

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

УДК 577.112:57.043:612.398.12

© Коллектив авторов

### МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

*О.В. Фалько, Н.Г. Землянских\*, О.В. Липина, О.С. Проконюк*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61015 Украина; факс: (057)373-3084;  
эл. почта: nzemliansky@gmail.com

Изменения физико-химических факторов, возникающие в процессе замораживания и низкотемпературного хранения биологических объектов, могут вызывать нарушения структуры белков. Методом Ds-Na-ПААГ электрофореза исследовали спонтанную и диамид-индуцируемую агрегацию белков сыворотки плацентарной крови (СПК), хранившейся при  $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 2 лет. Было установлено, что низкотемпературное хранение сыворотки не вызывало качественных и количественных изменений в распределении фракций белков, денатурированных в Ds-Na, в сравнении с образцами нативной незамороженной СПК. Применение  $\beta$ -меркаптоэтанола выявило, что белки СПК в ходе замораживания–оттаивания не формируют спонтанных агрегатов, ковалентно-сшитых посредством дисульфидных мостиков. Окисление сульфгидрильных групп аминокислотных остатков, индуцированное диамидом и сопровождаемое формированием высокомолекулярных агрегатов, оказалось достаточно эффективным способом для опосредованной оценки структурных изменений белковых макромолекул под влиянием низких температур. В образцах, подвергнутых низкотемпературным воздействиям, агрегируемость белков в присутствии 4 мМ диамида была существенно выше, чем в нативной СПК. Структурные изменения, происходящие в белках СПК под воздействием низких температур и обнаруживаемые по различной чувствительности к диамид–индуцированному формированию белковых агрегатов, не зависели от температуры ( $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ ) и сроков хранения (2 года и 3 недели). Данные изменения отражают реакцию белков на процессы замораживания–оттаивания и могут быть следствием формирования кристаллов льда, которые образуются в незащищённых криопротекторами средах.

**Ключевые слова:** белки, электрофорез, сыворотка плацентарной крови, замораживание, диамид.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** В последние годы поиск биомаркеров, ассоциируемых с заболеваниями человека, стал актуальным направлением биологических и медицинских исследований. В качестве объекта изучения особый интерес представляет сыворотка крови благодаря доступности её получения и способности аккумулировать компоненты секреции и распада клеток, связанные с развитием патологических процессов во всех функциональных системах организма. Сыворотка плацентарной крови (СПК) человека отличается от сыворотки взрослого человека высоким содержанием гормонов, ферментов, ростовых и антипролиферативных факторов, витаминов [1, 2]. Поэтому СПК может служить ценным источником различных биологически активных соединений, используемых для лечения некоторых заболеваний [3, 4]. Ценность СПК обусловлена возможностью использования её для мониторинга состояния здоровья человека с момента рождения, что позволяет выявлять влияние внешних факторов на изменения в организме и развитие различных заболеваний. Данные предпосылки определяют необходимость долгосрочного хранения образцов СПК, что может быть достигнуто благодаря применению низких температур. Однако процессы замораживания-оттаивания и низкотемпературного хранения являются потенциальными стрессами, вызывающими повреждения белковых макромолекул, что может привести к ошибочным выводам при исследовании биомаркеров.

В криобанках сыворотка крови (СК) человека хранится в морозильных камерах при температурах, охватывающих два диапазона:  $-20^{\circ}\text{C}$ ... $-30^{\circ}\text{C}$  и  $-70^{\circ}\text{C}$ ... $-80^{\circ}\text{C}$ . Реже СК хранят при более низких температурах, обеспечиваемых жидким азотом:  $-130^{\circ}\text{C}$ ... $-196^{\circ}\text{C}$ . Изменения, индуцированные низкими температурами, могут проявляться в виде нарушений различных свойств СК. В частности, изменение такого физико-химического свойства многокомпонентной системы, как осмолярность, было обнаружено при хранении образцов в течение 14 дней при  $-21^{\circ}\text{C}$  по данным измерения точки замерзания [5]. Вместе с тем, было установлено, что снижение температуры хранения до  $-78^{\circ}\text{C}$  позволило стабилизировать данный параметр на базовом уровне вплоть до 56 суток [5].

Анализ химического состава в образцах СК, хранившейся в течение 25 лет при  $-25^{\circ}\text{C}$ , выявил изменения содержания мочевой кислоты ( $-7,6\%$ ), калия ( $+26,4\%$ ), билирубина ( $-59,4\%$ ), в то время как уровни натрия, кальция, железа, креатинина не менялись [6]. Одна из причин данных изменений могла заключаться в нарушении взаимодействий между различными компонентами СК, включая взаимодействия между макромолекулами и малыми органическими и неорганическими молекулами. Другое исследование в рамках программы изучения взаимосвязи между параметрами крови в момент её взятия и заболеваниями, проявляющимися у человека с течением времени показало [7], что в образцах СК, хранившейся при  $-25^{\circ}\text{C}$  в криобанке свыше 6 лет, выявлялись изменения концентрации альбумина и свободных жирных кислот. Предполагается, что повышение уровня свободных жирных кислот связано с их высвобождением из липопротеиновых триглицеридсодержащих комплексов, а увеличение содержания альбумина, оценённое колориметрически с использованием красителя бромкрезолового зелёного, обусловлено прогрессирующим разворачиванием макромолекул, вследствие чего большее количество красителя связывается с белком.

Чаще всего нарушения белков СК, индуцированные процессами замораживания-оттаивания и хранением при низких температурах, обнаруживаются по изменению их функциональной активности. Например,

хранение СК человека при  $-30^{\circ}\text{C}$  в отсутствии криозащитных агентов приводило к снижению активности креатинкиназы уже через 24 часа и сопровождалось прогрессирующим падением активности фермента с увеличением продолжительности хранения. При этом начальный уровень активности креатинкиназы в образце не оказывал заметного влияния на скорость инактивации этого фермента в процессе хранения [8]. Снижение температуры хранения сыворотки до  $-70^{\circ}\text{C}$  обеспечивает лучшую сохранность по 17 различным параметрам [9], в том числе и активности креатинкиназы, в сравнении с хранением при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Вместе с тем, даже при  $-70^{\circ}\text{C}$  к 90-м суткам в образцах СК было отмечено изменение активности аланинаминотрансферазы. В отличие от криочувствительной креатинкиназы,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза СК новорождённых телят весьма устойчива при низких температурах и её активность значимо не изменялась после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 недель [10]. Данные исследования [8-10] демонстрируют влияние температурного фактора и длительности хранения на биологическую активность компонентов сыворотки, и отражают индивидуальную чувствительность ферментов сыворотки крови к стрессовым факторам замораживания-оттаивания и низкотемпературного хранения.

