

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК: 535.342.372:577.322.4

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЗОНА НА СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН И ХОЛИНЭСТЕРАЗУ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

И.А.Белых, Т.С.Дюбко, В.Д.Зинченко

*Харьковский институт танковых войск,**ул. Полтавский шлях, 192, Харьков, 61034, Украина.**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,**ул. Переяславская, 23, Харьков, 61015, Украина.**E-mail: cryo@online.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 10 ноября 2003

С использованием методов спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии показано, что действие озона на биополимеры приводит к изменению их спектральных характеристик, что свидетельствует о конформационных перестройках и сопровождается ингибированием или стимуляцией ферментативной активности. Степень изменения структурного состояния и ферментативной активности биополимеров зависела от концентрации озона в среде инкубирования. Высокие концентрации озона вызывали ингибирование, а малые повышение ферментативной активности фермента. Обсуждается возможность использования данного свойства озона для реактивации биологического материала после криоконсервирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Озон, бычий сывороточный альбумин, холинэстераза, флуоресценция, конформационные изменения.

Успешное решение проблемы низкотемпературной консервации органов и тканей в значительной мере зависит от глубокого понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе криповреждений и криозащиты биологических объектов, которые в настоящее время изучены не достаточно полно. Не всегда удается устранить и эффект токсического действия применяемых в качестве защитных агентов веществ – криопротекторов. Таким образом, весьма актуальной является проблема довосстановления функциональных характеристик биологического объекта, утраченных в результате действия факторов криоконсервирования.

Одним из перспективных на наш взгляд реагентов – активаторов восстановления утраченных функций биологическим объектом может оказаться озон в малых дозах. Так, при исследованиях действия озона на микроорганизмы нами было показано, что озон, в зависимости от дозы, может приводить как к быстрому отмиранию, так, и ускорять рост последних. Такой экспериментальный подход был бы в полной мере полезным и для более детального освещения механизма действия озона на биополимеры и изучения его реакционных свойств.

В качестве объектов для исследования молекулярных механизмов эффекта озона нами были выбраны белки ферментной и неферментной природы – холинэстераза и сывороточный альбумин. Холинэстераза относится к классу гидролаз, активность которой превышает активность почти всех известных ферментов. Кроме того, многие соединения могут выступать в роли ингибиторов или активаторов данного фермента. На скорость ферментативной реакции влияют условия, при которых она протекает: концентрация реагентов, pH, температура, характер инкубационной среды и др. [1]. Для оценки возможных конформационных изменений белка, вызванных действием озона и не связанных с ферментативной активностью, был взят бычий сывороточный альбумин (БСА), как наиболее изученный [2, 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях применяли стандартные коммерческие препараты: БСА фирмы "SERVA", Fraction V, м.м. 67000; препарат холинэстеразы, сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8), VI класс чистоты, стандартной активностью 25 АЕ/мг, изготовленную Пермским НИИ вакцин и сыворотки. В опытах использовали белки в концентрации 0,2 – 2 мг/мл.

Спектры флуоресценции растворов БСА и холинэстеразы исследовали после их озонирования озono-воздушной смесью в течение 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 минут (концентрация озона в среде инкубации белков составляла: 0,2; 0,39; 0,6; 3,75; 6,55; 7,0 г/м³ соответственно). Концентрацию озона измеряли спектрофотометрическим методом, определяли экстинцию на полосе Хартли при 255 нм на

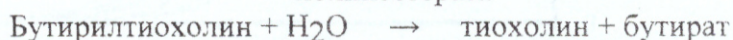
спектрофотометре SPECORD UV VIS (Германия). Полную регистрацию спектров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре модели F - 4010, фирмы "Hitachi" (Япония) при $\lambda_{\text{возб.}} = 280$ и 296 нм. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Pye Unicam SP - 8000 (Англия). Анализировали спектры поглощения и флуоресценции белков, а также первые производные их спектров поглощения (1ПСП) [4] и являющиеся наиболее информативными [5] вторые производные спектров флуоресценции (2ПСФ) в программе Microcal Origin.

