

Національна академія наук України

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

На правах рукопису

Науменко Євгенія Йосипівна

ВІЛИВ СКЛАДУ РОЗЧИННИКА І ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДІГРІВУ
НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
БЕЗУДОВАНОЇ В ШТУЧНІ МЕМБРАНИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ

03.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук



Дисертація в рукописі.

Роботу виконано в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Віктор Олександрович МОЙСЄВ

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Геннадій Федорович Жегунов
кандидат біологічних наук, доцент
Александр Леонідович Марковський

Провідна організація: Фізико-технічний інститут низьких температур ім.Б.І.Веркіна НАН України

Захист відбудеться "10" квітня 1996 р. на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 50.21.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, ЗІООІ5, Харків, вул. Перяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Автореферат розіслано "12" березня 1996 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук, професор

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

А.М.ГОЛЬЦЕВ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність та ступінь дослідженості тематики дисертації.

Актуальною проблемою кріобіології є з'ясування молекулярних механізмів кріопшкодження та кріорезистентності, пошук оптимальних умов кріозахисту біологічних об'єктів.

Аналіз механізмів кріопшкодження на відмінних рівнях біологічної організації виявив, що дія низьких температур чинить значний вплив на структурно-функціональний стан біологічних мембран (Белоус А.М., 1982; Гулевский А.К., 1983). На рівні клітинних та внутрішньоклітинних мембран основною причиною модифікації їх функціонування внаслідок заморожування-відігріву з'являється ініційоване зниженням температури та супутніми факторами порушення ліпід-ліпідних та ліпід-білкових взаємодій (Araki T., 1977; Stone J.N., 1989). Внаслідок цього зростає проникливість мембран в областях білок-ліпідних контактів, підвищується доторканість мембранних білків розчинювачу (Fink A.L., 1981).

Отримані на теперішній час дані свідчать про те, що в забезпеченні специфічності білок-ліпідних взаємодій важливу роль відіграють фізико-хімічні властивості ліпідів, особливості структурної організації білків, а також загальна топологія білкових і ліпідних молекул. Структура ліпідів і білків настільки близько взаємопов'язана в ліпопротеїновому комплексі, що зміна властивостей одного з компонентів призведе до зміни властивостей іншого.

Сказане у повній мірі відноситься також до дослідження впливу кріопротекторів на біологічні мембрани. Існуючі на теперішній час в літературі дані свідчать, що кріопротектори не являються індиферентними у відношенні біологічних мембран (Аксе-

нов С.И., 1985). модифікую ліпід-ліпідні та ліпід-білкові взаємодії. Дані, отримані на розчинних білках свідчать, що ці речовини здатні взаємодіяти з білками та сорбуватися на їх поверхні (Моисеев В.А., 1985), частково заміняючи гідратну воду. Бкрай мало в літературі робіт, присвячених дослідженню впливу кріопротекторів на ліпідні бішари, модифіковані білками.

Необхідним етапом з'ясування молекулярних механізмів кріопшкодження мембран є дослідження впливу низьких температур та пов'язаних з їх впливом факторів на білок-ліпідні комплекси. Доцільність таких досліджень підтверджується даними про змінення активності ряду мембранозв'язаних ферментів після заморожування клітин та клітинних органел. Одним з важливіших ферментів внутрішньої мембрани мітохондрій є цитохромоксидаза (ЦХО) - термінальна ділянка дихального ланцюгу, пов'язаного з ланцюгом окислювального фосфорилування. Дослідження стану цього ферменту в тканинах після заморожування свідчать про зниження його активності. У роботах, виконаних на ізольованому ліпопротеїновому комплексі встановлено, що заморожування до -20°C може спричиняти змінення структури ферменту (Розанова Е.Д., 1984), внаслідок впливу концентрованих розчинів солей при виморожуванні води. Складність структурної організації природних мембран, та внаслідок цього, неоднозначність інтерпретації отриманих результатів, дозволяє лише побічно оцінити роль інтегральних білків в реакції біомембран на дію заморожування-відігріву і кріопротекторів, диктує необхідність проведення досліджень на модельних системах. Мабуть, дослідження, які здійснюються на таких системах, будуть сприяти з'ясуванню особливостей механізмів впливу охолодження на інтегральні білки у складі мембран та в ізольо-

ваному стані.

Як модельні системи нами були вибрані протеоліпосоми, що утворивались фосфоліпідами та інтегральним білком ЦХО (ЕС І.9.3.І.).

Мета та завдання дослідження. Метою цієї роботи з'явилося дослідження впливу заморожування-відігріву, концентрованих розчинів солей та низькомолекулярних кріопротекторів на структурно-функціональний стан ЦХО, яку було вбудовано у лецитинові ліпосоми, а також на стан штучних фосфоліпідних мембран, що містять ЦХО.

Були встановлені наступні завдання дослідження:

1. Вивчити вплив заморожування-відігріву в середовищах з різним солевим складом на структурно-функціональний стан ЦХО, що вбудована у ліпосоми.

2. Дослідити особливості структурно-функціонального стану ЦХО, вбудованої в ліпосоми при впливі різних концентрацій солей і кріопротекторів.