Различаются по устойчивости к низким температурам не только ферменты СК, но и регуляторные и транспортные белки. Оценка деградации компонентов СК после 9 летнего хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  в криобанке с использованием иммунорадиометрических и количественных иммуноферментных тестов показала, что уровни инсулиноподобных ростовых факторов I и II, а также белка-3, связывающего инсулиноподобный ростовой фактор, в СК не отличались от показателей в свежееотобранных образцах СК [11]. Вместе с тем, хранение СК более 1 года приводило к нарушениям стабильности адренокортикотропного и фолликулостимулирующего гормонов, иммунореактивного инсулина и белка связывающего йодин [12].

Помимо значений температуры и длительности хранения, повторяемость циклов замораживания-оттаивания в процессе хранения может существенно влиять на стабильность макромолекул. Оценка влияния повторяемости циклов замораживания-оттаивания (до 5 циклов) на стабильность четырёх биомаркеров рака (AFP, CEA, CA125, CA19-9) в СК, хранившейся при  $-40^{\circ}\text{C}$ , выявила, что маркеры AFP, CEA, CA125, в большей мере подвержены влиянию длительности сроков хранения в замороженном состоянии в сравнении с влиянием повторяемости циклов замораживания-оттаивания. Маркер CA19-9 оказался нестабильным в отношении обоих типов воздействий - сроков хранения и количества циклов замораживания-оттаивания [13]. В то же время влияние повторяемости процессов замораживания-оттаивания образцов СК на стабильность IgG и IgM [14] и активность холинэстеразы [15] не обнаруживалось даже после 10 циклов.

Различия в устойчивости белков относительно температурных значений, при которых хранятся замороженные образцы, длительности хранения, повторяемости циклов замораживания-оттаивания, по-видимому, связаны со структурными характеристиками макромолекул и различной чувствительностью структурной организации к резко изменяющимся параметрам окружающей среды при снижении температуры. Самыми очевидными проявлениями структурных нарушений макромолекул, индуцированных замораживанием-оттаиванием и низкотемпературным хранением, являются функциональные изменения белков СК, которые, тем не менее, лишь отражают, но не характеризуют изменения структуры.

Идентификация структурных изменений белков, вызванных низкими температурами, в сравнении, с изменениями, вызванными высокими температурами, нередко представляется весьма сложной задачей из-за их незначительных масштабов или из-за ограниченных возможностей методов анализа структуры. Одним из наиболее часто отмечаемых изменений при замораживании белковых растворов является агрегация части молекул с образованием агрегатных белковых комплексов различной структуры и устойчивости [16, 17].

В данном исследовании предпринята попытка оценить косвенным путём структурные изменения белковых субъединиц в сыворотке плацентарной крови человека, замороженной до  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  и хранившейся до 2 лет в данных условиях, в связи с чем была исследована возможность спонтанной и диамид-индуцированной агрегируемости белковых компонентов методом Ds-Na-ПААГ электрофореза.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали следующие реактивы: диамид, фенилметилсульфонилфлуорид (PMSF), азид натрия, Трис, ЭДТА, додецилсульфат натрия (Ds-Na),  $\beta$ -меркаптоэтанол, краситель Coomassie Brilliant Blue G-250, акриламид, бис-акриламид (“Sigma”, США), бромфеноловый синий (“Serva”, Германия), ТХУ, NaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (х.ч. или о.с.ч.) производства России и Украины.

Материалом исследования служила сыворотка плацентарной крови человека, которую получали из вены пупочного канатика на основании письменного информированного согласия рожениц. Кровь оставалась при комнатной температуре не более 4 ч, после чего её помещали в холодильник при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  на 6-8 часов для максимального сжатия образовавшегося сгустка и отделения жидкой фракции крови. После центрифугирования образцов при 2500 об/мин (центрифуга ОС-6М, Кыргызская Республика) в течение 15 минут СПК отделяли и помещали в криопробирки (“Corning”, Мексика) объёмом 1 мл. Замораживание проводили в морозильной камере при медленном понижении температуры в образце со скоростью 1-2 мин до  $-20^{\circ}\text{C}$  или посредством погружения в жидком азоте, приводящим к быстрому снижению температуры со скоростью  $300-400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$ . Образцы замороженной СПК исследовали после 3-х недель и 2 лет хранения при указанных температурах. Размораживание образцов проводили на водяной бане при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

Аликвоты нативной и размороженной СПК смешивали с 9 объёмами 75 мМ раствора NaCl. К 50 мкл разведенной сыворотки добавляли 25 мМ раствор диамида до конечной концентрации 2,5, 4 и 6 мМ и инкубировали с ним или без него в течение 1 ч при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакцию окисления диамидом сульфгидрильных групп белков останавливали добавлением электрофорезного Sample-буфера (0,05 М Трис-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 20% глицерин, 0,7 мг/мл PMSF, 0,4 мг/мл  $\text{NaN}_3$ , 0,01% бромфеноловый синий). Аликвоты сыворотки, инкубированные без диамида, растворяли в Sample-буфере данного состава или с включением в него 5%-го  $\beta$ -меркаптоэтанола. Аликвоты нативной, незамороженной сыворотки плацентарной крови, инкубированные с диамидом или без него, после добавления Sample-буфера подвергали электрофорезному разделению или хранили при  $-196^{\circ}\text{C}$  до проведения электрофореза. Хранение белков в Sample-буфере при низкой температуре не влияло на разделение белков, что позволило синхронизировать проведение электрофореза с образцами сыворотки, хранившейся длительное время в криобанке.



Электрофорез проводили в камере Bio Rad Protein II Multi-Gel Casting chamber в плоских вертикальных Ds-Na-ПААГ по системе Лемли [18]. В качестве разделяющего использовали градиентный гель с концентрацией полимеризуемых веществ 5-20%. Образцы наносились по 20 мкл в ячейки стартового геля. Конечная концентрация белка в образцах не превышала 0,3 мг/мл. Белки разделяли при силе тока 25 мА и напряжении 100 В в течение 15 ч при температуре 4°C, после чего гели фиксировали в 10%-м растворе ТХУ в течение 2 ч. Белки окрашивали Coomassie BB G-250 при комнатной температуре в течение 1 ч. Избыток красителя отмывали, несколько раз меняя раствор 7%-й уксусной кислоты. Для идентификации молекулярных весов белков использовали набор стандартных маркерных белков “Fermentas life sciences” Rageruler SM0661.

Оценку относительного содержания белков различных фракций на дорожке Ds-Na-ПААГ проводили с помощью денситометрирования (денситометр DM2120 “Solar”) и компьютерной программы Scion Image. Результаты выражали в процентном отношении к общему содержанию белка. Определение общего белка проводили по методу Бредфорд [19].

