



УДК 535.342.372:577.322.4

© 2007

Академик НАН України В. И. Грищенко, Т. С. Дюбко,
В. Д. Зинченко

Влияние предварительного замораживания и низкотемпературного хранения на взаимодействие ацетилхолинэстеразы с озоном

Ozone (O₃) effect on the conformation state and the enzyme activity of acetylcholinesterase (CE) in solutions subjected to freezing by two regimes: “slow” down to –18 °C (I regime) and “rapid” down to –196 °C (II regime) with the following storage for 1 week under corresponding temperatures has been studied by using the methods of optical spectroscopy. Freezing rate and storage temperature were established to affect the CE conformation state determining the protein sensitivity to the following ozone treatment. The enzyme samples treated according to regime I are characterized by the highest sensitivity to increasing ozone doses. A feasible relation of sensitivity to the ozone effect of CE samples, treated according to regimes I and II, with differences in the structure of molecular aggregates formed at the “rapid” and “slow” freezing of the enzyme solution is discussed.

Полученные в последние годы данные о дозозависимом влиянии озона (O₃) на конформационное состояние биополимеров и о способности O₃ в малых дозах повышать ферментативную активность [1] могут оказаться полезными при разработке способов реактивации биобъектов после низкотемпературного консервирования. Однако вопрос о влиянии режимов замораживания и температур хранения на последующую эффективность взаимодействия O₃ с белком изучен недостаточно.

В настоящем сообщении приведены результаты исследования влияния озона на структурно-функциональное состояние белка-фермента ацетилхолинэстеразы (ХЭ) (КФ 3.1.1.8), предварительно подвергнутой различным режимам замораживания и низкотемпературного хранения, с привлечением методов оптической спектроскопии.

Материалы и методы исследования. ХЭ из сыворотки крови лошади, VI класс, активность 25 АЕ/мг, была получена из Пермского НИИ вакцин и сыворотки. Исследовали растворы ХЭ с конечной концентрацией 1 мг/мл, приготовленные на физиологическом растворе (0,89% NaCl) с добавлением 5 ммоль/л натрий-фосфатного буфера, рН 8,0. Эксперименты проводили на шести независимо приготовленных сериях образцов ХЭ.

Замораживание растворов ХЭ производили в полистироловых ампулах объемом 2 мл двумя способами: “медленно” — в морозильной камере до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ со средней скоростью $1\text{--}2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (режим I) и “быстро” — погружением в жидкий азот $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ со средней скоростью $200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (режим II) с последующим хранением в течение недели при соответствующих температурах. Оттаивание производили при перемешивании на водяной бане ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Температуру образцов измеряли с помощью Cu-константановой термопары с точностью $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Озонированный физиологический раствор получали с использованием озонатора безбарьерного типа, разработанного в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины совместно с Национальным научным центром “Харьковский физико-технический институт” [2]. Концентрацию O_3 определяли по поглощению на полосе Хартли (225 нм) на спектрофотометре Specord UV VIS (Германия). Введение O_3 в образцы ХЭ производили путем их быстрого смешивания в объемном соотношении 1 : 1 с озонированным физиологическим раствором, содержащим от 0,69 до 6,9 мг/л O_3 . Ферментативную активность ХЭ определяли фотоколориметрическим методом [3] на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35 (США) по эффективности гидролиза ацетилхолин хлорида в присутствии тетраметилбензидина, регистрируя оптическую плотность на длине волны 400 нм.

Для возбуждения флуоресценции ХЭ использовали свет с длинами волн 280 и 296 нм. Рэлеевское светорассеяние растворов ХЭ регистрировали под углом 90° к возбуждающему свету на длине волны возбуждения 280 нм. Спектры флуоресценции и светорассеяние растворов записывали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Все измерения производили при $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Результаты исследования и их обсуждение. Спектр флуоресценции ХЭ имеет максимум около (340 ± 2) нм ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм), что свидетельствует о значительном вкладе триптофановых остатков в общую флуоресценцию белка [4]. Это подтверждается тем фактом, что положение максимума спектра флуоресценции $\lambda_{\text{макс}}$ существенно не изменяется ((341 ± 3) нм) при избирательном возбуждении триптофана ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм). В то же время столь длинноволновое положение спектра отражает частичную доступность триптофановых остатков водному окружению [5].