В качестве флуоресцентного зонда использовали полихроматический потенциалзависимый краситель 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний N-толуолсульфонат (ДСМ) [6]. Флуоресценцию ДСМ возбуждали длинами волн 460 и 520 нм. Все спектральные исследования проводили в термостатированных кюветах при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

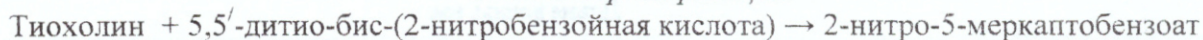
Активность фермента определяли по стандартной методике фотоколориметрическим методом с субстратом — йодидом бутирилтиохолина [7]. *Принцип метода.* Холинэстераза гидролизует субстрат бутирилтиохолина с образованием кислоты и тиохолина. Тиохолин взаимодействует с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) с образованием 2-нитро-5-меркаптобензоата, окрашенного в желтый цвет.

Основная реакция:

холинэстераза



Индикаторная реакция:



Полученную смесь фотоколориметрировали при длине волны 400 нм.

В качестве источника озона использовали, собственной конструкции генератор озона, в основу работы которого положен барьерный разряд [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В водной среде, близкой к нейтральной ($\text{pH} = 7,5$) для бычьего сывороточного альбумина и при pH близкой к оптимальной ($\text{pH} = 8,0$) для холинэстеразы спектры поглощения определяются исключительно присутствием остатков ароматических аминокислот с пиками вблизи 280 нм (Рис 1, 2).

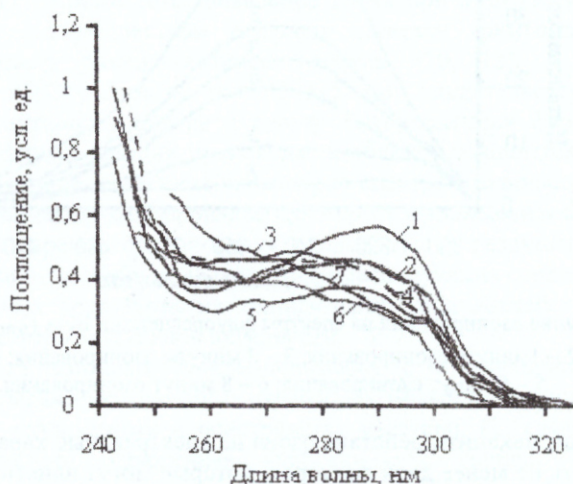


Рис. 1. Влияние озонирования на спектры поглощения БСА:

1 — контроль (без озона); 2 — 1 минута озонирования; 3 — 2 минуты озонирования; 4 — 4 минуты озонирования; 5 — 6 минут озонирования; 6 — 8 минут озонирования.

Спектры флуоресценции БСА и холинэстеразы представляют собой бесструктурные полосы с максимумами флуоресценции 342 и 338 нм соответственно [9,10,11], характерными для триптофан-содержащих белков. Положение максимумов спектров флуоресценции БСА и холинэстеразы практически не зависело от длины волны возбуждения (280 или 296 нм). Это подтверждает известное утверждение, согласно которому флуоресценция триптофан- и тирозинсодержащих белков обусловлена, главным образом, триптофановыми остатками, без существенного вклада тирозина и фенилаланина [2, 4]. Так, 17 тирозиновых остатков в бычьем сывороточном альбумине сильно затухены, и поэтому в обычном спектре тирозиновый вклад почти незаметен на фоне очень сильной флуоресценции двух остатков

триптофана [2]. Что касается холинэстеразы, то в ее активный центр входит хромофор – тирозин, который находится не во флуоресцирующем состоянии, а флуоресценция обусловлена остатками триптофана, входящими в состав полипептидной цепи этого белка.