3. Встановити можливість кріопротекції вбудованої в ліпосоми ЦХО за допомогою гліцерину і І,2-пропандіолу (І,2-ПД).

4. Вивчити вплив заморожування-відігріву, солей і кріопротекторів на стан протеоліпосом.

Теоретична і практична цінність дослідження та його наукова новизна.

Вперше встановлено, що повільне заморожування протеоліпосом, які містять ЦХО, спричиняє часткову інактивацію (40 %) ферменту, що супроводжується зміною конформації білка в області гемів α_1 і α_2 , які входять до складу активного центру ЦХО.

Виявлено, що високі концентрації NaCl і KCl (вище 1,2 М)

спричиняють зміну конформації ЦХО, вбудованої у ліпосоми, що супроводжується інактивацією ферменту. Вплив концентрованих розчинів солей неоднаковий при 8 і при 24 °С, що певно обумовлено існуванням конформаційного температурного переходу при 22 °С.

Дослідження, здійснюване з визначенням відносних змін параметрів ліпосом, встановило взаємозв'язок між конформацією білка і станом ліпосом та підтвердило припущення про можливість інактивуючого впливу розчинів солей на ЦХО.

Вивчення впливу заморожування-відігріву на ЦХО, яка вбудована у лецитинові ліпосоми, в розчинах, що містять 1,2-ЦД і гліцерин показало, що ферментативна активність зберігається при заморожуванні в 30 х-них розчинах кріопротекторів.

Отримані експериментальні дані зможуть знайти застосування при подальшому фундаментальному дослідженні механізмів кріозахисту біологічних об'єктів, у розробці ефективних методів кріопротекції біологічних мембран.

Апробація та публікація результатів досліджень. Основні положення дисертаційної роботи докладалися і обговорювалися на: VI Загальносоюзній конференції по спектроскопії біополімерів (Харків, 1988); VII Загальносоюзній конференції по спектроскопії біополімерів (Харків, 1991); II Міжнародній конференції "Успіхи сучасної кріобіології" (Харків, Україна, 1992); і з'їзді біофізичного товариства (Київ, 1994). По темі дисертації опубліковано 8 наукових робіт.

Структура і обсяг роботи. Дисертація викладена на 134 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, 3 глав обзору літератури, 3 глав результатів власних досліджень та їх обговорювання, закінчення, висновків та списку літератури.

Робота містить 36 малюнків і II таблиць. Список літератури наліковує 262 джерела.

Особистий внесок дисертанта в виконання роботи та основні положення, що виносяться на захист. Особистий внесок дисертанта у розробку наукових результатів полягає в повністю самостійному виконанні всього обсягу експериментальної роботи, статистичній обробці отриманих даних та їх оцінці. На підставі аналізу результатів експерименту та співставлення їх з даними літератури дисертантом сформульовані такі положення, що виносяться на захист:

1. Повільне заморожування суспензії протеоліпосом спричиняє часткову інактивацію вбудованої ЦХО, що супроводжується зміною конформації білка в області гемів a_1 і a_3 . При високих швидкостях охолодження такі процеси спостерігаються тільки при присутності в розчині хлоридів Na і K .

2. Розчини хлоридів Na і K (в концентраціях вище $1.2 M$) спричиняють необоротні конформаційні переходи вбудованої у лецитинові ліпосоми ЦХО, які супроводжуються інактивацією ферменту. Зміни протеоліпосом, що спричинені концентрованими сольовими розчинами при $8^\circ C$, аналогічні спостерігаемим при заморожуванні протеоліпосом.

3. Гліцерин і $1.2-PD$ запобігають конформаційним змінам ЦХО, спричиненим заморожуванням. Білок-ліпідні взаємодії стабілізуються тільки 30% -ним розчином $1.2-PD$.

Методологія, методи дослідження предмету і об'єкту. ЦХО з серця великої рогатої худоби вилучали за методом King з деякими модифікаціями (Jong F. C., 1972). Для визначення чистоти препарату використовували загальноприйнятну характеристику спектрів

поглинання при 280 нм і 418 нм. В отриманих препаратах E_{280}/E_{418} було в межах 2.5 - 2.6, що свідчить про достатню ступінь очищення білка.

Бішарні протеоліпосоми, які вміщують ЦХО і фосфоліпід отримували за методом діалізу в присутності холату натрія (Kowato s., 1981). Вагове співвідношення білок/ліпід складало 1:1. Контроль за вбудованням в ліпосоми ферментом здійснювали за методом визначення активності ЦХО, яка повинна перевершувати активність ферменту в розчині в 4 рази.

Функцію ЦХО характеризували за допомогою електронпередаючої здібності. Активність вимірювалася спектрофотометрично залежно від зміни поглинання відновленого цитохрому С при 550 нм за методикою (Yonetani T., 1965). Концентрацію білків визначали за допомогою спектрофотометрії; ЦХО при 418 нм (ϵ мМ = 79), цитохрому С - при 550 нм (ϵ мМ = 27,7).

