

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

УДК: 577.336:612.015.21:577.112.6

Використання флуоресцентних зондів для дослідження речовин пептидної природи в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів **І.Г.Беспалова¹, Л.А.Рогоза¹, Т.С.Дюбко¹, А.Л.Татарець², І.Г.Єрмоленко², С.Є.Гальченко¹, Б.П.Сандомирський¹**

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)

²ДНУ «НТК Інститут монокристалів НАН України» (Харків, Україна)

irabespalova@ukr.net; tatarets@isc.kharkov.com

Одержано спектральні характеристики флуоресценції зондів К-35, Е-176, К8-3000 і К8-1300 в буфері та безбілкових екстрактах кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят, селезінки свиней, серця свиней та новонароджених поросят і встановлена можливість їх використання для дослідження взаємодії пептидів з альбуміном сироватки крові. Титрування екстрактів дослідженими зондами виявило відмінності у їх зв'язуванні пептидами з різних тканин, що проявляється в різній інтенсивності флуоресценції. Використані в роботі зонди проявляють високу чутливість до взаємодії з альбуміном сироватки крові речовин пептидної природи. Зонд К8-1300 може розглядатися як довгохвильовий аналог зонда К-35, який широко використовується для дослідження альбуміну.

Ключові слова: *флуоресцентні зонди, екстракти органів, пептиди, альбумін.*

Использование флуоресцентных зондов для исследования веществ пептидной природы в экстрактах креноксервированных фрагментов органов

И.Г.Беспалова, Л.А.Рогоза, Т.С.Дюбко, А.Л.Татарец, И.Г.Ермоленко, С.Е.Гальченко, Б.П.Сандомирский

Получены спектральные характеристики флуоресценции зондов К-35, Е-176, К8-3000 и К8-1300 в буфере и безбелковых экстрактах креноксервированных фрагментов кожи новорожденных поросят, селезёнки свиней, сердца свиней и новорождённых поросят, и установлена возможность их использования для исследования взаимодействия пептидов с альбумином сыворотки крови. Титрование экстрактов исследованными зондами выявило отличия в их связывании пептидами из разных тканей, что проявляется в разной интенсивности флуоресценции. Используемые в работе зонды проявляют высокую чувствительность к взаимодействию с альбумином сыворотки крови веществ пептидной природы. Зонд К8-1300 может рассматриваться как длинноволновый аналог зонда К-35, который широко используется для исследования альбумина.

Ключевые слова: *флуоресцентные зонды, экстракты органов, пептиды, альбумин.*

Using fluorescent probes for the research of substances of peptide nature in the extracts of cryopreserved fragments of organs

I.G.Bespalova, L.A.Rohoza, T.S.Dubko, A.L.Tatarets, I.G.Yermolenko, S.Ye.Galchenko, B.P.Sandomirsky

The spectral characteristics of fluorescence for the K-35, E-176, K8-3000 and K8-1300 probes in buffer and in protein-free extracts of cryopreserved fragments of new born piglets' skin, pigs' spleen, pigs' heart and new born piglets' heart have been obtained. There has been established the possibility of their use for investigation of peptides interaction with blood serum albumin. Titration of extracts with investigated probes revealed differences in binding of peptides from different tissues, manifesting in different fluorescence intensity. Used probes showed a high sensitivity to the interaction of substances of peptide nature with blood serum albumin. The K8-1300 probe can be consider such as long-wavelength analog of the K-35 probe, which are widely used in research of albumin.

Key words: *fluorescent probes, extracts of organs, peptides, albumin.*

Вступ

Останнім часом в Україні і за її межами проводяться широкі дослідження ефективності та механізмів дії препаратів клітинної та тканинної терапії, в тому числі отриманих із органів тварин (Павленко та ін., 2013; Mangoni, 2011; Yang et al., 2002). Було показано, що використання кріобіологічних технологій дозволяє отримати екстракти фрагментів органів свиней і поросят з високою біологічною активністю (Гальченко, 2005). Таку біологічну дію екстрактів пов'язують з наявністю в них регуляторних пептидів. З огляду на це, доцільно більш докладно вивчити взаємодію пептидів, які містяться в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят з альбуміном і з'ясувати роль цього білка в сорбції пептидів для подальшого транспортування в руслі крові.

Флуоресцентні методи вивчення структури і функцій протеїнів та пептидів набули широкого застосування в біологічних дослідженнях (Пермяков, Дейкус, 1995; Guharay et al., 2001; Ergelen et al., 2005; Albani, 2011). Таким методом показано, що пептиди, які входять до складу деяких екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів і тканин, взаємодіють як з альбуміном сироватки крові донорів, так і з ізольованим альбуміном, призводячи до зміни конформації молекули цього протеїну (Гальченко та ін., 2006). Проте для конкретизації механізмів цієї взаємодії необхідні додаткові дослідження із залученням інших альбумін-специфічних флуоресцентних зондів, які дають змогу оцінити здатність альбуміну зв'язувати пептиди, і з використанням екстрактів інших органів.