Низкотемпературная обработка по режиму II приводит к несколько большему (на $(10 \pm 3)\%$) тушению флуоресценции белка в сравнении с обработкой по режиму I, без существенного изменения формы и положения спектров. Образцы ХЭ, подвергнутые обработке по режиму II, имели также меньший уровень светорассеяния в сравнении с образцами, обработанными по режиму I, что свидетельствует о влиянии режима обработки на агрегатное состояние белка (рис. 1).

Воздействие O_3 изменяет параметры флуоресценции ХЭ, предварительно подвергнутой обработке по обоим режимам, что выражается в снижении интегральной интенсивности флуоресценции белка и коротковолновом сдвиге максимума спектров. Поскольку в спектр общей флуоресценции ХЭ вносят вклад как тирозиновые, так и триптофановые компоненты, а положение спектров флуоресценции тирозиновых компонент мало зависит от параметров окружения [6], то коротковолновый сдвиг максимума спектров, наряду с падением их общей интенсивности под влиянием возрастающих доз O_3 , можно объяснить преимущественным его влиянием на триптофановую составляющую, которая более чувствительна к действию O_3 [7, 8] и может выступать в качестве индикатора окислительных повреждений, причиненных белку O_3 [9]. Необходимо отметить, что при содержании O_3 в суспензии более 3 мг/л (режим II) и 6 мг/л (режим I) положение максимума не удается определить

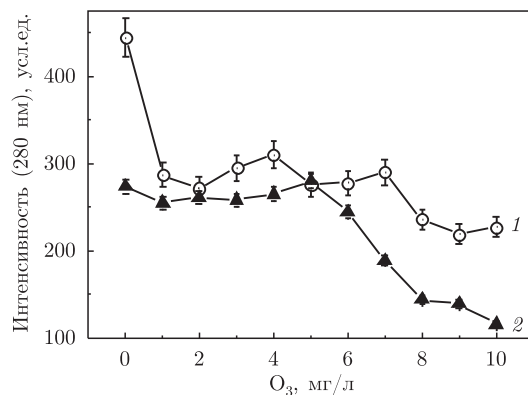


Рис. 1. Влияние O_3 на интенсивность рэлеевского светорассеяния образцов ХЭ после низкотемпературной обработки по режимам I (1) и II (2)

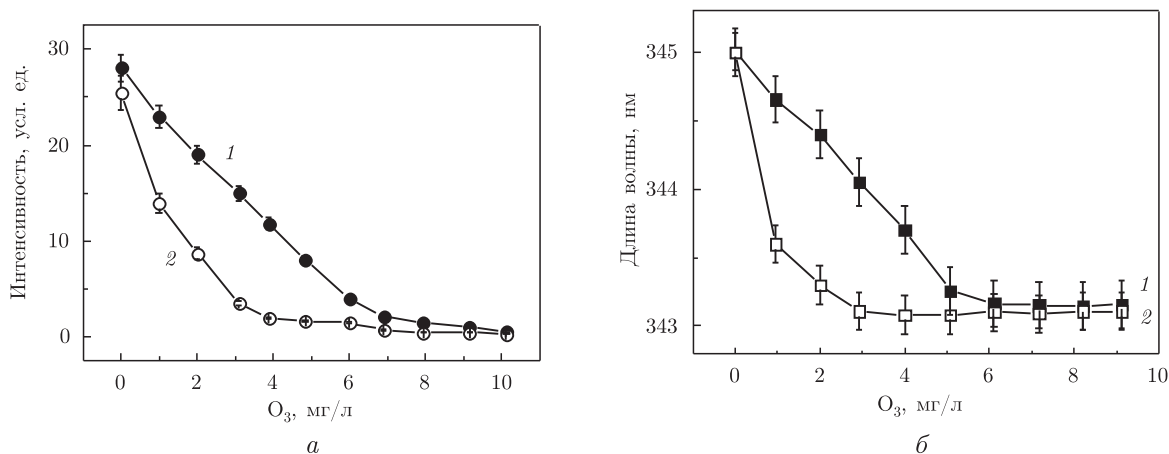


Рис. 2. Влияние O_3 на интенсивность (а) и положение (б) спектров флуоресценции триптофана образцов ХЭ в физиологическом растворе после низкотемпературной обработки по режимам I (1) и II (2) ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм)

из-за деструктивного влияния O_3 на ароматические кольца триптофана, приводящего к падению интенсивности и исчезновению флуоресценции.