Для характеристики структури ЦХО використовували методи диференціальної та температурної пертурбаційної диференціальної (ТЦДС) спектрофотометрії (Демченко А.П., 1981). У ряді експериментів після заморожування-відігріву і після впливу охолодження застосовували чисельне диференціювання спектрів поглинання ЦХО та порівнювали форму їх перших похідних. Параметром, що характеризував конформацію білка, були спектри поглинання в області смуги Core. При поясненні впливу складу розчинів на ЦХО вважали, що порушення лінійності і структури спектрів свідчать про зміну конформації білка.

Для виявлення температурних конформаційних переходів вивчали температурну залежність інкременту екстинції, котрий є відношенням приросту екстинції при зміні температури на 1 °С до зна-

чення екстинкції в максимумі поглинання (Демченко А.П., 1981). Область конформаційного переходу визначалась за зміною форми ТПДС.

Морфологічні дослідження протеоліпосом проводили за допомогою електронно-мікроскопічного методу заморожування-скалування на установці, яка описана Релінім Н.В. в 1984 р.

Власне зміну розмірів протеоліпосом характеризували за допомогою питомої мутності $\tau = 2,303 E_{500\text{nm}}/C_{\text{ліпідів}}$ та параметру $\beta = 4,16 - (1 \pm (E_{500\text{nm}}/E_{550\text{nm}}))/(1 \pm 500/550)$, залежного від радіусу ліпосом за методикою, яка описана в статті (Chong C.S., 1976). Заморожування протеоліпосом здійснювали у пластмасових пробірках об'ємом 3 мл. Швидке охолодження досягалось зануренням склянки з суспензією ліпосом в рідкий азот. Середня швидкість охолодження при цьому становила 70 °С/хвил. Повільне заморожування здійснювали в парах азоту до -30 °С з середньою швидкістю 2 °С/хвил. Відігрів ЦХО учиняли у водяній бані при температурі 20 °С. Заморожування-відігрів ЦХО проводили в середовищах, основою яких був Na-фосфатний буфер, що утримував неоднакові концентрації солей і кріопротекторів.

Концентрація ферменту в цих дослідах зберігалась постійною на рівні 4-6 мкМ.

Статистичну обробку результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера.

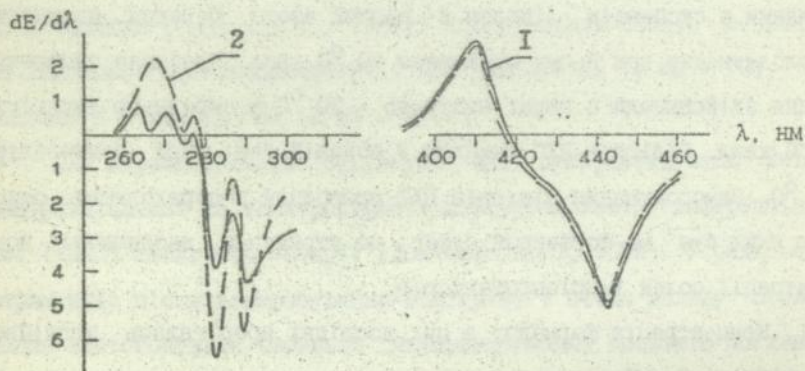
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГРУНТУВАННЯ

Вплив заморожування-відігріву на структурно-функціональні параметри ЦХО в ліпосомах

За допомогою електронно-мікроскопічного методу заморожуван-

ня-скадування ми отримали результати, які показали, що препарати ліпосом, які вивчались в роботі, складаються переважно з індивідуальних сферичних зразків з варьйруєним діаметром 0,4 - 0,7 мкм. Активність ферменту після вбудування в ліпідний бішар перевершує його активність у розчині в 4 рази, що відповідає літературним даним (Kawato s. . 1981).

Перша похідна спектрів поглинання ЦХО, яка знаходиться в складі ліпосом, має максимум при 408 нм, мінімум при 440 нм і практично не відрізняється від параметрів ЦХО в розчині. В той же час спектр поглинання вбудованого у ліпосоми білка в УФ-області змінюється (мал. 1).



Мал. 1. Перші похідні спектри поглинання ЦХО.
1 - в розчині. 2 - у складі ліпосом.

Як свідчать спектри поглинання, процес вбудування ЦХО в ліпосоми з ячного лецитину призводить до зміни конформації білка, яка не відіграє на ступені його активності.

ЦХО в розчині має конформаційний перехід при 20 °С, який зачіпає білкову частину макромолекули. Вбудована у ліпосоми ЦХО має додатковий конформаційний перехід в області 10-12 °С. Зроб-

лен висновок, що конформаційний перехід в області 10-12 °С торкається не тільки білкової частини комплексу, але й області гемів, що свідчить про температурну лабілізацію внутрішніх областей білка.