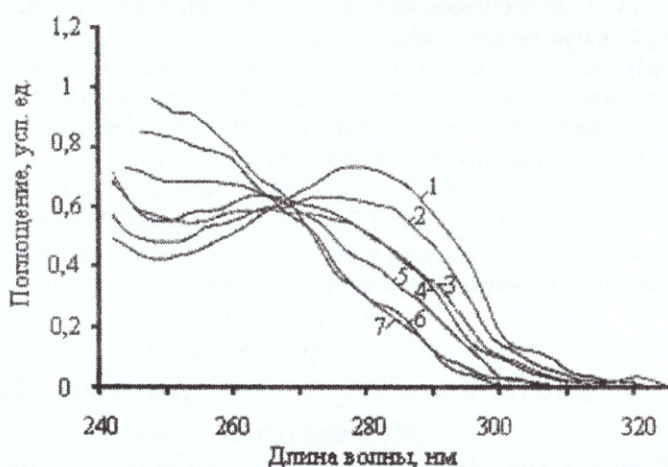


Рис. 2. Влияние озонирования на спектры поглощения холинэстеразы: 1 – контроль (без озона); 2 – 0,5 минут озонирования; 3 – 1 минута озонирования; 4 – 2 минуты озонирования; 5 – 4 минуты озонирования; 6 – 6 минут озонирования; 7 – 8 минут озонирования

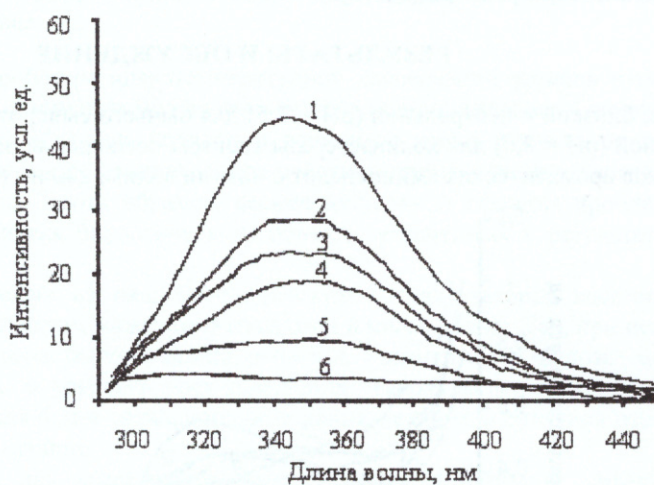


Рис. 3. Влияние озонирования на спектры флуоресценции БСА ($\lambda_{\text{возб.}} = 280 \text{ нм}$): 1 – контроль (без озона); 2 – 1 минута озонирования; 3 – 2 минуты озонирования; 4 – 4 минуты озонирования; 5 – 6 минут озонирования; 6 – 8 минут озонирования.

Анализируя возможный механизм действия озона на спектральные характеристики холинэстеразы и БСА, необходимо учитывать не менее двух факторов, которые могут влиять на электронновозбужденное состояние триптофановых и тирозиновых остатков, и, тем самым, определять изменение параметров поглощения и флуоресценции холинэстеразы и БСА, а именно: (1) изменение молекулярной структуры фермента и белка, и (2) изменение полярных свойств раствора, pH и др. Например, сдвиг pH в кислую или щелочную области приведет как к изменению интенсивности поглощения и флуоресценции, так и к изменению положения максимумов спектров холинэстеразы и сывороточного альбумина [4, 10, 12]. Поглощение света триптофаном обусловлено системой сопряженных связей его индольного кольца, а для тирозина поглощающей группировкой в молекуле является фенольное кольцо. Способность озона образовывать промежуточные продукты (озониды) при взаимодействии с ароматическими ядрами за счет раскрытия ароматического кольца или реагировать с ними по радикальному механизму с отрывом водорода от оксигруппы показана в работе [4]. Тогда, очевидно, степень структурных изменений холинэстеразы и альбумина будет зависеть от физико-химических свойств озона, его концентрации в озono-воздушной среде и среде инкубирования, длительности взаимодействия, что должно отразиться на

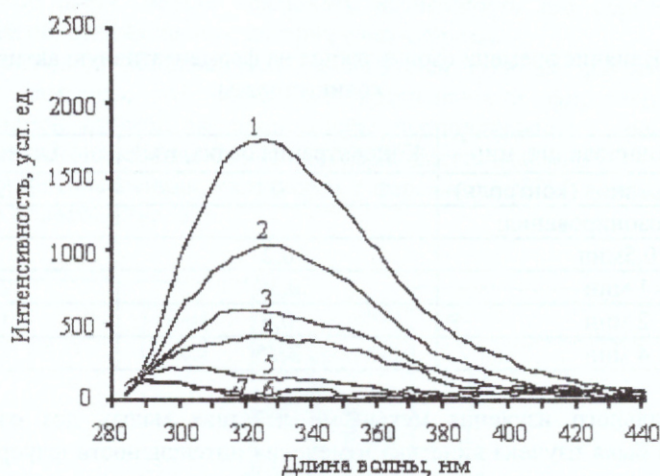


Рис. 4. Влияние озонирования на спектры флуоресценции холинэстеразы ($\lambda_{\text{возб.}} = 280 \text{ нм}$):

1 – контроль (без озона); 2 – 0,5 минут озонирования; 3 – 1 минута озонирования; 4 – 2 минуты озонирования; 5 – 4 минуты озонирования; 6 – 6 минут озонирования; 7 – 8 минут озонирования.