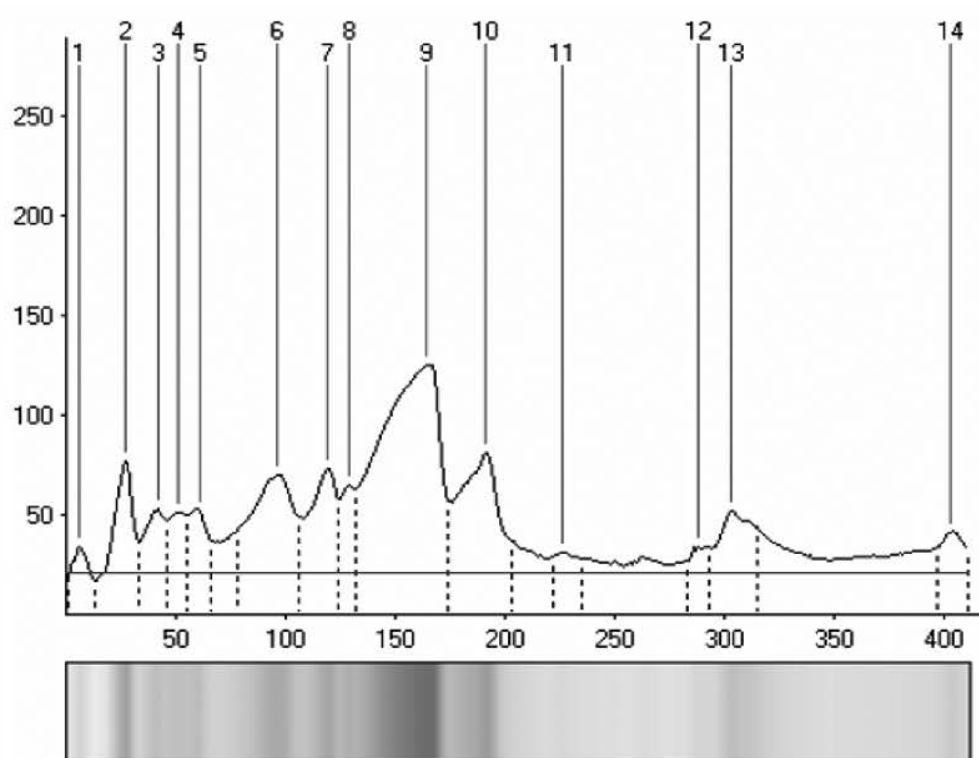
Статистическая обработка данных выполнена с использованием компьютерной программы “Stat Graphics 2.0 for Win”. Достоверность различий между выборками оценивали непараметрическим методом с использованием критерия знаков [20]. Количество экспериментов в каждой серии опытов было не менее пяти.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Исследование белков СК методом двумерного электрофореза после предварительного фракционирования образцов и удаления основных белков, препятствующих детальному анализу, позволило выделить 3700 отдельных белковых пятен, принадлежащих 325 различным белкам [21]. Одномерный электрофорез с использованием детергента Ds-Na, который связывается с белками с постоянным весовым соотношением, позволяет фракционировать белки в соответствии с их молекулярной массой, вследствие чего каждая отдельная полоса может быть представлена несколькими денатурированными полипептидами, принадлежащими отдельным субъединицам различных белков, имеющих сходную молекулярную массу. На рисунке 1 представлена электрофореграмма белков нативной СПК. Выбранные параметры геля позволяют идентифицировать до 14 отдельных фракций неравномерной интенсивности (рис. 1а). Количественная оценка относительного содержания белков каждой отдельной фракции представлена в таблице 1. Так же как и в сыворотке крови взрослых доноров, основным белком СПК является альбумин, доля которого варьирует в пределах 30-40% у отдельных индивидуумов. Нередко альбумин может перекрывать собой близлежащие фракции белков, которые по молекулярной массе незначительно отличаются от альбумина, что приводит к сокращению количества идентифицируемых фракций, как показано на рисунке 1б.

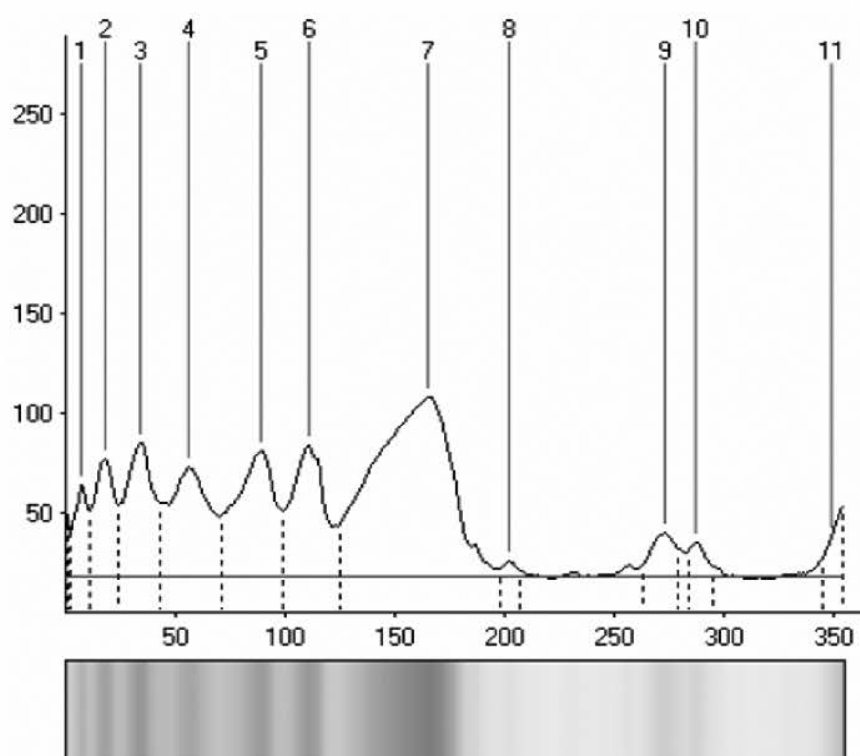
Таблица 1. Содержание белка в различных фракциях нативной сыворотки плацентарной крови.

Пик денситограммы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Содержание белка, %	0,7	4,5	3,2	2,5	2,9	9,9	6,8	3,2	33,2	11,5	1,1	1,0	5,0	2,3

Примечание: Здесь и в таблице 2 отражены результаты одного типичного эксперимента.