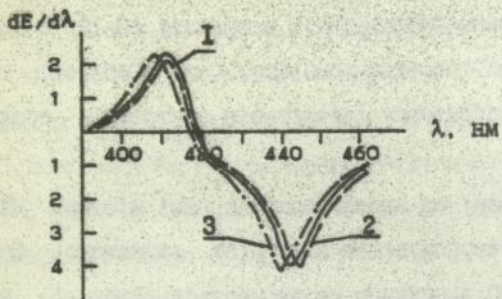
Дослідження, виконані на протеліпосомах, які містять ЦХО, показали, що внаслідок заморожування-відігріву (швидкого) ферментативна активність ЦХО практично не змінюється (табл. I), навіть після 2-кратних циклів заморожування-відігріву. Однак, спектр поглинання ферменту в області смуги Сорє поширюється.

Таблиця I

Вплив швидкого та повільного заморожування на ферментативну активність ЦХО та параметри ліпосом

| Ц Х О | Склад розчину | Активність, % до контр. | β | τ/c |
|------------------------|---------------|-------------------------|----------|----------|
| Швидке заморожування | | | | |
| Контроль | 0,05 М-фосфат | 100 | 1,94±0,2 | 1,39±0,1 |
| 1-разове | " | 98±2 | 2,05±0,1 | 1,13±0,1 |
| 2-разове | " | 95±3 | 2,11±0,2 | 0,98±0,1 |
| Повільне заморожування | | | | |
| Контроль | " | 100 | 1,79±0,1 | 0,92±0,1 |
| 1-разове | " | 78±4 | 1,86±0,2 | 0,77±0,1 |
| 2-разове | " | 65±2 | 2,05±0,1 | 0,75±0,1 |

Аналіз перших похідних спектрів поглинання ЦХО дозволив з'ясувати, що після заморожування зміна спектру відбувається за рахунок зміщення в довгохвильовий бік мінімуму першої похідної (мал. 2). Враховуючи те, що у спектр поглинання ЦХО дають внесок два гени: гем α з максимумом при 430 нм і гем α_3 - з максимумом при 410 нм, можна припустити, що зміна конформації ЦХО відбува-



Мал. 2.

Перші похідні спектрів поглинання ЦХО після заморожування.

- 1 - контроль;
2 - швидке заморожування;
3 - повільне заморожування

ється в області гему а. Причому, ці зміни відбуваються незалежно від того, знаходиться ЦХО в розчині, або вбудована в лецитинові ліпосоми.

Вивчення температурних залежностей спектрів поглинання ЦХО в ліпосомах показало, що після швидкого заморожування протеоліпосом температурний перехід в області 20-2 °С зміщується в бік високих температур на 2-4 °С. Температурний перехід в області 10-12 °С - відсутній.

Повільна швидкість охолодження протеоліпосом приводить до падіння ферментативної активності на 40 % (див. табл. 1). Цей факт посилюється із збільшенням числа циклів заморожування-відігріву.

Після повільного заморожування протеоліпосом спостерігається змінення спектру поглинання ферменту в області смуги Сор_е. Аналіз перших похідних спектру поглинання ЦХО показав, що після заморожування відбувається зміщення всього спектру у короткохвильовий бік, що свідчить про зміну конформації ферменту в області гемів а₁ і а₂ (див. мал. 2).

Характеристика ліпосом після впливу заморожування змінюється. Спостерігається утворення більш великих неагрегованих лі-

посом за рахунок уливання менших за розмірами (див. табл. I). Дані, отримані за допомогою електронно-мікроскопічного методу, свідчать про однорідність розмірів ліпосом після заморожування.

Значну роль у пошкодженні структури мембран і ліпідного бішару при заморожуванні відіграють концентровані розчини солей. Відомо, що ЦХО в розчині інактивується при швидкому заморожуванні в присутності хлоридів Na і K . Для моделювання реального клітинного середовища ми досліджували вплив заморожування-відігріву на ЦХО в ліпосомах при доданні в буферне середовище солей NaCl і KCl в концентраціях 0,1 М.

Швидке заморожування протеоліпосом в присутності хлоридів цих солей в середовищі заморожування приводить до зниження ферментативної активності на 10-20 %. Аналіз перших похідних спектрів поглинання ЦХО в ліпосомах в області Core показав, що після швидкого охолодження протеоліпосом в присутності NaCl і KCl в концентраціях 0,1 М спостерігається зміщення мінімуму першої похідної в короткохвильовий бік. Відбувається зміна конформації ЦХО в області α .

Повільне заморожування протеоліпосом в присутності хлоридів Na і K приводить до значної інактивації ЦХО і до короткохвильового зміщення мінімуму і максимуму першої похідної спектрів поглинання ЦХО у складі ліпосом, що свідчить про зміну конформації ЦХО в областях-гемів α і α_3 .

Заморожування ліпосом в присутності NaCl не чинить впливу на вивчаємі параметри, але в присутності KCl спостерігається зміни аналогічні тим, що відбуваються при заморожуванні в фосфатному буфері.

