растворе и в составе мембран имеют одинаковую природу и проявляются в его "разрыхлении".

Таблица 3

Влияние криопротекторов и замораживания-отогрева на ферментативную активность цитохрома Р-450 в ФХ-липосомах

Криопротектор	Активность цитохрома Р-450, % к контролю	
	До замораживания	После замораживания
Контроль	100,0 ± 4,9	87,8 ± 9,8
+ 10 % ГЛ	173,2 ± 19,5	161,0 ± 14,9
+ 20 % ГЛ	173,2 ± 16,4	163,4 ± 12,2
+ 10 % ПД	158,5 ± 24,2	148,8 ± 4,9
+ 20 % ПД	212,2 ± 30,9	153,7 ± 12,3
+ 10 % ДМСО	90,2 ± 14,6	92,7 ± 6,0

Исследование влияния криопротекторов на каталитическую активность мембраносвязанного цитохрома Р-450 показало, что ГЛ и ПД при добавлении в среду инкубации протеолипосом в криозащитных концентрациях, способствуют ее повышению, в то время как ДМСО несколько снижал активность фермента (табл. 3). Замораживание-отогрев в средах, содержащих ГЛ и ПД, приводили к снижению каталитической активности фермента, которая, однако, оставалась выше контрольных значений. В то же время, в присут-

ствии ДМСО дополнительного снижения активности фермента после замораживания не происходило.

В присутствии криопротекторов спектры поглощения цитохрома Р-450 в области Соре смещаются в длинноволновую сторону и наблюдается повышение их интенсивности, что связывают с эффектом снижения полярности растворителя (H.Rein et al., 1980). Исследуемые криопротекторы оказывают также влияние на положение и форму спектров флуоресценции мембрановстроенного цитохрома Р-450, что выражается в увеличении вклада триптофановой флуоресценции в суммарный эмиссионный спектр (табл. 4). Замо-

Таблица 4

Влияние криопротекторов и замораживания-отогрева на форму и положение спектров флуоресценции цитохрома Р-450 в ФХ-липосомах

Воздействие	А	В	Δ	λ макс.фл., нм	
				λ _{возб.=280 нм}	λ _{возб.=296 нм}
Контроль	0,94	2,41	1,47	315,5	332,4
*	0,93	2,38	1,45	315,8	332,5
+ 20 % ГЛ	1,07	2,53	1,46	316,2	332,3
*	1,08	2,56	1,48	317,0	332,4
+ 20 % ПД	1,09	2,52	1,43	317,5	332,5
*	1,07	2,30	1,23	319,1	332,5
+ 20 % ДМСО	1,12	2,51	1,39	316,2	332,3
*	1,15	2,44	1,29	316,5	332,1

Примечание: * - после замораживания-отогрева.

раживание-отогрев цитохрома Р-450 в присутствии ГЛ не приводит к существенному изменению микроокружения хромофорных остатков мембраносвязанного белка. Анализ формы спектров флуоресценции показал, что наблюдаемое длинноволновое смещение суммарных эмиссионных спектров цитохрома Р-450 (λ_{возб.} = 280 нм) в результате замораживания-отогрева в средах, содержащих ПД и ДМСО, обусловлено преимущественно снижением вклада тирозиновой флуоресценции. Наблюдающееся также при этом увеличение доступности белковых хромофоров акриламиду позволяет пред-

положить, что в этом случае происходит повышение доступности цитохрома Р-450 растворителю, аналогичное наблюдаемому при замораживании-отогреве без криопротекторов.

Влияние замораживания-отогрева, криопротекторов и солей на структурное состояние искусственных мембран, модифицированных цитохромом Р-450

Обнаруженные изменения конформационного состояния цитохрома Р-450 под влиянием состава среды инкубации и замораживания-отогрева позволили предположить, что эти изменения могут оказывать влияние на структурное состояние бислоя, содержащего цитохром Р-450. Для проверки этого предположения нами было проведено исследование влияния замораживания-отогрева, криопротекторов и солей на структурное состояние липосом, содержащих цитохром Р-450, с использованием флуоресцентных зондов.