Метою роботи було дослідження спектральних характеристик пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят та вивчення їх взаємодії з альбуміном, в тому числі з використанням флуоресцентних зондів K-35, E-176, K8-3000 і K8-1300.

Матеріали і методи

У роботі використовували сироватковий альбумін бика (САБ) (Sigma, США). Розчини САБ готували на натрійфосфатному буфері, рН 7,2.

Екстракти кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят (ЕШНП), селезінки свиней (ЕСС), серця статевозрілих свиней (ЕСЦС) та новонароджених поросят (ЕСЦП), що не містять протеїну, одержували згідно з методом (Гальченко та ін., 2004). Експерименти проводили на 5–6 незалежно одержаних екстрактах з початковим вмістом пептидів 100 мкг/мл.

У дослідженнях використовували флуоресцентні зонди K-35, E-176 (нейтральні 4-діалкіламінозаміщені похідні нафталенової кислоти, які відрізняються будовою діалкіламіногрупи), K8-3000 (аніонний барвник класу моноквараїнів) і K8-1300 (аніонний сквараїновий барвник з цвіттер-іонним хромофором), синтезовані в ДНУ «НТК "Інститут монокристалів" НАН України» (Харків). Для проведення досліджень зонди K-35 і E-176 готували у вигляді спиртових розчинів, а K8-3000 і K8-1300 розчиняли у двічі дистильованій воді.

Спектри збудження і флуоресценції зразків записували в стандартних односантиметрових кварцових кюветах на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian) і коригували з урахуванням спектральної чутливості приладу. Ширина вхідної і вихідної щілин монохроматорів становила 5 нм. Для усунення ефекту концентраційного гасіння зразки розводили так, щоб їх абсорбція на довжині хвилі збудження флуоресценції дорівнювала приблизно 0,1. Спектри флуоресценції зондів збуджували в максимумі довгохвильової смуги поглинання. Для оброблення спектрів застосовували програму Microcal Origin 6.0. На графіках представлено середнє значення інтенсивності флуоресценції, а похибка середнього становить не більше 5–6 %.

Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом MANOVA за допомогою програми SPSS Statistics 17.0.

Результати та обговорення

Як видно з рис. 1, спектри флуоресценції екстрактів знаходяться в області 290–450 нм, і інтенсивність флуоресценції відрізняється в різних екстрактах. При збудженні світлом з довжиною хвилі 280 нм максимум спектрів флуоресценції знаходиться в області 340–354 нм, що може свідчити про наявність в екстрактах доступного для розчинника триптофану. В екстрактах ЕСЦС і ЕСС вклад триптофанової флуоресценції виявився найменшим.

Детальний аналіз спектрів флуоресценції пептидів провести важко, тому що він ускладнюється як великою кількістю факторів, які впливають на флуоресценцію індольної складової, так і наявністю в більшості таких речовин декількох різних триптофанових залишків. При дослідженні сумішей протеїнів

або пептидів, до складу яких входить значна кількість триптофанових залишків, що знаходяться в гетерогенному оточенні, складно співвіднести конкретні спектральні характеристики з окремим ароматичним амінокислотним залишком. В таких випадках доводиться говорити лише про якісний опис спектральних властивостей груп цих залишків. Одним з підходів до оцінки складу екстрактів є одержання їх синхронних спектрів, які чутливі до зміни стану мікрооточення триптофанових і тирозинових залишків в протеїнах та пептидах.