**а**

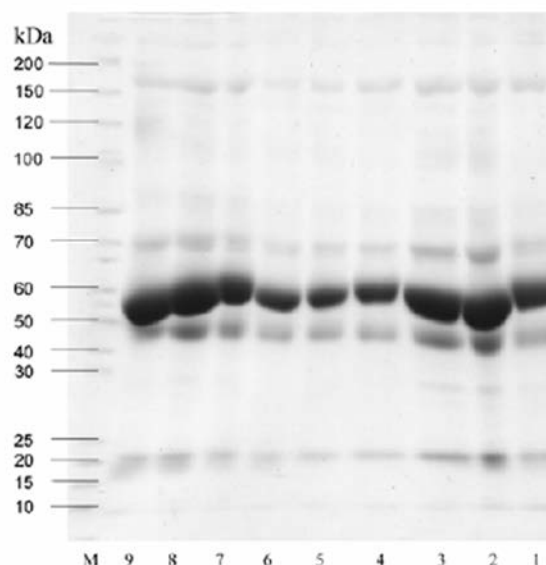


**б**

**Рисунок 1.**

Денситограммы белков нативной сыворотки плацентарной крови. (а)- разделение белков на 14 фракций, (б)-разделение белков на 11 фракций. Фракции 9 (а) и 7 (б) - зона альбумина.

Хранение сыворотки в течение 2 лет при температурах  $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  не сопровождалось существенными изменениями в распределении фракций белков, денатурированных в Ds-Na относительно образцов сыворотки, не подвергавшихся замораживанию. Это в равной мере относилось к белкам, которые перед фракционированием были растворены в Sample-буфере, содержащем  $\beta$ -меркаптоэтанол, и в буфере, не содержащем данного реагента (рис. 2; дорожки 1 и 2; 4 и 5; 7 и 8 соответственно). Такое сходство в распределении белков при включении/исключении в Sample-буфер  $\beta$ -меркаптоэтанола - реагента, который восстанавливает SH-группы, свидетельствует об отсутствии в образцах сыворотки значимого для идентификации количества белковых агрегатов, сформированных из отдельных субъединиц, связанных между собой дисульфидными мостиками.



**Рисунок 2.**

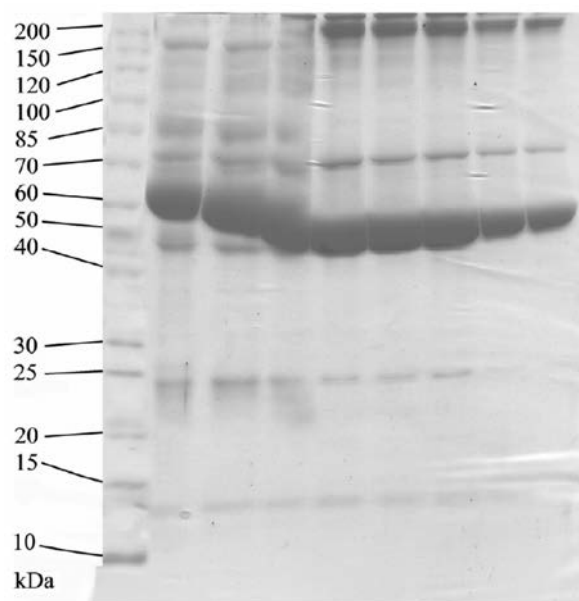
Электрофорез белков сыворотки плацентарной крови.

(1-3) - нативная сыворотка: солюбилизация в Sample-буфере без  $\beta$ -меркаптоэтанола (1) и с включением данного реагента (2); (3) - сыворотка, инкубированная с 2,5 мМ диамидом. (4-6) - сыворотка хранившаяся в течении 2 лет при  $-196^{\circ}\text{C}$ : солюбилизация в Sample-буфере без  $\beta$ -меркаптоэтанола (4) и с включением данного реагента (5); (6) - сыворотка, инкубированная с 2,5 мМ диамида. (7-9) - сыворотка хранившаяся в течении 2 лет при  $-20^{\circ}\text{C}$ : солюбилизация в Sample буфере без  $\beta$ -меркаптоэтанола (7) и с включением данного реагента (8); (9) - сыворотка, инкубированная с 2,5 мМ диамида. (3, 6, 9) - белки сыворотки плацентарной крови, инкубированные с диамидом солюбилизированны в Sample-буфере, не содержащем  $\beta$ -меркаптоэтанол.

Инкубирование образцов СПК нативной и размороженной после двухлетнего хранения при температурах  $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  с диамидом в концентрации 2,5 мМ также не вызывало значимых изменений в распределении отдельных белковых фракций (рис. 2; дорожки 3, 6, 9). Таким образом, диамид, потенциальный окислитель SH-групп, способный сшивать отдельные субъединицы белка с формированием белковых агрегатов большой молекулярной массы, оказался неэффективным в данной концентрации и белки нативной и размороженной СПК никак не реагировали на данную концентрацию диамида.

## МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Увеличение концентрации диамида до 4 и 6 мМ по-разному влияло на белки нативной и размороженной СПК (рис. 3). В нативной сыворотке в присутствии 4 мМ диамида лишь незначительная часть белков подвергалась окислению с образованием агрегатных высокомолекулярных комплексов, доля которых существенно увеличивалась при повышении концентрации диамида до 6 мМ (рис. 3; дорожки 3, 4; табл. 2). Агрегаты, сформированные в присутствии диамида, представлены 2 полосами и перекрывают зоны геля, в которых обычно находятся нативные белки. Однако выделять в данной зоне долю высокомолекулярных нативных белков представляется нецелесообразным, поскольку нет весомых оснований полагать, что данные белки не могут вовлекаться в диамид-индуцированную агрегацию, а разрешающая способность геля не позволяет идентифицировать белковые агрегаты, существенно превышающие по молекулярной массе 250 кДа. Белки, в образцах СПК, хранившихся при  $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 2 лет, реагировали на присутствие 4 и 6 мМ диамида практически одинаково, демонстрируя вовлечение существенной доли белков в формирование высокомолекулярных агрегатов не только при высокой, но и при средней концентрации диамида (рис. 3 дорожки 5, 6 и 7, 8). Появление диамид-индуцированных агрегатных комплексов сопровождалось элиминированием ряда белковых фракций, относящихся к диапазонам молекулярных масс 120-60 кДа и 40-20 кДа, относительное содержание которых снижалось до следовых количеств (рис. 4). В то же время, содержание белка в зоне альбумина не изменялось, что может свидетельствовать о его слабой чувствительности к окисляющему SH-группы реагенту или о высокой структурной устойчивости при низких температурах.



**Рисунок 3.**

Электрофорез белков сыворотки плацентарной крови, инкубированной с 4 и 6 мМ диамидом.