Исследование поверхностной области протеолипосом с помощью флуоресцентного зонда ДМХ показало, что замораживание-отогрев приводят к нарушению упаковки поверхности бислоя, проявляющейся в увеличении коэффициента поляризации и повышении гидрофобности микроокружения ДМХ (табл. 5). Присутствие ПД в среде инкубации протеолипосом также приводит к повышению гидрофобности микроокружения зонда. Сравнительный анализ спектров возбуждения и флуоресценции зонда в липосомах и протеолипосомах показал, что в присутствии ПД в протеолипосомах уменьшены количество и подвижность молекул воды, проникающих в слой карбоксильных групп жирнокислотных остатков липидов. Одним из возможных механизмов этого явления может быть изменение конформации белка, приводящее к формированию водно-криопротекторной "шубы" на поверхностных участках бислоя, окружающих белок, которая препятствует проникновению воды в область карбоксильных групп фосфолипидов.

При исследовании площади поверхности и объема неполярной области бислоя методом индуктивно-резонансного переноса энергии между локализующимися в различных областях бислоя парами пирен - ДСП-12 и ПТФ - пирен установлено, что при замораживании-отогреве протеолипосом площадь поверхности мембран существенно не изменяется (табл. 6). В то же время, добавление к протеолипосомам криопротекторов ГЛ, ПД и ДМСО приводит к уве-

Таблица 5

Влияние замораживания-отогрева и 1,2-пропандиола
на спектральные характеристики ДМХ в ФХ-липосомах и протеолипосомах,
образованных ФХ и цитохромом P-450**

Воздействие	Интенсивность флуоресценции F_m , отн. ед.	Коэффициент поляризации p	Полуширина спектра флуо- ресценции, нм	F_{497}/F_{540}	Положение мак- симула спектра флуоресценции $\lambda_{m, нм}$
Липосомы					
Контроль	1,000±0,005	0,066±0,001	92,5±0,25	0,73	532
*	1,090±0,008	0,094±0,002	95,0±0,61	0,74	532
+ 10 % ПД	0,918±0,006	0,091±0,010	90,0±0,12	0,69	534
*	0,843±0,009	0,103±0,004	90,0±0,12	0,68	534
Протеолипосомы					
Контроль	0,902±0,001	0,041±0,008	88,0±0,52	0,67	535
*	1,02±0,004	0,088±0,017	96,5±0,14	0,79	527
+ 10 % ПД	0,839±0,008	0,077±0,003	97,5±0,12	0,73	531
*	0,811±0,003	0,048±0,006	100,0±0,02	0,65	535

Примечания: * - после замораживания-отогрева.

** - липосомы и протеолипосомы формировали в среде: 10 мМ трис-буфер + 1 мМ ЭДТА + 5 мМ $MgCl_2$, pH 7,4. Различия по отношению к контрольным величинам достоверны ($P < 0,05$).

Таблица 6

Влияние замораживания-отогрева и криопротекторов
на структуру ФХ-липосом и протеолипосом,
образованных ФХ и цитохромом P-450

Воздействие	E_1	E_2	$\frac{S_{ж}}{S_0}$	$\frac{V_{ж}}{V_0}$
Липосомы				
Контроль			I	I
*	0,64	0,27	0,82	0,59
+ 20 % ГЛ	0,68	0,43	1,07	0,84
*	0,62	0,36	1,20	0,76
+ 20 % ПД	0,60	0,37	1,14	0,90
*	0,61	0,34	0,89	1,34
+ 20 % ДМСО	0,72	0,22	1,10	0,64
*	0,61	0,42	1,05	0,92
Протеолипо- сомы				
Контроль			I	I
*	0,69	0,47	0,96	1,40
+ 20 % ГЛ	0,73	0,35	1,11	1,23
*	0,65	0,42	0,94	1,62
+ 20 % ПД	0,74	0,34	1,30	1,24
*	0,58	0,30	1,22	1,94
+ 20 % ДМСО	0,63	0,27	1,23	1,24
*	0,62	0,30	1,20	2,02

Примечания: E_1 и E_2 - эффективность переноса энергии
между донорно-акцепторными парами пирен-ДСП-12
и ПТФ-пирен соответственно;

* - после замораживания-отогрева.