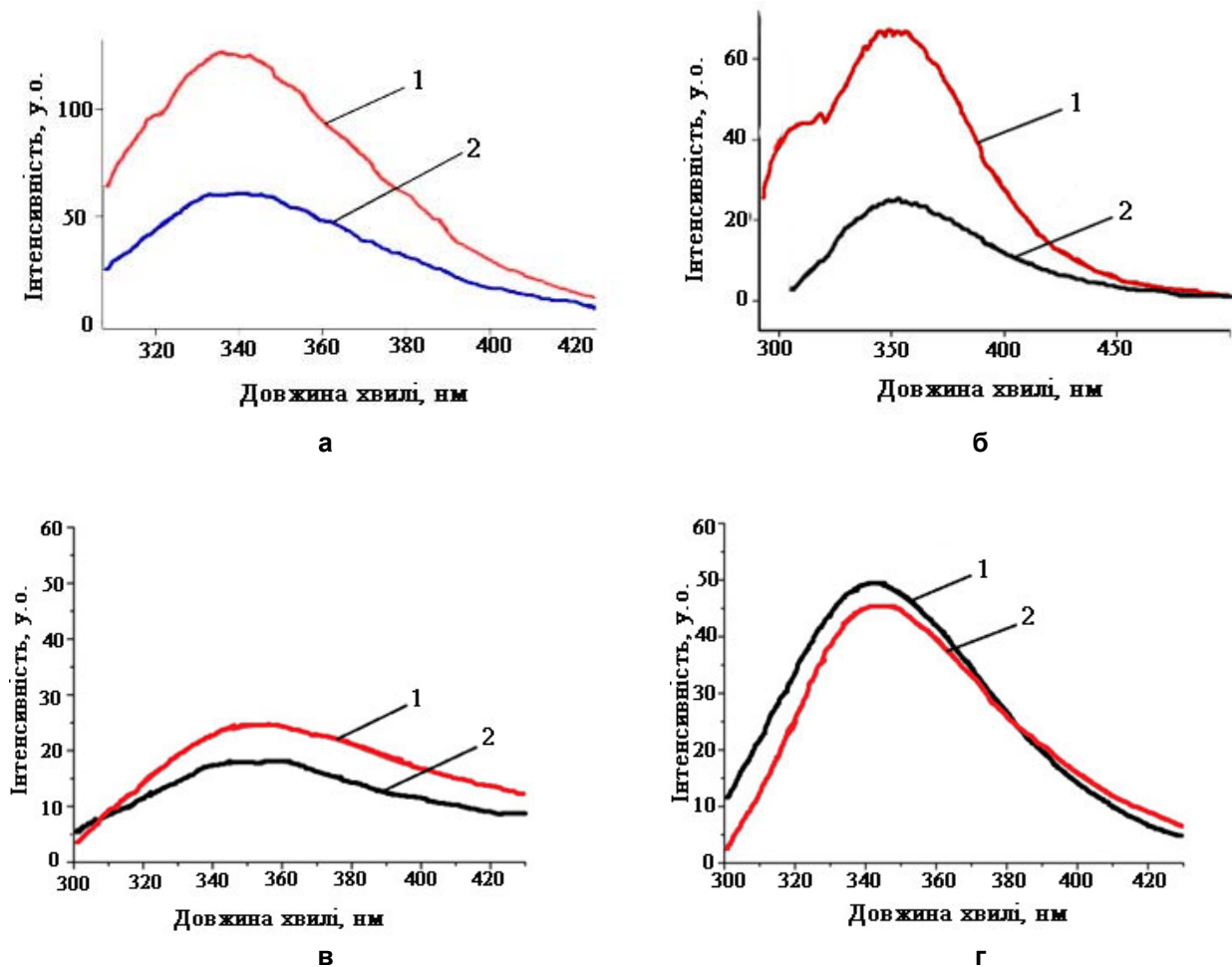


Рис. 1. Спектри флуоресценції ЕШНП (а), ЕСС (б), ЕСцС (в) та ЕСцП (г). Збудження світлом з довжиною хвилі 280 нм (1) і 296 нм (2)

Оскільки кожен екстракт має унікальний склад, йому буде притаманний унікальний набір синхронних спектрів флуоресценції. Синхронні спектри флуоресценції представляють собою суперпозицію спектрів флуоресценції, зареєстрованих при різних величинах зсуву монохроматорів збудження і флуоресценції і, таким чином, можуть бути використані для якісного аналізу екстрактів. Це дозволяє, не проводячи визначення окремих його компонентів, ідентифікувати відповідні біологічні суміші та екстракти.

Відомо, що синхронні спектри дають можливість виявити не тільки розбіжності в складі екстрактів, що досліджуються, але й отримати їх індивідуальні спектральні топографи, які являють собою, по суті, спектральні характеристики відповідних екстрактів. На рис. 2 наведені синхронні спектри флуоресценції екстрактів, отримані при величині зсуву монохроматорів збудження і флуоресценції від 10 до 200 нм з кроком 10 нм.

При дослідженні спектрально-люмінесцентних властивостей зондів К-35, Е-176, К8-3000 і К8-1300 у водно-сольовому середовищі (фосфатний буфер) та розчині САБ встановлено, що максимуми поглинання цих зондів в буфері спостерігаються при довжинах хвиль 415, 469 і 665 нм, а флуоресценції при 543, 521 і 683 нм відповідно. Для порівняння було обрано відомий зонд К-35, який використовують для вивчення властивостей альбуміну (максимум поглинання при 430 нм, а флуоресценції при 498 нм) (Добрецов и др., 2012).

Спектри, отримані при титруванні 6,7 мг/мл (або 1 мМ/л) розчину САБ досліджуваними барвниками, представлені на рис. 3. Для порівняння наведені спектри барвників у воді при тих самих концентраціях, що і при титруванні альбуміну. Як показали результати титрування білка барвниками К8-3000 і Е-176, які збуджуються в жовто-зеленій області спектра, вони мають достатньо широкий динамічний діапазон взаємодії з білком і демонструють високу чутливість до білка. Відмінною особливістю барвника Е-176 є те, що при зв'язуванні з білком інтенсивність його флуоресценції збільшується майже в 30 разів, а спектри флуоресценції зсуваються в короткохвильову область на 26 нм, тобто виявляють позитивну сольватохромію (див. рис. 3). Інтенсивність спектрів флуоресценції барвника К8-3000 в розчині САБ збільшується в 15 разів, а спектр флуоресценції зсувається на 7 нм. Отримані результати свідчать про те, що обидва ці барвника дуже перспективні для застосування в якості флуоресцентних зондів для білків.