Таким чином, при менших швидкостях заморожування спостері-

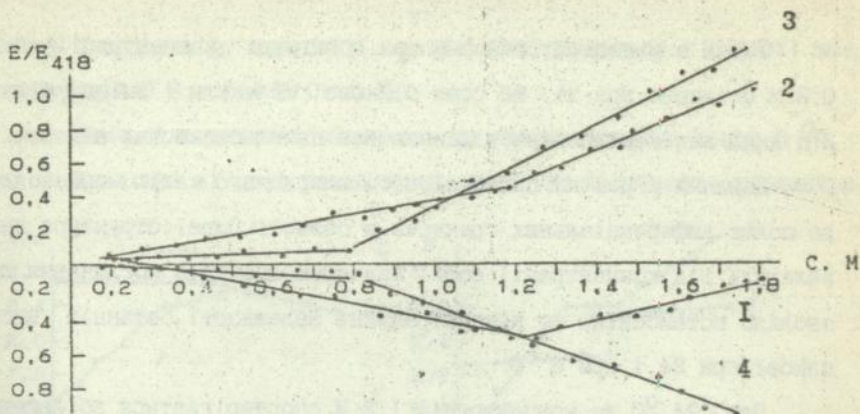
гаються більш виражені зміни структурно-функціональних параметрів ЦХО і ліпосом, а також їх залежність від сольового складу середовища. Для підтвердження цього припущення було проведено більш докладне вивчення впливу властивостей розчинів на ЦХО.

Структурно-функціональні характеристики вбудованої в ліпосоми ЦХО в розчинах хлоридів Na і K

Як було показано вище, при впливі заморожування на ЦХО в присутності солей має місце зміна досліджених параметрів ферменту та ліпосом. Відомо, що ряд катіонів та аніонів, які в малих концентраціях необхідні для підтримки структури і функції білка, можуть спричиняти пошкоджуючу дію при високих концентраціях (Моисеев В.А., 1980; Герман М.Л., 1988). Для підтвердження цього припущення було проведене більш докладне дослідження впливу розчинів солей $NaCl$ і KCl в концентраційних межах від 0 до 2 М на ЦХО в ліпосомах при 8 та 24 °С.

Вивчення спектрів поглинання ЦХО в області Core дозволило встановити, що концентраційні залежності останніх різні при 24 та 8 °С. При 24 °С спостерігається збільшення інтенсивності спектру поглинання пропорційно концентрації в розчині зі зміною нахилу прямої в області 0,8 М (мал. 3). При досягненні цієї концентрації спостерігається зміщення спектру поглинання в короткохвильовий бік, що особливо добре помітно на перших похідних спектрів поглинання. Вивчення ферментативної активності також показало, що її зниження спостерігається після експозиції в розчині $NaCl$ з концентрацією, яка перевершує 0,8-0,9 М.

Дані спектрофотометричних досліджень включають досить багату кількість ознак, які свідчать про те, що при концентраціях 0,8



Мал. 3. Залежність інтенсивності різнісних спектрів поглинання ЦХО від концентрації солей та температури.

1 - KCl, 8 °C; 2 - KCl, 24 °C; 3 - NaCl, 8 °C;
4 - NaCl, 24 °C

-0.9 M відбувається конформаційний перехід (Морозова Т.Ф., 1982).

Оскільки відомо, що дія солей залежить від температури, нами був вивчен вплив хлориду Na на ЦХО, вбудовану в ліпосоми при 8 °C.

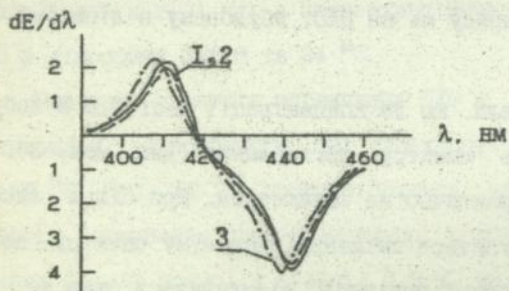
Дослідження показали, що до концентрації NaCl 0.8 M набуває зменшення інтенсивність спектру поглинання (див. мал. 3), при цьому його структура практично не змінюється. При більш високих концентраціях спостерігається зміщення максимуму спектру поглинання та екстремумів першої похідної, відмічається злам на концентраційній залежності інтенсивності диференціальних спектрів. Наведені дані дозволяють вважати, що в області цих концентрацій солі відбувається конформаційний перехід ЦХО. Більш низьке значення концентрації NaCl у даному випадку, ніж для білка в розчині (1,4 M) свідчить про те, що в ліпідному бішарі ЦХО менш стійка до впливу солі, ніж в розчині детергенту (Розанова Е.Д., 1991).

Зміна в поведінці ліпосом при досягненні концентрації солі 0,8 М свідчить про те, що стан білкової молекули і зміна біологічних взаємовідношень відбиваються на властивостях ліпосом.

Додання в розчин протеоліпосом хлористого калію призводить до появи диференціальних спектрів в області Соре, структура яких залежить від концентрації солі. Вивчення спектрів поглинання дозволило встановити, що концентраційні залежності останніх неоднакові при 24 і при 8 °С.

При 24 °С до концентрації 1,2 М спостерігається збільшення інтенсивності спектру поглинання пропорційно концентрації солі. Потім набуває різкого збільшення інтенсивність спектру (див. мал. 3).