личению как площади поверхности, так и, в особенности, объема,
занимаемого неполярной областью бислоя. Это показывает, что су-
щественная модификация биомембран происходит уже на этапе их
эквilibрации с низкомолекулярными криопротекторами. Причем, оп-
ределяющую роль во взаимодействии криопротекторов с бислоем
играет наличие в последнем интегрального белка. Наименьшее де-

стабилизирующее влияние на бислой протеолипосом оказывал ГЛ, а наибольшее — ПД и ДМСО.

Одной из причин нарушения белок-липидных взаимодействий в биологических мембранах может быть также концентрирование солей при вымерзании воды (W.H. Fishbein, J.W. Winkert, 1977). Проведенное нами исследование влияния 30-минутной экспозиции протеолипосом в растворах, содержащих высокие концентрации KCl и $NaCl$ на состояние бислоя с использованием пирена и переноса энергии между локализуемой в области углеводородных цепей липидов парой ПТФ-пирен показало, что в концентрированных солевых растворах возрастает микровязкость бислоя; наиболее выражен этот эффект в средах, содержащих KCl . Кроме того, в протеолипосомах обнаружено изменение монотонного хода зависимостей коэффициента эксимеризации пирена и эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии с ПТФ на пирен в области концентраций солей 1,2–1,6 М. Сопоставление этих данных с результатами, полученными Е.Д. Розановой (1984), показавшей, что 1,35 М KCl и 1,4–1,5 М $NaCl$ вызывают необратимый конформационный переход изолированного липопротеинового комплекса цитохромоксидазы, переводящий ее в более криолабильное состояние позволяет предположить, что в наших экспериментах цитохром Р-450 претерпевает аналогичный переход.

Таким образом, полученные в работе результаты позволили сопоставить структурные и функциональные изменения изолированного и мембрановстроенного цитохрома Р-450 при замораживании в средах различного состава и найти связь наблюдаемых изменений с процессами, происходящими при этих воздействиях в липидном бислое, модифицированном цитохромом Р-450.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что замораживание-отогрев изолированного и встроенного в ФХ-липосомы цитохрома Р-450 приводит к снижению его ферментативной активности. Увеличение ионной силы среды инкубации протеолипосом до 70–90 мМ трис-буфера способствует сохранению активности цитохрома Р-450 в процессе замораживания-отогрева.

2. Присутствие глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфок-

сида в среде инкубации протеолипосом приводит к меньшему ингибированию активности фермента в результате замораживания-отогрева по сравнению с замораживанием без криопротекторов.

3. Показано, что замораживание и последующий отогрев цитохрома Р-450 в растворе и в составе ФХ-липосом приводит к изменению конформации белка, сопровождающейся повышением полярности окружения гемовой группы и увеличением доступности растворителю полипептидной цепи глобулы. Аналогичные изменения структурного состояния полипептидной цепи цитохрома Р-450 наблюдались при замораживании в присутствии исследованных криопротекторов.

4. Замораживание-отогрев протеолипосом, образованных цитохромом Р-450 и ФХ, не оказывает существенного влияния на площадь поверхности искусственных мембран, в то же время повышая объем их гидрофобной области.

5. Установлено, что присутствие в среде инкубации протеолипосом глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида приводит к увеличению площади поверхности и объема неполярной области липидного бислоя. Наиболее выраженным этот эффект был при замораживании-отогреве протеолипосом в присутствии криопротекторов.