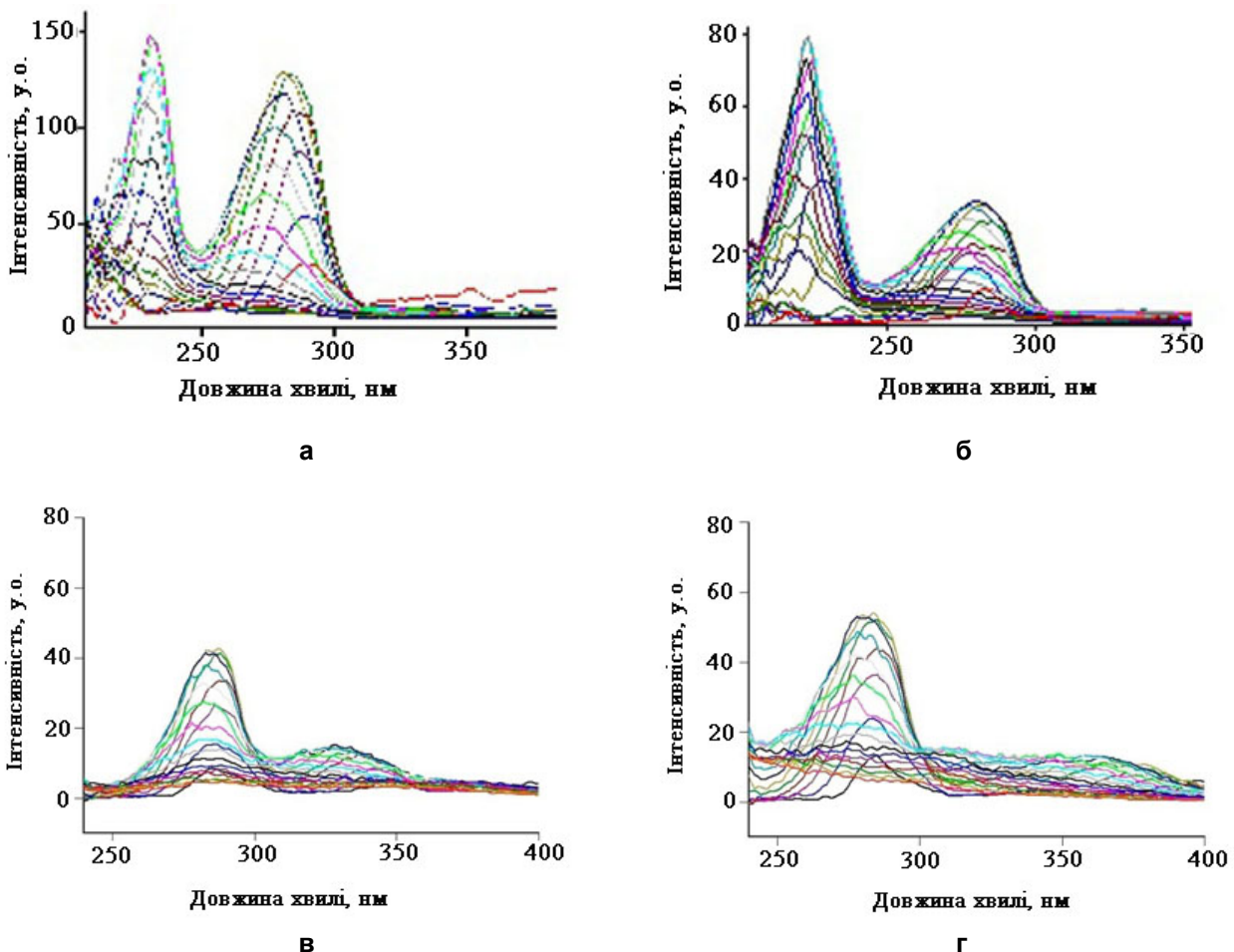


Рис. 2. Синхронні спектри флуоресценції ЕШНП (а), ЕСС (б), ЕСцС (в) та ЕСцП (г)

Барвник К8-1300 є найбільш довгохвильовим. Максимум його флуоресценції в воді розташований при 683–684 нм, а при зв'язуванні з білком (залежно від концентрації білка) він поступово зсувається в довгохвильову область від 694 до 705 нм, проявляючи негативну

сольватохромію. При зв'язуванні з САБ даний барвник до 5 разів може збільшувати інтенсивність флуоресценції. Таким чином, даний барвник може бути потенційно придатним для використання в якості довгохвильового флуоресцентного зонда для білків.