их спектральных характеристиках. Действительно, уже при 0,5-минутном озонировании белка и фермента интенсивность флуоресценции уменьшилась на $38 \pm 5 \%$, а при 1-минутном – составляла $\sim 67 \pm 7 \%$, 6-минутное воздействие озона приводило к выравниванию спектров флуоресценции и вырождению спектров поглощения (Рис. 3, 4). Тушение флуоресценции сопровождалось длинноволновым сдвигом спектров флуоресценции холинэстеразы и БСА. Вероятно, озонирование фермента и белка в пределах двух минут не сопровождается разрушением ароматических колец, а имеют место конформационные изменения белковых макромолекул в области полипептидной цепи или активного центра, в результате которых происходит изменение микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков. Так, длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции подтверждает предположение об увеличении доступности воды к хромофорам [10, 11]. Кроме того, появление плеча при 350–360 нм во 2ПСФ холинэстеразы является дополнительным доказательством перехода остатков триптофана в более гидрофильное состояние, сопровождающееся разворачиванием глобулы [10, 13]. А смещение и уменьшение отрицательного пика во 2ПСФ, вплоть до 305–315 нм, свидетельствует об увеличении вклада тирозиновой компоненты активного центра в спектр флуоресценции фермента. При этом основные изменения интенсивности флуоресценции происходят в области концентраций озона $0,39 \text{ г/м}^3$ (1-й тип озонирования), а наиболее резкие изменения параметров спектра наблюдаются вплоть до концентраций озона $0,6 \text{ г/м}^3$ (2-й тип). Дальнейшее озонирование приводит к вырождению спектров.

Достаточно большое время озонирования приводит к разрушению ароматических колец ответственных за флуоресценцию и образованию нефлуоресцирующих соединений (озонидов).

Изменение спектральных характеристик холинэстеразы под воздействием озона сопровождается параллельно изменением ее ферментативной активности.

Холинэстераза является типичным белком-полимером с молекулярной массой более 250 тыс. и имеет 4 субъединицы с четырьмя активными центрами. Активный центр холинэстеразы состоит из двух функционально важных и разделенных в пространстве участков: (1) связывающей области, в состав которой входит отрицательно заряженная карбоксильная группа, которая электростатически взаимодействует с положительно заряженным азотом субстрата; (2) каталитической области, ответственной за эстеразную активность фермента, в состав которой входят Ser, His, Tug. При этом протекание ферментативной реакции зависит от конформации активного центра, определяющей расстояния между отдельными участками активного центра. Реакция идет наиболее благоприятно, если основная группа гистидина находится на расстоянии 0,5 нм от группы COO^- и если тирозин расположен на расстоянии 0,25 нм от боковой цепочки серина [14].

Воздействие озона на холинэстеразу длительностью от одной до двух минут приводило к уменьшению активности фермента. Увеличение времени озонирования (до 6-ти минут) сопровождалось полным ингибированием фермента (активность снижалась до 0) (Табл. 1).

Из приведенных в таблице данных следует, что в условиях сохранения ароматического кольца при малых дозах озона может наблюдаться повышение ферментативной активности холинэстеразы.

Таблица 1

Влияние времени озонирования на ферментативную активность холинэстеразы.

Время озонирования, мин	Концентрация озона, г/м ³	Активность, АЕ/мг
До озонирования (контроль)	0	23±0,31
После озонирования:		
0,5мин	0,2	29±0,47
1 мин	0,39	28,5±0,01
2 мин	0,6	19,6±0,22
4 мин	3,75	0

Для более детального изучения механизма действия малых доз озона (концентрация озона составляла ~0,1 г/м³) была изучена кинетика изменения интенсивности флуоресценции холинэстеразы в озонированной воде (при постоянной максимальной длине волны максимума спектра флуоресценции).