Анализ спектров флуоресценции показал, что влияние O_3 на ХЭ зависит от режима ее низкотемпературной обработки (рис. 2). Так, при одинаковом содержании O_3 в растворе в случае применения режима II наблюдается более быстрое падение интенсивности как общей ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм), так и триптофановой ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм) флуоресценции белка. Из рис. 2, а видно, что при использовании режима I наиболее заметное падение интенсивности флуоресценции происходит при содержании O_3 около 6 мг/л, а при использовании режима II — уже при содержании O_3 около 3 мг/л. Следовательно, “быстрое” замораживание и хранение при температуре жидкого азота (режим II) модифицируют структуру белка таким образом, что она становится более восприимчивой к действию O_3 по сравнению с “медленным” замораживанием и хранением при умеренно низкой температуре (режим I).

С увеличением содержания O_3 в растворах ХЭ наблюдается также снижение уровня светорассеяния (см. рис. 1), что указывает на изменение агрегатного состояния белка. При этом агрегатное состояние ХЭ, обработанной по режиму I, в меньшей степени зависит от примененной дозы O_3 , хотя наблюдаемые от образца к образцу скачки светорассеяния сви-

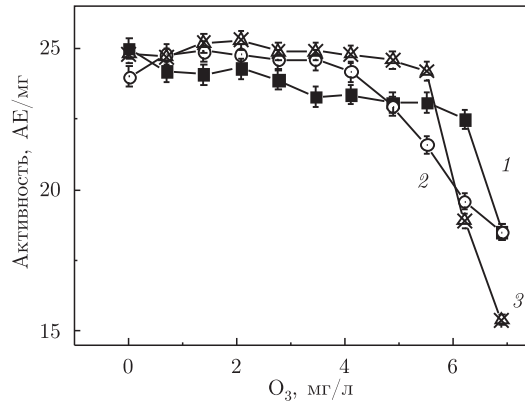


Рис. 3. Влияние режимов низкотемпературной обработки и O_3 на ферментативную активность ХЭ: 1 — контроль; 2 — режим I; 3 — режим II

детельствуют о неоднородности суспензии. Глубокое замораживание (режим II) повышает однородность суспензии.

Низкотемпературная обработка по режимам I и II незначительно снижает ферментативную активность белка — на $(4,2 \pm 0,8)$ и $(1,4 \pm 0,5)\%$ соответственно, однако в различной степени влияет на активность белка после озонирования (рис. 3). В контрольных (не подвергавшихся замораживанию) образцах содержание O_3 в среде от $(1,3 \pm 0,2)$ до $(3 \pm 0,5)$ мг/л оказывает небольшой стимулирующий эффект на ферментативную активность ХЭ, которая монотонно снижается при содержании O_3 от $(3 \pm 0,5)$ до $(6 \pm 0,5)$ мг/л, после чего ферментативная активность белка резко падает.

Для образцов, предварительно подвергнутых низкотемпературной обработке по обоим режимам, отмечается увеличение ферментативной активности ХЭ под действием O_3 . Причем в случае обработки по режиму I это увеличение наблюдается при содержании O_3 в среде от $(0,69 \pm 0,03)$ до $(3,46 \pm 0,05)$ мг/л, после чего активность резко снижается. Для образцов, обработанных по режиму II, увеличение активности ХЭ, вызванное добавлением O_3 , наблюдается в большем концентрационном интервале — от $(0,69 \pm 0,03)$ до $(5,5 \pm 0,5)$ мг O_3 /л. Активность ХЭ возрастает на $(7 \pm 1,3)\%$ по сравнению с контрольными образцами и на $(2 \pm 0,5)\%$ по сравнению с образцами, обработанными по режиму I. При содержании O_3 более $(6 \pm 0,5)$ мг/л ферментативная активность ХЭ резко снижается.