6. Обнаружено, что инкубация протеолипосом, содержащих в качестве белкового компонента цитохром Р-450 при комнатной температуре в растворах, содержащих *HCl* и *NaCl*, приводит к возрастанию микровязкости гидрофобной области бислоя, более выраженной в средах, содержащих *HCl*.

СПИСОК

работ, опубликованных по теме диссертации

1. Дюбо Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А., Моисеев В.А. Исследование влияния цитохрома Р-450 на структуру липидного бислоя с помощью флуоресцентных зондов//VI Всесоюзная конфер. "Органические люминофоры и их применение в народном хозяйстве": Тез. докл.- Харьков, 1990.- С. 56.

2. Дюбо Т.С., Нардид О.А., Моисеев В.А. Исследование влияния 1,2-пропиленгликоля на липид-белковые взаимодействия в искусственных мембранах с использованием 4-диметиламинохалкона// VII Всесоюзная конфер. "Органические люминофоры и их применение

в народном хозяйстве": Тез. докл.- Харьков, 1990.- С. 81.

3. Горбенко Г.П., Дюбо Т.С., Нардид О.А., Моисеев В.А. Исследование взаимодействия цитохрома Р-450 с фосфолипидами методом флуоресцентной спектроскопии// Биополимеры и клетка.- 1991, № 1.- С. 52-54.

4. Горбенко Г.П., Дюбо Т.С., Нардид О.А. Влияние криопротекторов на липид-белковые взаимодействия в модельных системах// Физико-химические процессы в криобиологических системах/Сб. научных тр.- Харьков, 1991.- С. 14-19.

5. Дюбо Т.С., Нардид О.А. Влияние ионной силы и липидного состава на каталитическую активность нативного и замороженного цитохрома Р-450//Физико-химические процессы в криобиологических системах/Сб. научных тр.- Харьков, 1991.- С. 31-39.

6. Дюбо Т.С., Нардид О.А., Моисеев В.А. Влияние замораживания на собственную флуоресценцию цитохрома Р-450 в протеолипосомах различного состава//УП Всесоюзная конференция по спектроскопии биополимеров: Тез. докл.- Харьков, 1991.- С. 89.

7. Дюбо Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А. Действие замораживания и проникающих криопротекторов на структуру протеолипосом//П-я Международная конференция "Успехи современной криобиологии": Тез. докл.- Харьков, 1992.- С. 62-63.

8. Нардид О.А., Репина С.В., Дюбо Т.С. Исследование влияния замораживания-отогрева на конформацию мембраносвязанных белков методом собственной флуоресценции//П-я Международная конференция "Успехи современной криобиологии": Тез. докл.- Харьков, 1992.- С. 124.

9. Дюбо Т.С., Нардид О.А. Влияние цитохрома Р-450 на свойства липидного бислоя при воздействии замораживания и 1,2-пропиленгликоля//Действие холода на биологические объекты/Сб. научн. тр.- Киев: Наукова думка, 1992.- С. 5-9.

10. Дюбо Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А. Исследование взаимодействия криопротекторов с модельными мембранами методом флуоресцентных зондов//IV Всес. совещание "Люминесцентный анализ в биологии и медицине и его аппаратурное обеспечение": Тез. докл.- Москва, 1992.- С. 15.

11. Нардид О.А., Дюбо Т.С., Моисеев В.А. Исследование влияния замораживания и органических добавок на флуоресценцию цитохрома Р-450 в мембранах из ДМФХ//IV Всес. совещание "Люминес-

центный анализ в биологии и медицине и его аппаратурное обеспечение": Тез. докл.- Москва, 1992.- С. 16.

Гриценко

Ответственный за выпуск академик АН Украины,
директор ИПКИК АН Украины В.И. Гриценко

Подп. к печ. 18.II.1992 г. Формат 60x84 1/16 Усл.печ.л.1,0
Печать офсетная. Тираж 100 экз. Зак. № 165.

Отпечатано на ротапринте ФТИИТ АН Украины, Харьков, пр.Ленина, 47

169199

Ab 26.289

AB 26.289