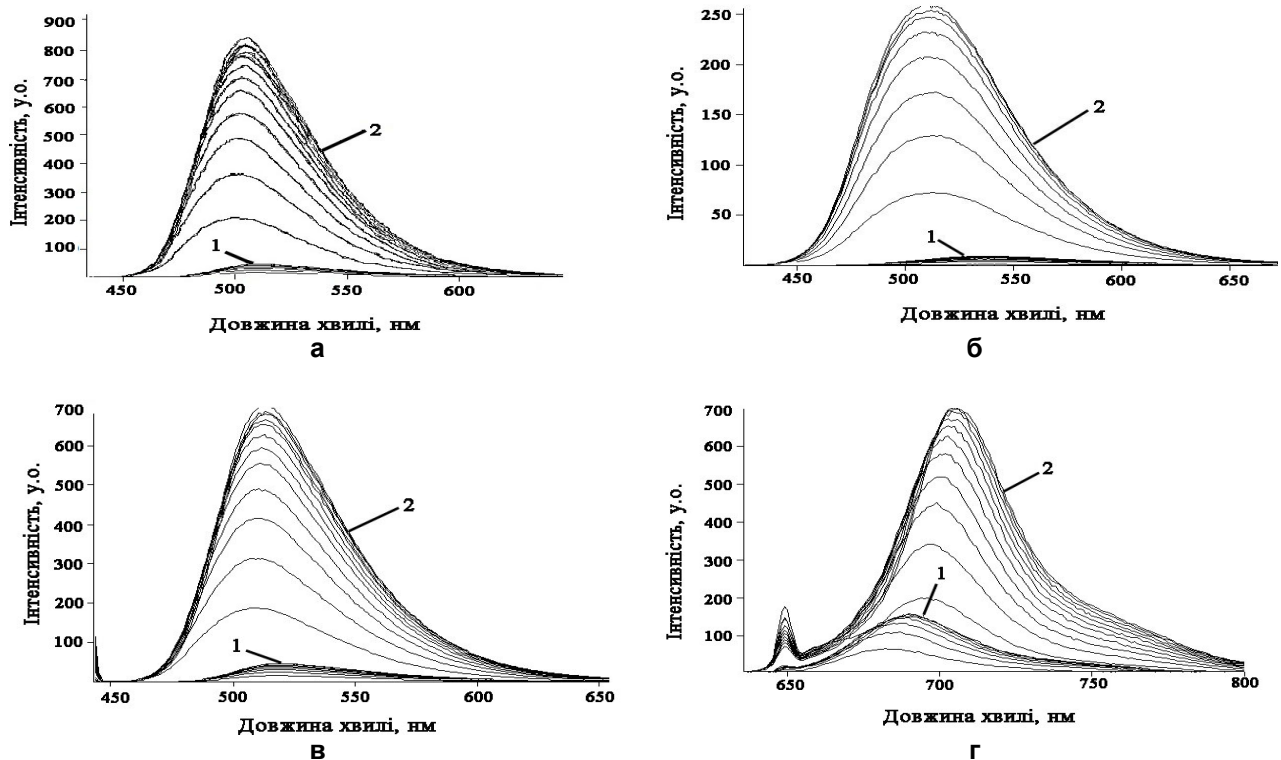


Рис. 3. Титрування буфера (1) та розчину САБ (6,7 мг/мл) (2) зондами К-35 (а), Е-176 (б) при $\lambda_{\text{збудж.}} - 400$ нм, К8-3000 (в) при $\lambda_{\text{збудж.}} - 420$ нм та К8-1300 (г) при $\lambda_{\text{збудж.}} - 610$ нм. Концентрація зондів від 8 до 80×10^{-7} моль/л

Враховуючи, що основним транспортним білком плазми крові є сироватковий альбумін, переважаючий до того ж серед білків плазми за кількісним складом (його вміст в сироватці крові здорових донорів коливається від 40 до 60%) (Гумерова и др., 2009), нами було досліджено взаємодію екстрактів з САБ. Він має один залишок триптофану і 18 залишків тирозину. Спектри випромінювання власних хромофорів білка перекриваються, що утрудняє їх аналіз. Проте, в альбуміні тирозини сильно загашені, завдяки чому в спектри флуоресценції внесок тирозинів значно менший порівняно з флуоресценцією триптофану.

Додавання екстрактів до розчину альбуміну суттєво впливало на спектральні характеристики білка (рис. 4). Всі досліджені екстракти приводили до гасіння власної флуоресценції альбуміну ($\lambda_{\text{збудж.}}=280$ нм) і впливали на стан триптофанових залишків білка ($\lambda_{\text{збудж.}}=296$ нм). При цьому найменший вплив на СФ триптофану справляв ЕСС. В присутності інших екстрактів ці спектри змінювалися більш суттєво, що свідчить про безпосередній вплив цих екстрактів на конформаційний стан білка.

Подібний вплив, який спостерігається, зокрема, при зв'язуванні деяких низькомолекулярних лігандів з альбуміном, може розглядатися як доказ зв'язування компонентів екстрактів з цим білком. В цьому випадку флуоресценція триптофану може відображати зменшення полярності мікрооточення його залишків або їх переміщення на більшу відстань відносно тирозинів, внаслідок чого знижується гасячий вплив тирозинів на флуоресценцію триптофану.

Відсутність істотного впливу ЕСС на флуоресценцію триптофану в альбуміні, проте, не може розглядатися на даному етапі як відсутність їх взаємодії з альбуміном, а свідчить лише про те, що ця взаємодія не зачіпає істотно триптофанові залишки білка.

Присутність біологічних молекул в розчині різним чином впливає на інтенсивність флуоресценції досліджуваних зондів (рис. 5).