При досягненні концентрації КСІ 1,2 М спостерігається також зміщення спектру поглинання в короткохвильовий бік (мал. 4).



Мал. 4.

Перші похідні спектрів поглинання ЦХО в присутності КСІ при 24 °С.

1 - контроль;

2 - 0,56 М;

3 - 1,9 М.

Аналізую дані диференціальних спектрів можна припустити, що збільшення їх інтенсивності зумовлено зміною властивостей середовища, а в області концентрації 1,2 М має місце конформаційний перехід, який зачіпає геми a і a_3 .

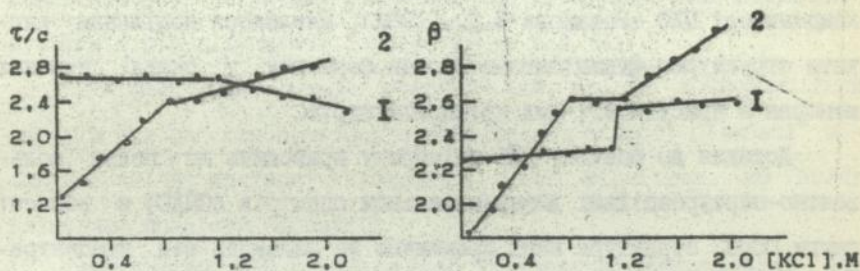
Вивчення активності ЦХО після експозиції при 24 °С з різними концентраціями КСІ виявило падіння активності ферменту.

Що стосується самих ліпосом, то видно вплив КСІ на їх стан,

який приводить до агрегації, котра призупиняється в області концентрацій 0.8 - 1.4 М (мал. 5).

Нами було вивчено вплив KCl на протеоліпосоми і при 8 °С.

Аналізую ці дані можна припустити, що в області концентра-



Мал. 5. Концентраційні залежності параметрів ліпосом в присутності KCl .

1 - 8 °С; 2 - 24 °С

ції 1.2 М відбувається конформаційний перехід, який торкається гемів α і α_3 (див. мал. 4).

Вплив KCl при 8 °С на ЦХО приводить до падіння активності ферменту після експозиції в розчинах з концентрацією, яка перевершує 1.4 М.

KCl викликає процес злиття ліпосом в більш великі. Активність цього процесу значно збільшується при концентрації солі вище 1.2 М (див. мал. 5).

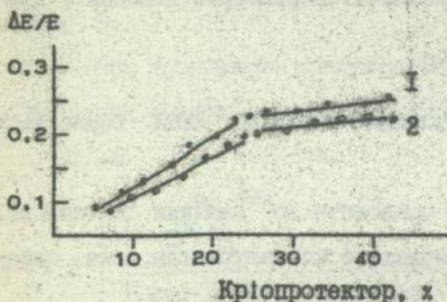
Таким чином, порівнюючи наведені результати в цьому розчині з результатами заморожування протеоліпосом у різних сольових середовищах, можна зробити висновок, що заморожування в розчинах, які містять $NaCl$ і KCl , викликає такі ж зміни, які відбуваються при впливі концентрованих розчинів цих солей при 8 °С.

Вплив кріопротекторів на ЦХО у складі ліпосом

Відомо, що кріопротектори чинять вплив на фізико-хімічні па-

раметри ліпідного бішару, модифікують ліпід-ліпідні та ліпід-білкові взаємодії у модельних та природних мембранах (Rodolph Alan S., 1986). Оскільки гліцерин та 1,2-ПД здатні запобігати змінам, спричиняємим заморожуванням-відігрівом білок-ліпідному комплексові ЦХО (Розанова Е.Д., 1984), уявлялося доцільним вивчити структурно-функціональний стан ферменту у складі штучних мембран в присутності цих кріопротекторів.

Додання до розчину ЦХО гліцерину приводить до появи сольвентно-пертурбаційних диференціальних спектрів (СПДС) в області смути Core, структура яких практично не залежить від концентрації кріопротектора в розчині (мал. 6).



Мал. 6.
Залежність інтенсивності СПДС ЦХО від концентрації кріопротекторів.
1 - гліцерин;
2 - 1,2-ПД

Порушення лінійності концентраційної залежності спостерігається при концентрації гліцерину 22-28 х. При цьому структура диференціальних спектрів була однаковою при концентраціях вище та нижче критичної. Ми припускаємо, що порушення лінійної залежності СПДС пов'язане не зі зміною конформації білка, а зі зміною доторканості хромофорів гліцеринові внаслідок адсорбції молекул кріопротектору на поверхні ліпосом (Моисеев В.А., 1985).

При концентраціях гліцерину нижче тих, при котрих спостерігається злам на концентраційній залежності інтенсивності СПДС, відбувається зміщення температурного переходу при 20 °C в бік

високих температур. При підвищенні концентрації гліцерину цей конформаційний перехід не спостерігається. Проте, злам на температурній залежності інтенсивності ТПДС в області 10-12 °С залишався при усіх вивчаємих концентраціях гліцерину, але також зміщувався в бік підвищених температур на 2-4 °С.

