

## О влиянии низких температур на биомакромолекулы

О.А. НАРДИД, Е.Д. РОЗАНОВА, М.И. ШЕТИНСКИЙ, Э.О. НАРДИД  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## On the Low Temperature Effect on Biomacromolecules

O.A. NARDID, E.D. ROZANOVA, M.I. SCHETINSKY, E.O. NARDID  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Условия, в которых находятся биомакромолекулы при криоконсервировании, могут оказывать существенное влияние на конформацию белка, так как при этом могут изменяться гидрофобные взаимодействия и водородные связи, определяющие и стабилизирующие третичную и четвертичную структуры. Нарушение межмолекулярных взаимодействий может привести к структурной реорганизации, проявляющейся в агрегации отдельных биомакромолекул. Такие изменения отдельных биомакромолекул сказываются на выполняемых ими функциях, обеспечении их устойчивости и надмолекулярной организации.

В настоящей работе изучены закономерности влияния низких температур и криопротекторов на внутри- и межмолекулярные взаимодействия белков и оценена роль этих взаимодействий в резистентности биоструктур при низкотемпературном воздействии.

Динамическую структуру водно-белковой системы изучали, используя гидрофильный спиновый зонд ТЕМПОН и спин-меченую стеариновую кислоту (16-ДС). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Bruker ER-100». Гель-хроматографию осуществляли на колонке 1×27 см с сефадексом G-200. Для характеристики конформации биомакромолекул использовали спектры поглощения и их первые производные, а также их спектры флуоресценции. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Pye Unicam SP 8000», спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010». Образцы по различным режимам замораживали в ампулах «Cryovial», отогревали на водяной бане при температуре 36°C.

Установлено, что изменения параметров спектров ЭПР спиновых зондов в сыворотке кордовой крови после медленного замораживания и последующего отогрева указывают на конформационные изменения белков, имеющих характер разрыхления. Показано, что медленное охлаждение приводит к агрегации белков сыворотки, основную роль в которой играют сывороточный альбумин и иммуноглобулины. Подобные процессы обнаружены в фолликулярной жидкости и экстрактах плаценты. Изучено влияние скоростей замораживания на конформацию и активность глюкозооксидазы в растворе и частично сополимеризованной с помощью глутарового альдегида. Проведенные исследования позволили определить оптимальные режимы замораживания и конечные температуры длительного низкотемпературного хранения миниатюрных электрохимических ферментных биосенсоров без существенного влияния на величину его отклика.

На основе анализа экспериментальных данных предложен механизм конформационно-структурных криоповреждений биомакромолекул. Обсуждается модуляция межмолекулярных взаимодействий низкими температурами и практическое использование полученных результатов.

The conditions, whereat the biomacromolecules are under cryopreservation, may significantly affect a protein conformation, since in this case the hydrophobic interactions and hydrogen bonds, determining and stabilizing the tertiary and quaternary structures can change as well. The disorder in intermolecular interactions may result in a structural rearrangement, manifesting in aggregation of some biomacromolecules. Such changes in some biomacromolecules affect the accomplished by them functions, provision of their resistance and supramolecular organization.

In this research there were investigated the regularities of low temperature and cryoprotectant effects on intra- and intermolecular interactions between proteins and evaluated the role of these interactions in biostructure resistance under low-temperature effect.

Dynamic structure of water-protein system was studied using the hydrophilic spin probe TEMPON and spin-labeled stearic acid (16-DS). The EPR spectra were recorded with spectrometer Bruker ER-100. Gel chromatography was performed in 1×27 cm column with Sephadex G-200. To characterize the conformation of biomacromolecules we used the absorption spectra and their first derivatives, as well as their fluorescence spectra. The spectra of absorption and fluorescence were recorded with spectrophotometer Pye Unicam SP 8000 and spectrofluorometer Hitachi F-4010, correspondingly. The samples were frozen by various regimens in cryovials, thawed in a water bath at 36°C.

The changes in parameters of spin probes EPR spectra in cord blood serum after a slow freezing and following thawing were established as indicating to conformational changes in proteins, having loosening nature. Slow cooling was shown to result in serum proteins aggregation, where the main role was played by serum albumin and immunoglobulins. The similar phenomena were found in follicular fluid and placenta extracts. The effect of freezing rates on conformation and activity of glucose oxydase in solution and partially copolymerized with glutaraldehyde was under study. The research performed enabled to determine the optimal freezing regimens and final temperatures for a long-term low temperature storage of miniature electrochemical enzyme biosensors without significant effect on its response value.

Basing on the analysis of experimental data there was suggested the mechanism of conformational and structural cryodamages of biomacromolecules. The modulation of intermolecular interactions by low temperatures and a practical use of the results obtained are discussed.