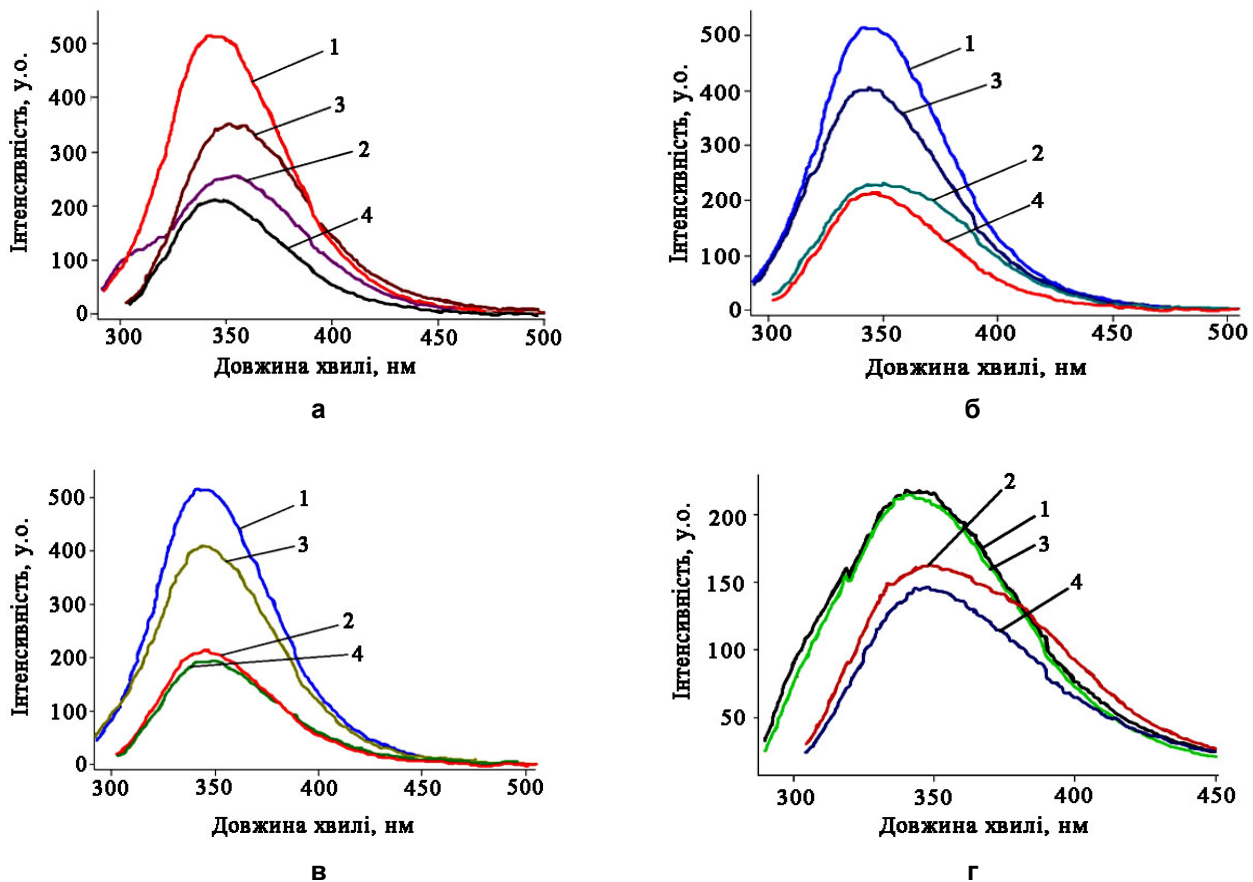


Рис. 4. Спектри флуоресценції САБ (1, 2) та вплив на них екстрактів (3, 4): а – ЕШНП; б – ЕСС; в – ЕСцС, г – ЕСцП. Збудження світлом з довжиною хвилі 280 нм (1, 3) и 296 нм (2, 4)

Титрування екстрактів зондами виявляє також відмінності у здатності пептидів, які входять до їх складу, зв'язувати зонди. Найбільшу чутливість до індивідуальних властивостей пептидів в екстрактах виявив зонд Е-176. Ця особливість дозволяє рекомендувати його як зонд для дослідження речовин пептидної природи, що, однак, не виключає можливість використання з цією метою й інших зондів.

Флуоресценція зондів К-35 і Е-176, зв'язаних з компонентами екстрактів, практично не заважає реєстрації спектрів флуоресценції цих зондів, зв'язаних з альбуміном у присутності екстрактів. В той же час, для зондів К8-3000 і К8-1300, разом з положенням спектрів в екстрактах, близьких до аналогічних показників в розчині САБ, спостерігається велика інтенсивність флуоресценції в екстрактах. Ця обставина свідчить про необхідність враховувати внесок флуоресценції даних зондів в екстрактах під час аналізу їх зв'язування з альбуміном.

Для оцінки чутливості зондів до зміни структури САБ під впливом екстрактів було проведено титрування розчину цього білка в присутності зондів екстрактами. Як видно з рис. 5, найбільшу чутливість до зв'язування складових екстрактів з альбуміном проявляють зонди К-35 та Е-176. В той же час, хоча вплив екстрактів на нормовану інтенсивність флуоресценції зв'язаних з альбуміном зондів К8-1300 і К8-3000 дещо менший, це не виключає можливість їх використання для дослідження речовин пептидної природи. Всі зонди проявляють певну селективність відносно виду використовуваних екстрактів.