Цей факт можна, певно, пояснити тим, що за конформаційний перехід при цих температурах відповідальні області білкової молекули, які не доступні гліцерину. Слід відмітити, що вплив гліцерину повністю оборотний.

Активність ЦХО в присутності гліцерину зменшується. Цей процес можна пояснити зниженням средства ферменту до субстрату при сорбції молекул гліцерину на поверхні ліпосом. Після виділення гліцерину активність ЦХО повністю відновлюється.

Вивчення зміни розмірів протеоліпосом показало, що при підвищенні концентрації гліцерину в суспензії спостерігається зростання розмірів ліпосом.

Концентраційна залежність інтенсивності СПДС для ЦХО від концентрації І,2-ПД лінійна до 24-26 x кріопротектору (див. мал. 6).

Активність ферменту, вбудованого у ліпосоми, значно знижується від присутності І,2-ПД, але цей процес, як і у випадку з гліцеином, оборотний.

При концентрації І,2-ПД 20 x і вище, температурний перехід в області 20 °С не виявляється. Але злам на температурній залежності інтенсивності ТПДС в області 10-12 °С залишався при усіх вивчених концентраціях І,2-ПД. Поведінка ЦХО в ліпосомах в присутності І,2-ПД в основному не відрізняється від поведінки ферменту у присутності гліцерину.

Вивчення ліпосом методом електронної мікроскопії та порівняння результатів з даними, які отримані по зміні світлорозсіювання, показало, що І.2-ПД приводить до збільшення розмірів ліпосом.

Таким чином, вплив кріопротекторів на ЦХО, вбудовану в ліпосоми, не викликає необоротних змін структури ферменту. Так як структура диференціальних спектрів не змінюється, висказано припущення, що падіння активності ферменту зумовлено взаємодією кріопротекторів з ліпідним бішаром.

Заради з'ясування можливості криозахисту ЦХО у ліпосомах за допомогою кріопротекторів було вивчено вплив заморожування-відігріву в присутності гліцерину та І.2-ПД на структурно-функціональний стан ферменту.

Суспензії ліпосом заморожували в середовищах, які містили 10, 20, 30 х кріопротекторів.

Заморожування ліпосом з вбудованою ЦХО в присутності усіх досліджених концентрацій гліцерину не призводило до зміни спектру поглинання ферменту в області Сорє.

Повільне заморожування протеоліпосом в середовищі з гліце-рином у концентраціях 10 та 20 х приводить до падіння фермента-тивної активності. Після впливу заморожування в присутності 30 х гліцерину активність ЦХО зберігалася (табл. 2). Різністний спектр практично не був присутнім.

Активність вбудованого в ліпосоми ферменту після заморожу-вання-відігріву в присутності І.2-ПД не змінюється при концент-раціях кріопротектору 20 та 30 х (див. табл. 2).

Як було зауважено вище, повільне заморожування ЦХО у ліпо-сомах приводить до уширення спектру поглинання ферменту в облас-

Вплив заморожування-відігріву на активність ЦХО та параметри протеоліпосом в присутності гліцерину та І,2-ПД

| Експеримент | Контроль | Кріопротектор, % | | |
|-----------------|----------|------------------|----------|----------|
| | | 10 | 20 | 30 |
| Г л і ц е р и н | | | | |
| Активність | 100±4 | 69±5 | 70±8 | 100±5 |
| β | 1,97±0,1 | 2,05±0,1 | 2,11±0,2 | 2,24±0,1 |
| τ/c | 1,89±0,2 | 1,87±0,1 | 1,77±0,1 | 1,75±0,2 |
| І, 2 - П Д | | | | |
| Активність | 100±3 | 90±5 | 100±4 | 100±3 |
| β | 2,01±0,1 | 1,97±0,1 | 2,10±0,2 | 2,05±0,2 |
| τ/c | 1,95±0,1 | 1,83±0,2 | 1,80±0,2 | 1,85±0,1 |

ті Core. Аналізую перші похідні спектрів поглинання ЦХО після заморожування в присутності усіх досліджених концентрацій гліцерину та І,2-ПД можна дійти висновку, що цей вплив не призводить до зміни структури спектру поглинання ферменту.

Вивчення температурних залежностей ТПДС ЦХО, вбудованої у ліпосоми після впливу заморожування-відігріву в присутності гліцерину показало, що зміни в областях 10-12 та 20 °С зрушуються в область високих температур на 2-3 °С. Положення температурних конформаційних переходів ЦХО в присутності усіх використаних концентрацій І,2-ПД не змінюється. При концентраціях кріопротекторів в середовищі заморожування суспензії ліпосом 30 % та вище, температурний перехід при 20 °С не спостерігається.

Можна зробити висновок, що при заморожуванні ЦХО, вбудованої в ліпосоми, присутність І,2-ПД та гліцерину у концентраціях 30 % дозволяє зберегти її конформаційні параметри. На поведінці ліпосом, як цілої структури, присутність кріопротекторів в сере-

довищі заморожування-відігріву практично не позначилася (див. табл. 2).