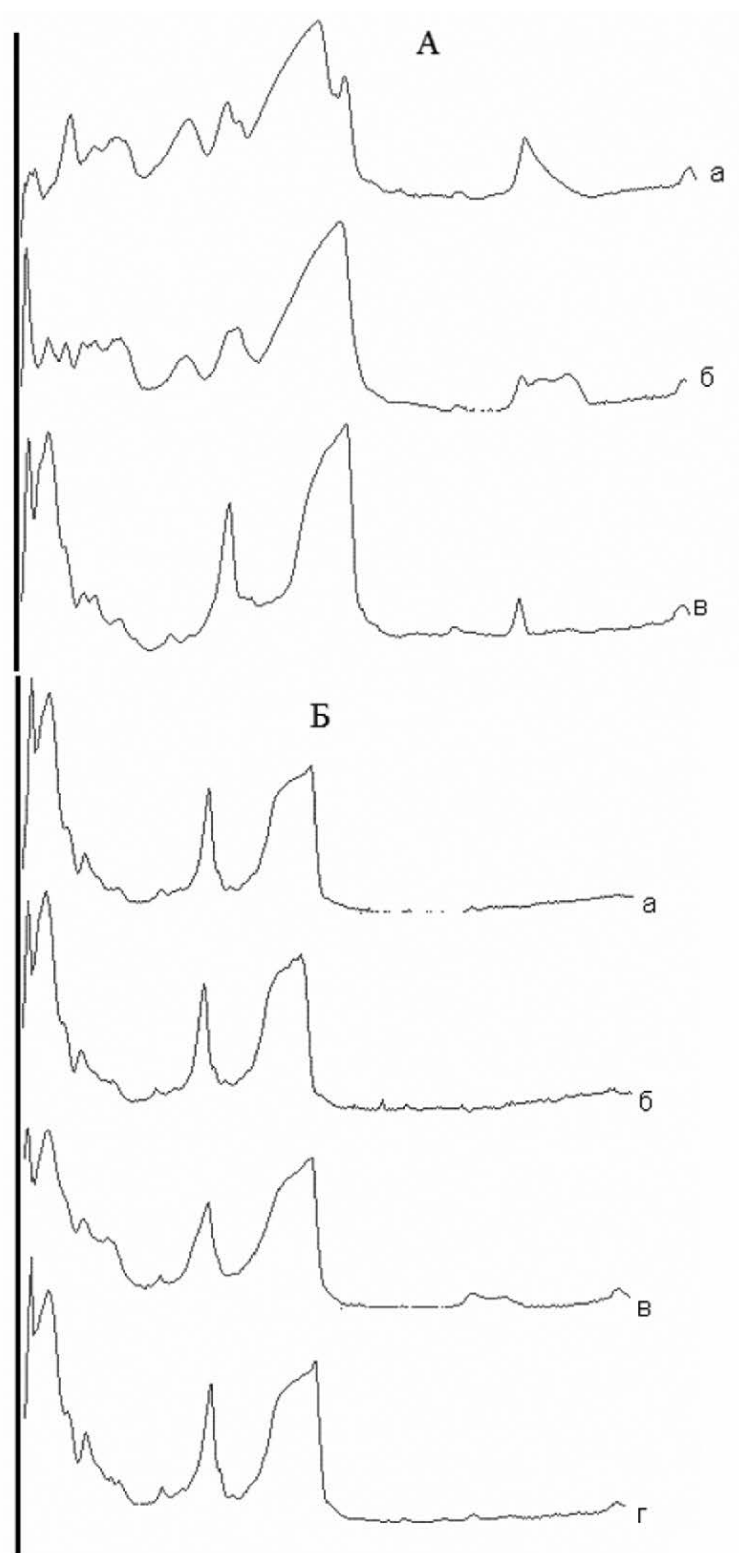
(1-4) - нативная сыворотка плацентарной крови; (1) - белки, солубилизированные в Sample-буфере без  $\beta$ -меркаптоэтанола и (2) в присутствии данного реагента;

(3) - сыворотки плацентарной крови, инкубированная с 4 мМ и (4) с 6 мМ диамидом.

(5-6) - образцы сыворотки плацентарной крови хранившаяся в течении 2 лет при  $-196^{\circ}\text{C}$  с последующей инкубацией с 4 мМ (5) и с 6 мМ (6) диамидом. (7-8) - сыворотка хранившаяся в течении 2 лет при  $-20^{\circ}\text{C}$  с последующей инкубацией с 4 мМ (7) и 6 мМ (8) диамидом.

Белки всех образцов сыворотки, инкубированных с диамидом солубилизированы в Sample-буфере без  $\beta$ -меркаптоэтанола.





**Рисунок 4.**

Изменение спектра белков сыворотки плацентарной крови под влиянием диамида.

А - нативная сыворотка: (а) в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола; (б) сыворотка, инкубированная с 4 мМ и (в) с 6 мМ диамидом. Б - сыворотка хранившаяся 2 года при  $-196^{\circ}\text{C}$  (а, б) и  $-20^{\circ}\text{C}$  (в, г) с последующей инкубацией с 4 мМ (а, в) и 6 мМ (б, г) диамидом. Белки образцов сыворотки, инкубированные с диамидом, солюбилизованы в Sample-буфере не содержащем  $\beta$ -меркаптоэтанола.

## МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Таблица 2. Содержание агрегатных белковых комплексов, индуцированных диамидом, в образцах нативной и хранившейся при низких температурах плацентарной сыворотки.

	Номер проба	Нативная сыворотка				Замораживание при -196°С		Замораживание при -20°С	
Концентрация диамида, мМ	–	0	2,5	4,0	6,0	4,0	6,0	4,0	6,0
Диамид- индуцированные агрегаты	1	–	–	4,7	4,8	7,1	7,2	5,2	5,0
	2			5,2	14,5	18,6	18,0	16,3	17,0
Нативные высокотемперату- роустойчивые белки	1	1,1	1,3	–	–	–	–	–	–
	2	4,9	4,7						

Поскольку биологическая активность различных компонентов сыворотки, как ранее было отмечено, зависит от длительности низкотемпературного хранения нами были исследованы диамид-индуцированные изменения в образцах СПК, хранившихся при -20° и -196°С в течение 3 недель. Рисунок 5 показывает, что принципиально реакция белков в образцах, хранившихся в течение 3 недель на добавление диамида, не отличается от реакции белков сыворотки, хранившихся в течение 2 лет (рис. 3). Количество агрегатов белков СПК, формируемых под воздействием реагента, было сопоставимо при разных сроках низкотемпературного хранения образцов. Кроме того, после трёхнедельного хранения СПК не обнаруживались отличия между диамид-индуцированной агрегируемостью белков в образцах в зависимости от температуры хранения, что было также характерно для образцов, хранившихся в течение 2 лет. Следовательно, структурные изменения, происходившие в белках СПК под воздействием низких температур и обнаруживаемые по различной чувствительности к диамид-индуцированному формированию агрегатов, не зависят от температуры и сроков хранения, и скорее всего, отражают реакцию белков на процессы замораживания-оттаивания.