Как видно из рис. 5, при помещении холинэстеразы в озонированную воду, ее флуоресценция резко возрастает в интервале времени от 4 до 10 минут. Дальнейшее инкубирование холинэстеразы в озонированной воде приводило к тушению флуоресценции.

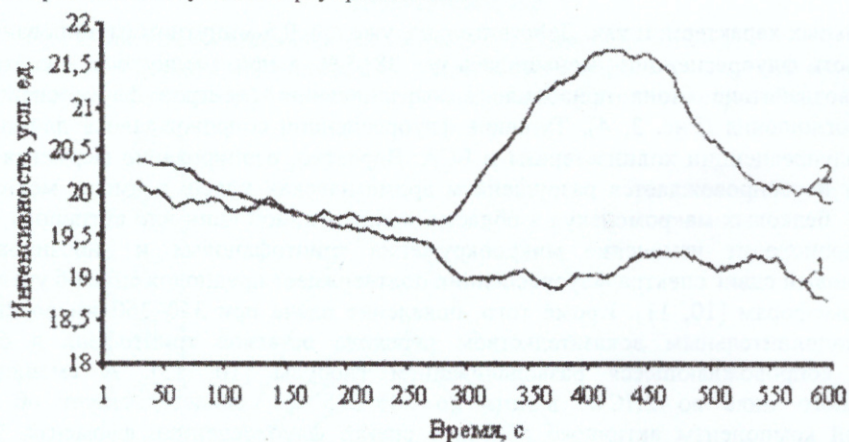


Рис. 5. Влияние озонированной воды на интенсивность флуоресценции холинэстеразы в зависимости от времени инкубирования ($\lambda_{\text{возб.}} = 280 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{фл.}} = 338 \text{ нм}$): 1 – контроль; 2 – холинэстераза, инкубированная в озонированной воде (концентрация озона в воде 0,1 г/м³). Концентрация белка - 2 мг/мл.

Применение флуоресцентного зонда ДСМ в качестве индикатора конформационных изменений в белках позволяет получить дополнительную информацию о механизме действия озона на белки. Зонд ДСМ, благодаря хорошим сольватохромным свойствам (стоксов сдвиг в водных растворах белков достигает ~ 145 нм), является чувствительным индикатором конформационных изменений водорастворимых белков [6, 15, 16, 17, 18]. Спектр флуоресценции ДСМ, находящегося в растворе белка, представляет собой обычно суперпозицию спектров флуоресценции зонда, находящегося в водном растворе и зонда, связанного с белком. ДСМ слабо флуоресцирует в воде, однако в белковых растворах его флуоресценция возрастает в 10-50 раз с одновременным коротковолновым сдвигом спектра флуоресценции. При этом наличие единичного положительного заряда и двух анилиновых колец позволяет ему связываться электростатически с отрицательными группами белков, а также взаимодействовать гидрофобно с их неполярными участками. Это обуславливает существование различных спектральных форм связанного с белком ДСМ, которые можно разделить экспериментально, используя различные длины волн возбуждения [6]. Применение данного подхода к анализу спектров флуоресценции ДСМ, связанного с холинэстеразой, позволило выявить присутствие в белке 2-х спектральных форм ДСМ с максимумами при 567 и 590 нм (Рис. 6).

При добавлении ДСМ к водному раствору нативного фермента интенсивность флуоресценции зонда резко возрастает за счет присоединения к отрицательно заряженным группам белка. Переноса энергии от ароматических групп белков на молекулы зонда не обнаружено. Природный субстрат холинэстеразы – ацетилхолин связывается в активном центре путем образования ионной связи между отрицательно заряженной COO^- карбоксильной группой и положительно заряженным четвертичным атомом азота субстрата [14]. Поскольку ДСМ представляет собой зонд-катион с единичным положительным зарядом,

локализующимся на атоме азота, нельзя исключить возможность его сорбции, по крайней мере частичной, в связывающей области активного центра холинэстеразы.