Таким чином, отримані в роботі дані свідчать про структурні та функціональні зміни вбудованої в штучні мембрани ЦХО при заморожуванні у середовищах, які містять різні сполуки, та дозволяють знайти зв'язок цих змін з процесами, що відбуваються при тій же впливі у ліпосомах, модифікованих ЦХО.

В И С Н О В К И

1. Встановлено, що заморожування-відігрів суспензії протеоліпосом призводить до зміни конформації вбудованої в них ЦХО, що супроводжується у деяких випадках зниженням ферментативної активності. Характер конформаційних змін визначається швидкістю охолодження і сольовою речовиною середовища.

2. Виявлено, що заморожування-відігрів протеоліпосом незалежно від швидкості охолодження призводить до злиття дрібних ліпосом у більш великі.

3. Встановлено, що інкубація протеоліпосом, які містять в якості білкового компоненту ЦХО при температурі 8 та 24 °С в розчинах NaCl і KCl в концентраціях 0.8 - 1.2 М призводить до необоротного конформаційного переходу, який супроводжується падінням ферментативної активності та приводить до злиття та агрегації ліпосом.

4. Присутність гліцерину і І.2-ПД в суспензії протеоліпосом не призводить до необоротних структурно-функціональних змін у ЦХО. При цьому виявляється підвищення розмірів ліпосом за рахунок їх злиття.

5. Встановлено, що присутність І.2-ПД та гліцерину в кон-

центрації 30 % в середовищі заморожування протеоліпосом дозволяє зберегти активність ЦХО, яка вбудована у штучні мембрани.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ РОБІТ

1. Розанова Е.Д., Науменко Е.И. Влияние замораживания-отогрева на встроенную в липосомы цитохромоксидазу // Сб. научн. тр. "Влияние охлаждения на биологические объекты".- Харьков, 1990.- С. 22-24.

2. Науменко Е.И., Розанова Е.Д. Влияние хлоридов калия и натрия на встроенную в липосомы цитохромоксидазу // Сб. научн. тр. "Физико-химические процессы в криобиологических системах".- Харьков, 1991.- С. 106-110.

3. Розанова Е.Д., Науменко Е.И. Структурно-функциональные параметры цитохромоксидазы в растворе и в составе липосом: влияние глицерина // Проблемы криобиологии.- 1992.- кн. I.- С. 32-35.

4. Науменко Е.И., Розанова Е.Д. Структурно-функциональные характеристики цитохромоксидазы, встроенной в липосомы, в растворах хлорида натрия // Укр. биохим. журнал.- 1994.- Т. 66, кн. 3.- С. 44-49.

5. Розанова Е.Д., Науменко Е.И. Изучение встроенной в липосомы цитохромоксидазы методом дифференциальной спектроскопии // Тез. докл. VI Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров.- Харьков, 1988.- С. 259.

6. Розанова Е.Д., Науменко Е.И. Влияние концентрированных солевых растворов на протелипосомы // Тез. докл. VII Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров.- Харьков, 1991.- С. 204.

7. Розанова Е.Д., Науменко Е.И. Структурно-функциональные изменения цитохромоксидазы при действии низких температур // Тез.

докл. 11 Междунар. конф. "Успехи современной криобиологии". - Харьков, 1992. - С. 154-155.

В. Розанова Е.Д., Науменко Е.И., Морозова Т.Ф. Температурні конформаційні переходи в цитохромоксидазі // Тези доп. 1 з'їзду біофізичного товариства. - Київ, 1994. - С. 199-200.

Науменко Е.И. ВЛИЯНИЕ СОСТАВА РАСТВОРИТЕЛЯ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВСТРОЕННОЙ В ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 - криобиология. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 1996.

Установлено влияние замораживания, замораживания в присутствии хлоридов калия, натрия и криопротекторов на структурно-функциональные изменения цитохромоксидазы, встроенной в искусственные мембраны. Интенсивность изменений фермента определяется скоростью замораживания, составом растворителя и его концентрацией. Установлена взаимосвязь между изменениями функции и структуры цитохромоксидазы с изменениями в липосомах, модифицированных этим ферментом.

Naumenko E. I.

EFFECT OF SOLVENT CONTENT AND FREEZE-THAWING ON STRUCTURE-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CYTOCHROME OXIDASE BUILT IN ARTIFICIAL MEMBRANES

Thesis for obtaining scientific degree of Candidate of Biological Sciences on the 03.00.22. speciality - Cryobiology. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Na-

tional Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, Ukraine, 1995.

Effect of freezing, freezing in the presence of K and Na chlorides and cryoprotectants on structure-functional changes in cytochrome oxidase built in artificial membranes was understudy. Intensity of enzyme changes was determined by freezing rate, solvent content and its concentration. The relationship between cytochrome oxidase function and structure and changes in liposomes, modified by cytochrome oxidase.

Ключові слова: цитохромоксидаза, структура, активність, ліпосоми, кріопротектори, солі, заморожування-відігрів

Відповідальний за випуск - Грищенко В.І.

Відпов. до друку формат 60 84 I/16.

I.O ум.-друк.арк., тираж 100

Дільниця (Друкарня) ХЗМСТ

Адреса: вул. Свердлова, 1.

AB 34.380