

Влияние режимов замораживания на динамику водно-белковой системы сыворотки кордовой крови человека

Э.О. НАРДИД, Л.В. ЦЫМБАЛ, О.А. НАРДИД

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Выяснение природы изменений динамической структуры белков после низкотемпературного воздействия является одной из фундаментальных задач криобиологии. Очевидно также, что структурная динамика водно-белковых систем является связующим звеном в изучении влияния факторов криоконсервирования на изолированные биомакромолекулы и биологические жидкости, клетки и ткани.

Сыворотка крови человека представляет собой, с одной стороны, нативный объект а, с другой, – достаточно простую систему с контролируемым составом. Известно, что осмоляльность как интегральный показатель состояния сыворотки крови определяется концентрацией компонентов сыворотки. Вклад межмолекулярных взаимодействий в гомеостатические механизмы, поддерживающие осмоляльность крови, недостаточно изучен [1]. Это же, в полной мере, относится к влиянию факторов криоконсервирования на межмолекулярные взаимодействия в сыворотке крови.

Целью настоящей работы было выяснение особенностей температурно-зависимой динамики водно-белковой системы сыворотки, подвергнутой различным режимам замораживания.

Кордовую кровь для получения сыворотки заготавливали во время родов с помощью “закрытой” методики в завальцованные сухие (без консерванта) стеклянные флаконы.

Динамическая структура водно-белковой системы исследована с помощью гидрофильного спинового зонда ТЕМПОН, а также стеариновой кислоты, спин-меченной в 16-м положении вдоль гидрофобной цепи (16-ДС). Спин-меченные жирные кислоты традиционно используются для изучения динамической структуры липидных мембран. Однако известно, что доксильные производные жирных кислот обладают определенным сродством к белкам, что оставляет открытым, например, вопрос о природе сложных анизотропных спектров ЭПР этих зондов в биомембранах [2]. Таким образом, использование гидрофильного зонда ТЕМПОН и гидрофобного зонда 16-ДС позволяет получать информацию о поведении как растворителя, так и, собственно, белков.

Адрес для корреспонденции: Нардид Э.О., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре “Bruker” с терморегулирующей приставкой. Были исследованы температурные зависимости параметров подвижности зондов в контрольных и размороженных образцах в диапазоне температур 0-40°C. Из спектров ЭПР зонда ТЕМПОН определяли интенсивности центральной и боковой компонент, оценивали параметр подвижности зонда [2]. В качестве характеристик конформационной динамики сывороточных белков использовали параметр максимального расщепления и значение ширины центральной компоненты спектра ЭПР зонда 16-ДС [2].

Замораживание–отогрев образцов сыворотки проводили в полиэтиленовых контейнерах, содержащих 700 мкл сыворотки в следующих режимах: медленное замораживание до -20°C со скоростью 1-2°C/мин и быстрое замораживание до -196°C со скоростью 300-400°C/мин. Отогрев проводили на водяной бане до появления жидкой фазы при температуре 36°C.

Проведенные эксперименты позволили установить, что использованные режимы замораживания–отогрева сыворотки изменяли эти зависимости по сравнению с контролем. После замораживания при -20°C помимо значительного уменьшения значений ширины спектра во всем интервале температур, отмечена трансформация низкотемпературного перехода и сглаживание переходов в интервале 26-30°C. Использование быстрого замораживания приводило к незначительным изменениям ширины спектра, однако вызывало уширение перехода при температуре 20°C и, напротив, – сужение температурного интервала перестройки при температуре около 26°C.

Использование разных режимов замораживания приводило также к изменению параметра максимального расщепления спектров ЭПР зонда 16-ДС. Так, замораживание при -20°C вызывало существенное уменьшение значений параметра. В быстрозамороженных образцах было выявлено изменение динамики микроокружения спиновых зондов при температурах около 20, 30 и 36°C. Некоторое увеличение параметра при температурах близких физиологической может отражать увеличение полярности микроокружения зонда в полостях белков, поскольку не сопровождается заметным сужением спектра.

Зарегистрированное во всем температурном интервале уменьшение ширины и максимального расщепления спектра ЭПР зонда 16-ДС (режим замораживания при -20°C) свидетельствует об изменении динамической структуры белков, имеющем характер разрыхления. Как следует из полученных результатов, быстрое замораживание оказалось более щадящим для сывороточных белков. Наблюдаемые в этом случае изменения температурных зависимостей параметров спектров могут быть обусловлены увеличением доступности растворителю более глубоких полостей белков.

Можно предположить, что наблюдаемые различия в эффектах криовоздействия на водно-белковую матрицу сыворотки крови обусловлены исходным состоянием (составом) образцов, вероятно, в первую очередь, присутствием низкомолекулярных компонентов. Отсутствие существенного варьирования белкового состава (и концентрации белков) в различных образцах сыворотки косвенно подтверждается практически совпадающими значениями параметра вязкости водно-белковой системы при физиологической температуре, несмотря на отличия в характере термопереходов и реакции на криовоздействие.

Мы полагаем, что обнаруженные особенности температурных зависимостей параметров динамической структуры водно-белковой матрицы сыворотки кордовой крови человека демонстрируют роль водно-белковых взаимодействий в реакции биомакромолекул на неспецифические факторы при криовоздействии. Полученные результаты позволяют также с новых позиций (с точки зрения влияния на динамическую структуру растворителя) рассматривать роль криопротекторов и режимов замораживания в механизмах обратимости криоповреждения биоструктур.

Литература

1. Горюнов А.С. Борисова А.Г., Рожков С.П., Сидоров В.С. Дегидратационная компенсация изменений содержания связанной воды в сыворотке крови (по данным низкотемпературного ^1H -ЯМР) // 11 съезд биофизиков России: Сб. тезисов. Раздел 10. Действие физико-химических факторов.– М., 1999.– С. 50.
2. Кузнецов А.И. Метод спинового зонда (основы и применение).– М.: Наука, 1976.– 210 с.