В растворах озонированной холинэстеразы наблюдается тушение флуоресценции связанного с белком ДСМ. Следует отметить, что изменение интенсивности флуоресценции в присутствии холинэстеразы, обработанной озоном, не происходило пропорционально времени озонирования. В области продолжительности озонирования 0,5—1 мин наблюдается излом. В этой же области происходил сдвиг максимума спектра флуоресценции, связанного с ферментом ДСМ: в начале в длинноволновую, далее в коротковолновую область. (Рис. 6).

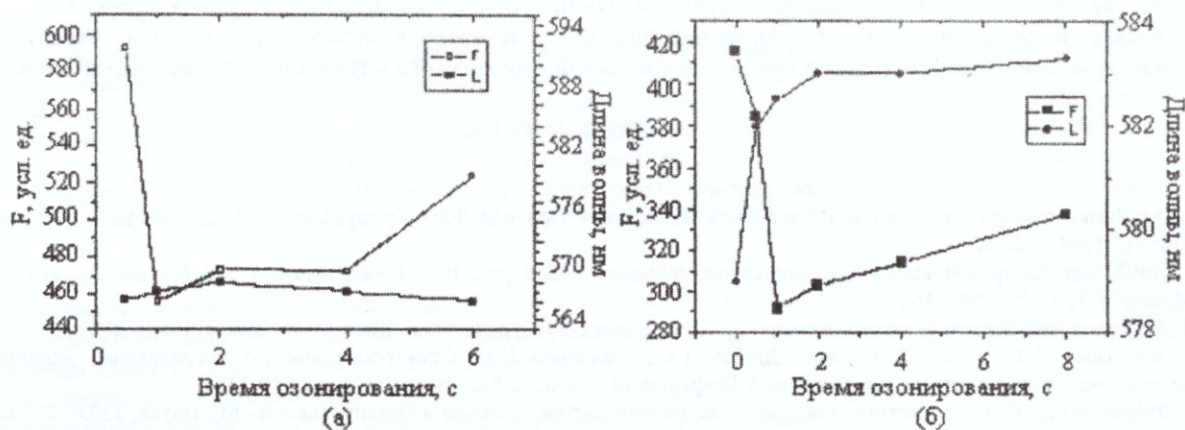


Рис. 6. Изменение интенсивности флуоресценции и положения максимума спектра флуоресценции ДСМ в присутствии холинэстеразы от времени ее озонирования ($\lambda_{\text{возб.}} = 460 \text{ nm}$) (а) и ($\lambda_{\text{возб.}} = 520 \text{ nm}$) (б).

Изменения интенсивности и положения максимумов спектров флуоресценции ДСМ в растворах озонированной холинэстеразы от времени озонирования отражает процесс связывания зонда как с молекулой фермента, так и с ее фрагментами, а также характеризуется изменением полярности микроокружения [19]. Так, при переходе из гидрофобного в гидрофильное окружение наблюдается уменьшение интенсивности и сдвиг максимума флуоресценции в длинноволновую область, что вытекает из рис. 6, 78. Вероятно, это свидетельствует о том, что вначале реакция с озоном в холинэстеразе идет с сохранением ароматического кольца, далее повышение времени озонирования ведет к раскрытию ароматического кольца и образованию промежуточных продуктов с отрицательно заряженными группами, на что указывает повышение флуоресценции зонда.

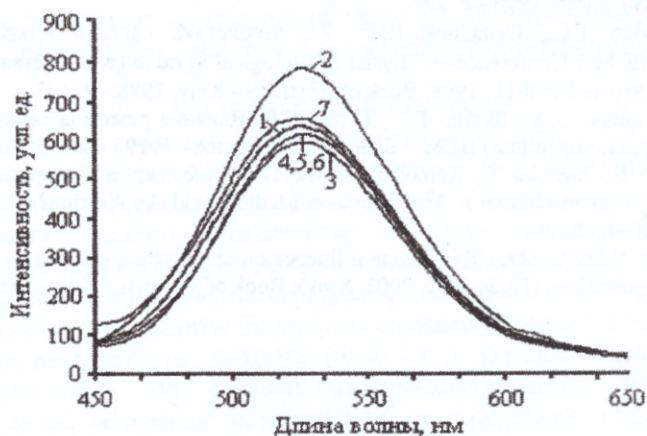


Рис. 7. Влияние озонирования холинэстеразы на спектры флуоресценции ДСМ ($\lambda_{\text{возб.}} = 460 \text{ nm}$): 1 – контроль (без озона); 2 – 0,5 минут озонирования; 3 – 1 минута озонирования; 4 – 2 минуты озонирования; 5 – 4 минуты озонирования; 5 – 6 минут озонирования; 7 – 8 минут озонирования.