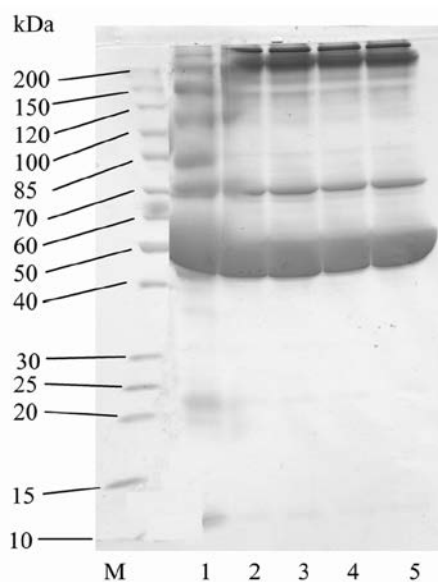


Рисунок 5.

Электрофорез белков сыворотки плацентарной крови хранившейся 3 недели при -196°С (2, 3) и -20°С (4, 5). (1) - нативная сыворотка плацентарной крови, солюбилизированная в Sample-буфере без включения β-меркаптоэтанола, (2, 4)- сыворотка плацентарной крови инкубированная с 4 мМ и (3,5) с 6 мМ диамидом.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Замораживание биологического материала направлено на сохранение структуры различных биомолекул, клеток и тканей. Сохранность биообъектов при низких температурах обеспечивается подавлением различных типов молекулярных движений и прекращением метаболических и биохимических реакций. Однако изменения физико-химических параметров среды, возникающие в ходе охлаждения, могут негативно влиять на структуру белков [22]. К числу изменений параметров окружения белковых молекул, возникающих под влиянием низких температур, можно отнести: увеличение концентраций всех веществ растворенных в среде, в том числе солей, и, как следствие, резкое увеличение ионной силы раствора; возможность кристаллизации одного из компонентов буфера при охлаждении, сопровождающейся большими изменениями pH; низкую температуру, которая сама по себе может быть причиной холодовой денатурации белков; формирование кристаллов льда при контакте, с которыми макромолекулы способны подвергаться разворачиванию, и ряд других причин.

В размороженной СПК мы обнаружили, что распределение белков по молекулярной массе в системе Ds-Na-ПААГ не отличается от нативных образцов. Количество белковых полос и их интенсивность в образцах СПК, замороженных и хранившихся на протяжении 2-х лет при температурах  $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ , не отличались от распределения белковых фракций в нативной, не подвергавшейся замораживанию сыворотке. К тому же, присутствие восстанавливающего SH-группы реагента  $\beta$ -меркаптоэтанола в составе Sample-буфера не оказывало значимого влияния на состав белковых фракций и не меняло интенсивности пиков денситограмм. Использование данного реагента было продиктовано попыткой обнаружения в белковом препарате макромолекулярных форм, состоящих из отдельных субъединиц, связанных между собой дисульфидными мостиками. Если бы такие комплексы существовали, то присутствовать они могли бы в составе различных фракций с молекулярными массами от средних до высоких значений в зависимости от молекулярных масс сшитых субъединиц. Однако, данное предположение не подтвердилось и изменений интенсивности пиков денситограмм белков в присутствии и в отсутствии восстанавливающего реагента выявлено не было ни в нативных, ни в замороженных и хранившихся при различных температурах образцах СПК. Таким образом, применение  $\beta$ -меркаптоэтанола подтвердило, что белки СПК в ходе замораживания–оттаивания не подвергаются структурным изменениям, которые позволяли бы им спонтанно агрегировать с участием ковалентных сшивок между отдельными макромолекулами.

Образование белковых агрегатов достаточно часто наблюдается после замораживания-оттаивания белковых препаратов. При этом образовавшиеся агрегаты могут быть как растворимыми, так и нерастворимыми. Появление нерастворимых агрегатов было отмечено после замораживания фосфофруктокиназы, лактатдегидрогеназы [23] и гормона роста человека [17]. Лиофилизированный человеческий альбумин, для получения которого использовались низкотемпературные технологии, при разведении формировал фракцию растворимых агрегатов [24]. Важно отметить, что нарушение белковой структуры, сопровождаемое формированием агрегатов, может быть вызвано различными факторами, в том числе холодовым и тепловым воздействиями. При исследовании различий структурной организации агрегатов моноклонального IgG<sub>1</sub> [25], индуцированных повышением и понижением температуры с применением методов спектроскопии,

динамического светорассеивания и Ds-Na-ПААГ было показано, что при тепловом стрессировании белковые агрегаты были частично сшиты через дисульфидные мостики и сформированы из конформационно возмущённых мономеров. Агрегаты IgG<sub>1</sub> после замораживания-оттаивания не были ковалентно связаны и содержали нативноподобные мономеры. Сходство электрофоретических профилей разделения белков нативной и замороженной СПК, полученных с применением и исключением β-меркаптоэтанола, также подтвердило отсутствие в составе замороженных образцов СПК белковых агрегатов, образованных с участием дисульфидных мостиков.

Замораживание белковых растворов без применения криозащитных агентов, как правило, сопровождается формированием кристаллов льда в окружении макромолекул. Изучение фосфоресцентной эмиссии триптофановых (Trp) остатков белков было эффективно использовано для мониторинга динамической структуры полипептида, отражающей конформационные изменения в присутствии кристаллов льда [26]. Было показано, что при -12°C, когда переохлаждённый раствор переходит в твёрдую фазу, время жизни фосфоресценции τ Trp в азурина падало в 30 раз, что указывало на существенный прирост полипептидной гибкости. Данный феномен подтвердился при исследовании и других белков, в том числе, рибонуклеазы T<sub>1</sub>, алкогольдегидрогеназы печени, лактатдегидрогеназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Во всех случаях индуцированное кристаллами льда снижение τ объясняется потерей макромолекулами нативной структуры и частичным разворачиванием, охватывающим ригидные домены полипептидов, в которых локализованы триптофановые остатки [27, 28]. Триггером таких нарушений может быть адсорбция макромолекул на границе раздела жидкость/лёд. Более детальная информация об изменениях третичной структуры белков при контакте с кристаллами льда была получена с использованием флуоресцентного зонда ANS, интенсивность флуоресценции которого резко увеличивается при связывании с неполярными сайтами белковых молекул [29]. На примере азурина, свободном от меди, было продемонстрировано, что в замороженном растворе флуоресценция ANS возрастала в несколько раз, подтверждая структурные нарушения белков, связанные с появлением на поверхности макромолекул гидрофобных зон, которые не свойственны нативному состоянию. Такие перестройки в белках при замораживании в отсутствие криопротекторных агентов, увеличивающие гибкость полипептидной цепи и способствующие экспонированию внутридоменных гидрофобных сайтов на поверхность макромолекул, могут также повышать доступность реактивных SH-групп белков к окисляющему действию диамида. Специфическим результатом такого реагирования является формирование высокомолекулярных белковых агрегатов.