Среди возможных причин неодинаковой устойчивости к действию O_3 ХЭ, подвергнутой предобработке по режимам I и II, может быть различная степень дегидратации белка, которую вызывают режимы “быстрого” и “медленного” замораживания. Считается, что различия в процессах дегидратации белка, замороженного “медленно” и “быстро”, обусловлены тем, что при умеренно низкой температуре (-20 °C) из раствора вымерзает только свободная (объемная) вода, в то время как слабо и сильно связанная с биомолекулами вода остается незамороженной до температур $-35 \div -50$ и $-120 \div -130$ °C соответственно [10–12]. Кроме того, достаточно продолжительная экспозиция белка в присутствии солей повышенных концентраций, сопровождающих процесс кристаллизации при „медленном” замораживании, а также последующее хранение при -20 °C — температуре, близкой к эвтектической для растворенных солей, создают дополнительные условия для нарушений нативной структуры ХЭ [13], которые могут выражаться в разупорядочении упаковки макромолекул. Некоторые исследователи считают, что при этом могут происходить изменения межмолекулярных

взаимодействий в системе белок — растворитель и появляются дополнительные участки связывания для воды [14]. Кроме того, отличия в чувствительности к озону ХЭ, обработанной по режимам I и II, могут быть связаны с неодинаковой надмолекулярной организацией макромолекул белка в растворе. Большой уровень светорассеяния и меньшая однородность образцов ХЭ, предварительно обработанных по режиму I, в сравнении с образцами, обработанными по режиму II, позволяют предположить, что агрегация белка происходит не только после “быстрого”, но и после “медленного” замораживания. Если после “быстрого” замораживания, сопровождающегося сильной дегидратацией белковых макромолекул, по-видимому, образуются достаточно однородные и компактные агрегаты, то после “медленного” замораживания, приводящего к появлению менее дегидратированных, но более разупорядоченных белковых структур, могут образовываться крупные и неоднородные белковые ассоциаты, имеющие большие геометрические размеры “ядра”. Время распада таких ассоциатов после оттаивания достаточно продолжительное, зависит от их размеров и плотности упаковки молекул и поэтому неодинаково для разных режимов замораживания.

Считается, что О₃ воздействует на макромолекулы и клеточные структуры в первую очередь путем модификации их поверхностных областей [15]. Мы полагаем, что неодинаковая эффективность влияния О₃ на ХЭ после применения различных режимов охлаждения и низкотемпературного хранения может быть объяснена отличиями в доступности для О₃ поверхностных областей молекул белка, находящихся во внутренних и во внешних частях белковых ассоциатов. При этом характер влияния О₃ на белок позволяет выявить нарушения в его структуре на молекулярном и надмолекулярном уровнях, обусловленные различными режимами предварительной низкотемпературной обработки. В будущем представляется целесообразным сравнить влияние О₃ на функциональную активность ХЭ, предварительно замороженной с различными скоростями. Однако уже сейчас полученные результаты можно принимать во внимание при использовании О₃ для восстановления свойств деконсервированных белковых растворов.