Как следует из полученных данных, озон способен оказывать на фермент как активирующее, так и ингибирующее действие.

Обсуждая возможный механизм действия озона на холинэстеразу можно предположить, что увеличение каталитической активности фермента происходит, очевидно, вследствие того, что при данном соотношении фермента и озона обеспечиваются более благоприятные условия для подхода озона к активным центрам, увеличивая каталитическое усиление окисляющего воздействия кислорода. При увеличении времени экспозиции происходит разрушение структуры фермента с образованием озонидов.

ВЫВОДЫ

1. Результаты исследований свидетельствуют о влиянии озона на конформацию белковых молекул.
2. Наиболее интересным является активирующее действие озона в малых дозах, которое, вероятно, можно применить как реактиватор при реконсервации биологического материала после замораживания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С.А., Заугольников С.Д. Реактиваторы холинэстеразы. Л. Медицина, 1970, 165с.
2. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова. - Москва: ИРИУС, 1994.- 226 с.
3. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова. Книга 2.- Москва: ГЭОТАР, 1998.- 440 с.
4. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.- Киев: Наук. думка, 1981.- 208 с.
5. Морозова Т.Ф., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Тимченко Н.Н. Спектроскопическое исследование влияния замораживания на плазму кордовой крови // *Біофізичний вісник*.- 2002.- Вып. 2(11).- С. 110-115.
6. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.- М.: Наука, 1989.- 277 с.
7. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина. - 1987. - 364 с.
8. Разумовский С.Д., Заиков Г.Е. Озон и его реакции с органическими соединениями. - М. - Наука, 1974. - 322 с.
9. Грек А.М., Луговой В.Н., Білоус А.М. Вплив кріопротекторів на спектри флуоресценції альбуміну сироватки крові бика. // *Український біохімічний журнал*. - 1974. - 46. -1. - с.62-66.
10. Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белков. (Природа и применение) // *Биофизика*.- М.: ВИНТИ АН СССР, 1977.- 7.- 189 с.
11. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков.- Киев: Наук. думка, 1988.- 277 с.
12. Соркина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков: Учеб. пособие.- К.: Вища школа, 1990.- 216 с.
13. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / Second Ed.- New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.- 698 p.
14. Садыков А.С., Розенгарт Е.В. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. - Ташкент. - 1976. - 206 с.
15. Dyubko T.S., Nardid O.A., Okladnoy Yu.G. DSM-probe fluorescence spectra analysis at serum albumine conformational changes investigation // *The Jablonski Centennial Conference on Luminescence and Photophysics (23-27 July, 1998)*, Torun -Poland: Book of Abstracts.- Torun, 1998.- P. 275.
16. Нардид О.А., Дюбко Т.С., Окладной Ю.Г. Характеристика свойств плазмы крови с использованием флуоресцентного зонда ДСМ // *Conference on Physics of Biological Systems (with international participations)*, Poushcha-Vodytsa (Kyiv, Ukraine), September 6-10, 1998: Book of Abstracts.- Kyiv, 1998.- P. 123.
17. Гаврик В.А., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Гаташ С.В. Влияние режимов замораживания на взаимодействие фибриногена с флуоресцентным зондом ДСМ // *Біофізичний вісник*. - 1999.- Вып. 5(3).- С. 41-43.
18. Zhydenko V., Gatash S., Dyubko T., Romodanova E. The conformation changes of human serum albumin under influence of freezing and laser irradiation // *7th Confer. on Methods and Applications of Fluorescence*.- Amsterdam. The Netherlands, 16-19 sept. 2001.- P. 214.
19. Belyh I.A., Zinchenko V.D., Dyubko T.S. Ozone influence on cholinesterase study by optical spectroscopy methods // *Spectroscopy in special applications (18-21 June, 2003, Kyiv): Book of abstracts*.- Kyiv, 2003.- P.54.