Как показали наши исследования, белки нативной незамораживаемой СПК и образцы СПК, хранившиеся при низких температурах (-20° и -196°C) в течение 2 лет, действительно имели различную чувствительность к диамиду. Наиболее очевидно эти различия появлялись при концентрации реагента 4 мМ. В присутствии 2,5 мМ диамида какие-либо изменения в белковом профиле Ds-Na-ПААГ вообще не обнаруживались (рис. 2). Увеличение концентрации диамида до 6 мМ в значительной степени нивелировало различия в формировании высокомолекулярных белковых агрегатов в образцах нативной и хранившейся при низких температурах СПК, хотя такие различия все же сохранялись (рис. 6). Ранее было показано, что формирование высокомолекулярных агрегатов белков мембранно-цитоскелетного комплекса

эритроцитов зависит от концентрации диамида и продолжительности инкубирования клеток с данным веществом [30]. Действие диамида на белки не является специфическим, но, несомненно, его эффективность в отношении различных белков, отличающихся специфическими структурными характеристиками, неодинакова. Так для эритроцитарных цитоскелетных белков было показано, что он преимущественно действует на спектриновые полипептиды [31]. Для того, чтобы выявить нарушения в белках мембранно-цитоскелетного комплекса эритроцитов под влиянием замораживания-оттаивания, достаточным оказалось присутствие реагента в концентрации 2,5 мМ [32]. Белки сыворотки, в отличие от упорядоченной сети белков цитоскелета, объединенных в единую структуру специфическими белок-белковыми взаимодействиями, являются свободными, несвязанными макромолекулами. Возможно, именно данная особенность определяет необходимость более высоких концентраций диамида, чтобы индуцировать окисление SH-групп и формирование белковых агрегатных комплексов, связанных дисульфидными связями

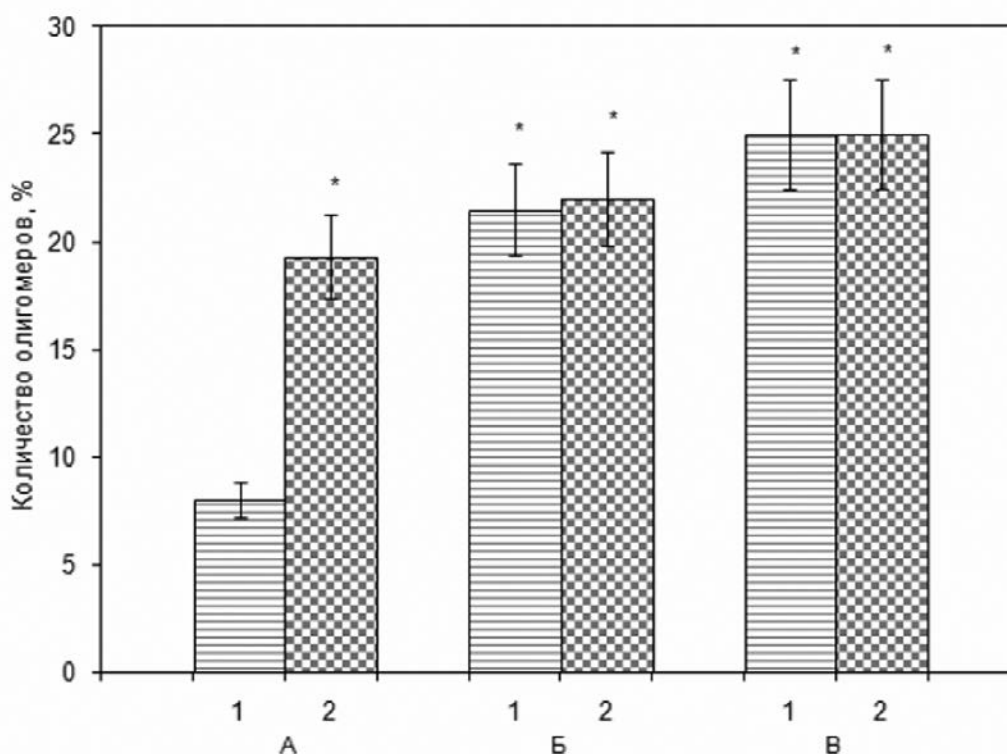


Рисунок 6.

Содержание диамид-индуцированных агрегатов в спектре белков сыворотки плацентарной крови: (1-2) - нативная сыворотка, инкубированная с 4мМ (1) и с 6 мМ (2) диамидом.

(3-4) - сыворотка хранившаяся 2 года при -20°С, с последующей инкубацией (3) с 4 мМ и (4) с 6 мМ диамидом. (5-6) - сыворотка, хранившаяся 2 года при -196°С с последующей инкубацией с 4 мМ (5) и 6 мМ (6) диамидом.

Результаты представлены в виде средних величин  $\pm$  стандартная ошибка.

Таким образом, более высокая агрегируемость белков СПК, хранившейся при низких температурах, в сравнении с образцами нативной СПК свидетельствует о нарушении структуры части белков при замораживании-оттаивании в отсутствии криопротекторных агентов.



Очевидно, основной причиной таких нарушений может быть формирование кристаллов льда в замороженном состоянии, хотя возможность влияния других факторов среды, меняющихся с понижением температуры, на структуру белков также нельзя исключить. Полученные данные указывают на то, что структурные изменения, связанные с диамид-индуцируемой агрегируемостью белков, обусловлены именно процессами замораживания-оттаивания, поскольку различий, связанных с длительностью (2 года и 3 недели) и температурами ( $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ ) хранения, в формировании диамид-индуцированных агрегатов белков нами не обнаружено.

Среди всех белков сыворотки крови наибольшую устойчивость к окисляющему действию диамида проявляет альбумин, содержание которого в нативных образцах и в образцах, хранившихся при низких температурах, не меняется при любых использованных концентрациях диамида. Известно, что альбумин человека содержит одну сульфгидрильную группу в цистеине-34, которая может подвергаться окислению [33]. Однако в наших экспериментах было обнаружено, что диамид в исследованных концентрациях не затрагивал альбумин, что могло быть связано с какими-то особенностями его структуры, которые требуют более высоких концентраций реагента или увеличения продолжительности его действия. Вместе с тем, данная особенность поведения альбумина при замораживании в составе сыворотки крови, но не в изолированном виде, может свидетельствовать о значительной криостабильности структурной организации данного белка.