1. *Белых И. А., Зинченко В. Д., Плутахин С. В. и др.* Влияние озона на каталитическую активность холинэстеразы // Нові технології оздоровлення природними та преформованими факторами (фізіотерапія, озонотерапія, курортологія): Матеріали конф. – Харків, 2002. – С. 169–171.
2. *Зинченко В. Д., Голота В. И., Сухомлин Е. А. и др.* Лабораторное оборудование для применения озонных технологий в биологии и медицине // Пробл. криобиологии. – 2005. – **15**, № 5. – С. 712–718.
3. *Блажеевський М. С.* Нова аналітична система оцінки каталітичної активності холинэстераз // Фармація ХХІ сторіччя: Тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. – Харків, 2002. – С. 99–100.
4. *Садыков А. С., Розенгарт Е. В.* Холинэстеразы: Активный центр и механизм действия. – Ташкент, 1976. – 206 с.
5. *Бурштейн Э. А.* Собственная люминесценция белков. (Природа и применение) // Биофизика. – Москва: ВИНТИ АН СССР, 1977. – Т. 7. – 189 с.
6. *Демченко А. П.* Люминесценция и динамика структуры белков. – Киев: Наук. думка, 1988. – 277 с.
7. *Альбумин* сыворотки крови в клинической медицине. Кн. 2 / Под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. – Москва: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.
8. *Белых И. А., Дюбко Т. С., Зинченко В. Д.* Изучение влияния озона на сывороточный альбумин и холинэстеразу методами оптической спектроскопии // Біофіз. вісник. – 2003. – Вип. 2(13). – С. 104–110.
9. *Pryor W. A., Uppu R. M.* A kinetic model for the competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles // J. Biol. Chem. – 1993. – **268**, No 5. – P. 3120–3126.
10. *Permyakov E. A., Burstein E. A.* Relaxation processes in frozen aqueous solutions // Stud. biophys. – 1975. – **51**, No 2. – P. 91–103.
11. *Жулякова Т. А.* Температурозависимые изменения состояния воды в биологических мембранах по данным методов ЯМР и СВЧ-диэлектрметрии: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 170 с.

12. Sartor G., Hallbrucker A., Mayer E. Characterizing the secondary hydration shell on hydrated myoglobin, hemoglobin, and lysozyme powders by its vitrification behavior on cooling and its calorimetric glass-liquid transition and crystallization behavior on reheating // *Biophys. J.* – 1995. – **69**, No 6. – P. 2679–2694.
13. Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. S. Freezing injuring from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection // *Cryobiology.* – 1977. – **14**, No 3. – P. 287–302.
14. Горобченко О. А., Мошко Ю. А., Николов О. Т. и др. Влияние режимов замораживания на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови // *Пробл. криобиологии.* – 2004. – № 2. – С. 4–10.
15. Mudd J. B., Dawson P. J., Santrock J. Ozone does not react with human erythrocyte membrane lipids // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1997. – **347**, No 2. – P. 251–258.

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков*

Поступило в редакцию 03.04.2007

УДК 616-006:57.083.3

© 2007

**О. С. Дворщенко, Г. В. Діденко, О. І. Чередарчук, М. Г. Потєбня,
І. А. Вотякова, О. А. Голуб**

Моделювання ксеногенних клітинних систем на твердих фазах з використанням пухлиноасоційованих та ембріональних антигенів і їх застосування в протипухлинній терапії

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. Л. Ганулом)

The tumor cell surface (sarcoma 37) was modeled on a solid phase (aerosil) with xenogene antigens of embryonal liver of the early period of gestation. The antitumor action of obtained preparations were investigated in therapeutic experiments. It was established that the best survival rate was observed at the complex application of sarcoma 37 antigens and liver antigens of the early period gestation sorbed on aerosil. It was determined that the preparations on the basis of sarcoma 37 antigens and embryonal liver antigens of the early period gestation after immunization of mice activated the cytotoxic reactions of macrophage and lymphocyte cell lines.

Перші повідомлення про лікування різних захворювань ембріональними субстанціями належать до початку ХХ століття. У 1930-х рр. в протипухлинній терапії вперше були застосовані гомогенати й екстракти з ембріональних тканин та органів. Було показано [1], що під впливом введених ембріональних гомогенатів селезінки й тимуса в онкологічних хворих гальмувався ріст пухлин, а в деяких випадках відбувалося розсмоктування новоутворень. Використання екстрактів ембріональних тканин було не менш ефективним [2]. Але при застосуванні гомогенатів (корпускулярні антигени) задіюється занадто широкий спектр антигенів, а при використанні екстрактів (розчинні антигени) сильніше активується гуморальна ланка імунної відповіді, роль якої в протипухлинному імунітеті далеко не однозначна.

Раніше нами були розроблені та досліджені протипухлинні вакцини на основі гомогенатів ембріональних тканин та бактеріальних глікопротеїдів, що виступали як модифікатори ембріональних антигенів та ад'юванту [3, 4]. На даному етапі роботи ми використовували екстракти, отримані з пухлинних та ембріональних клітин. Для більш значної активації