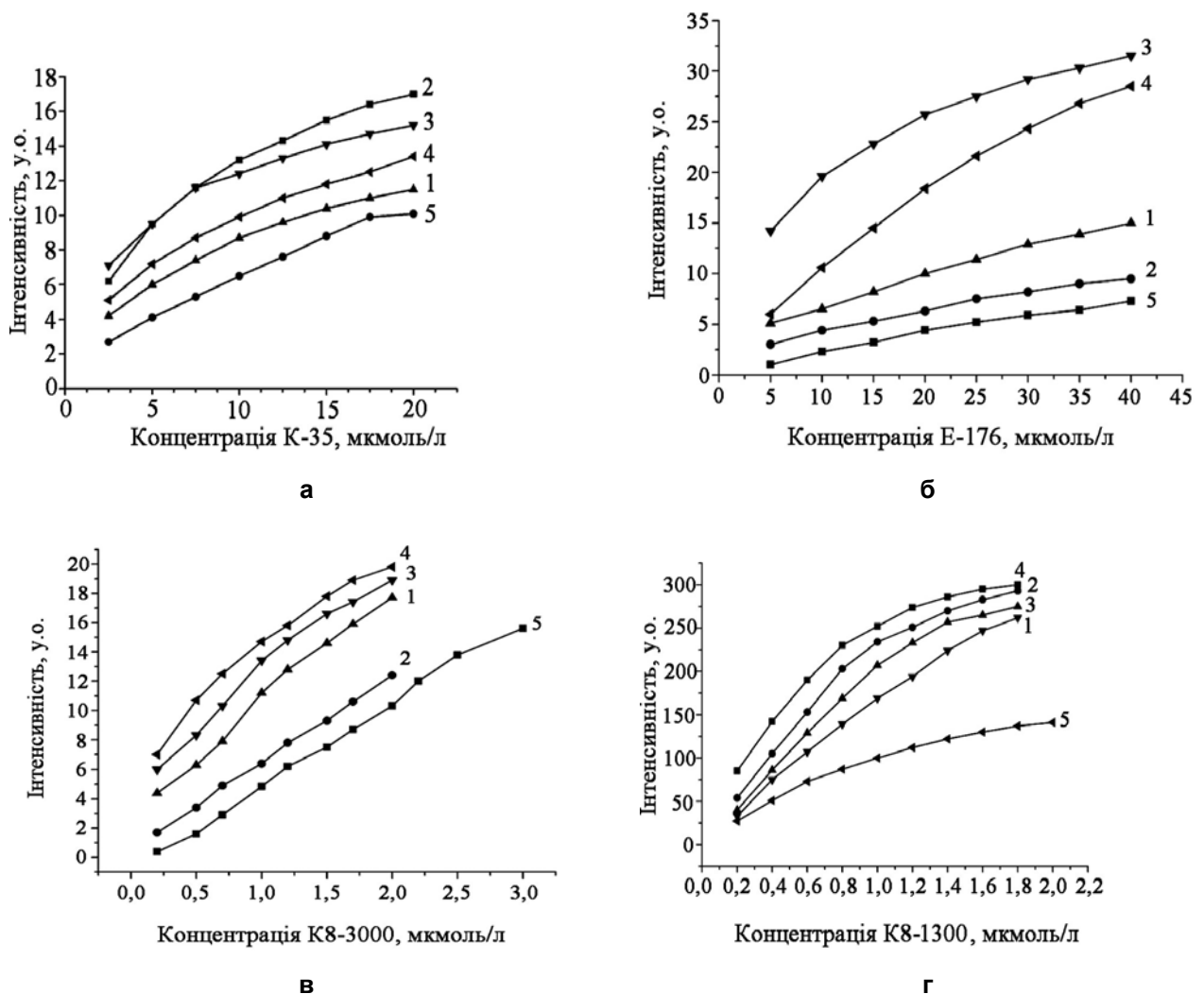


Рис. 5. Інтенсивність флуоресценції зондів К-35 (а), E-176 (б), K8-3000 (в) і K8-1300 (г) в ЕШНП (1), в ЕСС (2), в ЕСЦС (3), в ЕСЦП (4), в буфері (5)

Висновки

Приведені вище експериментальні дані, окрім підтвердження на користь зв'язування складових екстрактів з альбуміном, також можуть відображати зміну конформаційного стану САБ під впливом речовин, які входять до складу екстрактів. Таким чином, наведені результати свідчать про безпосередню взаємодію складових екстрактів з альбуміном сироватки крові, що призводить до зміни сорбційної здатності цього білка по відношенню до зондів.

Досліджені зонди проявляють високу чутливість до взаємодії з альбуміном сироватки крові речовин пептидної природи. Зонд K8-1300 може розглядатися як довгохвильовий аналог зонда K-35, який широко використовується для дослідження альбуміну.