Таким образом, замораживание сыворотки плацентарной крови ведёт к изменениям в структуре белков, результатом чего является повышение доступности SH-групп к окисляющему действию диамида, сопровождаемому образованием высокомолекулярных белковых агрегатов. Данные изменения, связаны, по-видимому, с влиянием процессов замораживания-отогрева на структуру белков, поскольку различия в диамид-индуцируемой агрегируемости белков не зависят от сроков и температуры хранения образцов сыворотки плацентарной крови.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wan G., Yu S., Liu J. (1998) J. Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih., **33**, 720-721.
2. Schneider H., Maiek A. (1995) J. Perinat. Med., **23**, 71-76.
3. Kyung-Chul Yoon, Hwan Heo, In-Yong Jeong, Yeoung Geol Park (2005) Kor. J. Ophthalmol., **19**(3), 174-178.
4. Sagawa N., Yura S., Itoh H., Kakui K., Takemura M., Nuamah M.A., Ogawa Y., Masuzaki H., Nakao K., Fujii S. (2002) J. Endocrine, **19**(1), 65-71.
5. Seifarth C.C., Miertschischk J., Hahn E.G., Hensen J. (2004) Clin. Chem. Lab. Med., **42**(8), 927-932.
6. Gislefoss R.E., Grimsrud T.K., Mørkrid L. (2008) Scand. J. Clin. Lab. Invest., **68**, 402-409.
7. Høstmark A.T., Glattre E., Jellum E. (2001) Scand. J. Clin. Lab. Invest., **61**, 443-447.
8. Lev E.I., Hendler I., Siebner R., Tashma Z., Wiener M., Tur-Kaspa I. (1994-1995) Enzyme Protein, **48**, 238-242.
9. Cray C., Rodriguez M., Zaias J., Altman N.H. (2009) J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., **48**, 202-204.
10. Muller F., Tyler J.W., Parish S.M., Johnson K.A., Krytenberg D.S., Wilson L.K. (1997) J. Am. Vet. Res., **58**, 354-355.

11. Ito Y., Nakachi K., Imai K., Hashimoto S., Watanabe Y., Inaba Y., Tamakoshi A., Yoshimura T. (2005) J. Epidemiol., Suppl. **1**, 67-73.
12. Shurygin D.Ia., Kholodnyi A.Ia., Mazurov V.I., Iakovlev V.A. (1981) Probl. Endokrinol. (Mosk), **27**(3), 32-35.
13. Gao Y.C., Yuan Z.B., Yang Y.D., Lu H.K. (2007) Scand. J. Clin. Lab. Invest. **67**(7), 741-747.
14. Siennicka J., Laskowska A., Trzcinska A. (2010) Med. Dosw. Mikrobiol., **62**(3), 281-283.
15. Huizenga J.R., van der Belt K., Gips C.H.J. (1985) Clin. Chem. Clin. Biochem., **23**(5), 283-285.
16. Natalello A., Santarella R., Doglia S.M., de Marco A. (2008) Protein Expr. Purif., **58**(2), 356-361.
17. Eckhardt B.M., Oeswein J.Q., Bewley T.A. (1991) Pharm. Res., **8**(11), 1360-1364.
18. Остерман Л.А. (1981) Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование Наука, Москва.
19. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
20. Бейли Н. (1963) Статистические методы в биологии. Мир, Москва.
21. Pieper R., Gatlin C.L., Makusky A.J., Russo P.S., Schatz C.R., Miller S.S., Su Q., McGrath A.M., Estock M.A., Parmar P.P., Zhao M., Huang S.T., Zhou J., Wang F., Esquer-Blasco R., Anderson N.L., Taylor J., Steiner S. (2003) Proteomics, **3**, 1345-1364.
22. Bhatnagar B.S., Bogner R.H., Pikal M.J. (2007) Pharm. Dev. Technol., **12**(5), 505-523.
23. Chang B.S., Kendrick B.S., Carpenter J.F. (1996) J. Pharm. Sci., **85**, 1325-1330.
24. Lin J.J., Meyer J.D., Carpenter J.F., Manning M.C. (2000) Pharm. Res., **17**, 391-396.
25. Hawe A., Kasper J.C., Friess W., Jiskoot W. (2009) Eur. J. Pharm. Sci., **38**, 79-87.
26. Strambini G.B., Gabellieri E. (1996) Biophys J., **70**(2), 971-976.
27. Gonnelli M., Strambini G.B. (1995) Biochemistry, **34**, 13847-13857.
28. Gonnelli M., Strambini G.B. (1986) Biophys. Chem., **24**, 161-167.
29. Gabellieri E., Strambini G.B. (2003) Biophys. J., **85**, 3214-3220.
30. Deuticke B., Poser B., Lütke-meier P., Haest C.W. (1983) Biochim. Biophys. Acta., **731**, 196-210.
31. Fischer T.M., Haest C.W., Stöhr M., Kamp D., Deuticke B. (1978) Biochem. Biophys. Acta., **510**, 270-282.
32. Землянских Н.Г., Денисова О.Н. (2009) Биофизика, **54**, 693-703.
33. Turell L., Carballal S., Botti H., Radi R., Alvarez B. (2009) Braz. J. Med. Biol. Res., **42**, 305-311.

Поступила: 20. 06. 2011.

**MODIFICATION OF PLACENTA BLOOD SERUM PROTEINS UNDER  
LOW TEMPERATURE EFFECT**

*O.V. Falko, N.G. Zemlianskykh, O.V. Lipina, O.S. Procopyuk*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS Ukraine, Pereyaslavskaya ul., 23,  
Kharkiv, 61015 Ukraine; fax: (057)373-30-84; e-mail: nzemliansky@gmail.com

Changes in environmental physical and chemical factors upon freeze-thawing and low temperature storage of biological samples can result in impairments of protein structures. This work specifies spontaneous and diamide-induced protein aggregations of placenta blood serum stored at  $-20^{\circ}$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  during 2 years with SDS-PAGE. It was shown that storage of placenta blood serum at low temperatures did not cause any quantitative and qualitative changes in fraction distribution of proteins denatured with SDS in comparison to the native samples which were not frozen. Application of  $\beta$ -mercaptoethanol revealed that placenta blood serum proteins upon freeze-thawing did not form spontaneous aggregates linked by disulphide bridges. Oxidation of amino acid sulfhydryl groups induced by diamide and accompanied by high molecular aggregate formation proved to be a quite effective way for indirect estimation of structural changes in protein upon low temperature effects. In samples thawed after low temperature storage the protein aggregation with  $4\text{ }\mu\text{M}$  diamide was significantly higher than in native serum. These discrepancies between native and frozen-thawed samples are stipulated by impairments of protein structure under low temperature and increased in accessibility of reactive SH-groups of proteins for oxidation with diamide. Structural changes in placenta blood serum proteins, which caused by low temperatures and revealed by elevated sensibility to diamide-induced aggregate formation, did not depend on temperature ( $-20^{\circ}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ ) and storage terms (2 years and 3 weeks). They reflect protein reaction to freeze-thawing processes and could be sequence of ice crystal formation which takes place in unprotected media.

**Key words:** proteins, electrophoresis, placenta blood serum, freezing, diamide.