Список літератури

- Гальченко С.Є. Екстракти криоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Пробл. кріобіології. – 2005. – Т.15, №3. – С. 403–406. /Gal'chenko S.Ye. Ekstrakty kriokonservovanykh fragmentiv ksenoorganiv: oderzhannya ta biologichna diya // Probl. kriobiologii. – 2005. – Т.15, №3. – С. 403–406./
- Гальченко С.Є., Дюбко Т.С., Паценкер Л.Д., Сандомирський Б.П. Спектрофлуориметрическое исследование экстрактов криоконсервированных фрагментов органов свиней. I. Собственная флуоресценция // Эксперим. і клінічна медицина. – 2006. – №1. – С. 48–52. /Gal'chenko S.Ye., Dyubko T.S.,

- Patsenker L.D., Sandomirskiy B.P. Spektrofluorimetricheskoye issledovaniye ekstraktov kriokonservirovannykh fragmentov organov sviney. I. Sobstvennaya fluorestsentsiya // Eksperim. i klinichna medytsyna. – 2006. – №1. – S. 48–52./
- Гальченко С.Є., Шкодовська Н.Ю., Сандомирський Б.П., Грищенко В.І. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів. Пат. 64381 А Україна. Заявл. 22.05.2003. № 2003054649. МПК⁷ А61К35/12. Опубл. 16.02.2004, Бул. Промисл. власність №2. /Gal'chenko S.Ye., Shkodovs'ka N.Yu., Sandomyrs'kyi B.P., Grishchenko V.I. Sposib otrymannya ekstraktiv ksenogennykh organiv. Pat. 64381 A Ukraina. Zayavl. 22.05.2003. № 2003054649. MPK⁷ A61K35/12. Opubl. 16.02.2004, Byul. Promysl. vlasnist' № 2./
- Гумерова А.В., Рудакова М.А., Филиппов А.В., Скирда В.Д. Исследование методом ЯМР связывания сывороточного альбумина с жирными кислотами // Структура и динамика молекулярных систем. – 2009. – №6, А. – С. 26–31. /Gumerova A.V., Rudakova M.A., Filippov A.V., Skirda V.D. Issledovaniye metodom YaMR svyazyvaniya syvorotochnogo al'bumina s zhirnymi kislotami // Struktura i dinamika molekulyarnykh sistem. – 2009. – №6, А. – С. 26–31./
- Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А., Сырейщикова Т.И. и др. Флуоресцентный зонд К-35 для исследования альбумина: оптические свойства // Биофизика. – 2012. – Т.57, №3. – С. 405–409. /Dobretsov G.Ye., Gryzunov Yu.A., Syreyschikova T.I. i dr. Fluorestsentnyy zond K-35 dlya issledovaniya al'bumina: opticheskiye svoystva // Biofizika. – 2012. – Т.57, №3. – С. 405–409./
- Павленко А.П., Соколенко В.Н., Жукова М.Ю. Сравнительное исследование физиологического влияния пептидного комплекса сердца при экспериментальной патологии миокарда // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т.1 (98), вип.1. – С. 133–138. /Pavlyenko A.P., Sokolyenko V.N., Zhukova M.Yu. Sravnitel'noye issledovaniye fiziologicheskogo vliyaniya peptidnogo kompleksa serdtsa pri eksperimental'noy patologii miokarda // Visnyk problem biologiyi i medytsyny. – 2013. – Т.1 (98), vyp. 1. – С. 133–138./
- Пермяков Е.А., Дейкус Г.Ю. Исследование конформационных переходов в белках по триптофановой флуоресценции и фосфоресценции при низких температурах // Молекулярная биология. – 1995. – Т.29, вип.2. – С. 339–344. /Permyakov Ye.A., Deykus G.Yu. Issledovaniye konformatsionnykh perekhodov v belkakh po triptofanovoy fluorestsentsii i fosforestsentsii pri nizkikh temperaturakh // Molekulyarnaya biologiya. – 1995. – Т.29, vyp.2. – С. 339–344./
- Albani J.R. Relation between proteins tertiary structure, tryptophan fluorescence lifetimes and tryptophan $S_0 \rightarrow 1L_b$ and $S_0 \rightarrow 1L_a$ transitions. Studies on $\alpha 1$ -acid glycoprotein and β -lactoglobulin // J. Fluoresc. – 2011. – Vol.21, №3. – P. 1301–1309.
- Ercelen S., Klymchenko A.S., Mely Y., Demchenko A.P. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of dierent species // Int. J. Biol. Macromol. – 2005. – Vol.35, №5. – P. 231–242.
- Guharay J., Sengupta B., Sengupta P.K. Protein-flavonol interaction: fluorescence spectroscopic study // Proteins. – 2001. – Vol.43, № 2. – P. 75–81.
- Mangoni M.L. Host–defense peptides: from biology to therapeutic strategies // Cell. Mol. Life Sci. – 2011. – №68. – P. 2157–2159.
- Yang H., Al-Jazaeri A., Wright J.R. The immunoprotective effect of Sertoli cells coencapsulated with islet xenografts is not dependent upon Fas ligand expression // Cell Transplant. – 2002. – Vol.11, №8. – P. 799–801.

Представлено: А.Б.Малишев / Presented by: A.B.Malyshv

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Perskiy

Подано до редакції / Received: 10.05.15