

**... КРИБІОЛОГІЯ ...**

УДК: 57.043:577.336

**О НЕКОТОРЫХ АСПЕКТАХ ПРИМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В  
КРИБИОЛОГИИ.****I. СОБСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКОВ****Т.С.Дюбко***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)  
cryo@online.kharkov.ua*

В статье на конкретных примерах рассмотрены современные методические подходы, основанные на явлении собственной флуоресценции белков, которые используются при анализе структурных изменений изолированных белков, природных белковых смесей, а также мембранных белков, вызванных действием физико-химических факторов, сопутствующих криоконсервированию биообъектов (низких температур, криозащитных добавок и т.п.).

Ключевые слова: *флуоресценция, белки, мембраны, низкие температуры, криопротекторы.*

Современные методы флуоресцентного анализа в настоящее время находят широкое применение в различных областях экспериментальной биологии и медицины, в том числе и в криобиологии благодаря ряду преимуществ, среди которых наиболее важны для биологического эксперимента высокая чувствительность, быстрота получения результата, небольшое количество анализируемого образца (Burstein et al., 1973; Демченко, 1988; Lakowicz, 1999). При этом необходимо принимать во внимание, что проведению исследований в области криобиологии присуща определенная специфика, состоящая в том, что исследователь, при изучении механизмов криоповреждений и криозащиты на молекулярном и клеточном уровнях, имеет дело с биологическими объектами, подверженными действию низких температур различных диапазонов (от гипотермии до умеренно низких и сверхнизких), присутствием криозащитных веществ (криопротекторов), искусственно вводимых в биообъект, повышенными концентрациями электролитов и другими факторами, сопутствующими процессам криоконсервирования. В настоящей статье рассматриваются некоторые аспекты применения метода флуоресцентной спектроскопии к анализу состояния изолированных и мембраносвязанных белков, учитывающие эти особенности. Эти методические подходы перечислены в табл. 1.

Основными информационными группами в белках, ответственными за их флуоресцентные свойства, являются ароматические остатки триптофана, тирозина, фенилаланина. Триптофан, благодаря наиболее высокому квантовому выходу в белках, часто доминирует не только в спектрах флуоресценции отдельных белков (Альбумин сыворотки ..., 1998), но и их гетерогенных смесей. Квантовый выход и время жизни в возбужденном состоянии входящего в его состав индольного хромофора обнаруживают высокую чувствительность к состоянию растворителя (Демченко, 1988). Хромофорной группой тирозина является фенольное кольцо. В отличие от триптофана, спектры флуоресценции (СФ) тирозина очень мало зависят от условий среды. Сдвиги СФ тирозина, зависящие от растворителя, составляют не более нескольких нанометров, не превышая значительно соответствующие им сдвиги в спектрах поглощения (Драган, Храпунов, 1989). Значительно более низкая, в сравнении с триптофаном, роль тирозина в анализе флуоресцентных свойств белков, в особенности, содержащих триптофан, обусловлена его меньшей молярной экстинкцией и низким квантовым выходом, который зависит от способности многих акцепторов водородной связи тушить его флуоресценцию, а также от его свойства передавать энергию электронного возбуждения на триптофан. При этом, наличие даже в одном белке различного количества хромофоров, отличающихся по своему расположению и спектральным свойствам (Burstein et al., 1973), существенно усложняет интерпретацию получаемых результатов. Еще большие затруднения возникают у исследователей при попытках интерпретации СФ природных объектов (сыворотка крови, плазма, белки в составе мембран и т.п.), представляющих собой гетерогенную смесь белковых молекул, часто находящихся в существенно различающихся условиях (например, интегральные и периферические белки). Параметры СФ подобных объектов являются некоторой интегральной характеристикой.

При исследовании собственной флуоресценции биообъектов традиционно анализируемыми параметрами являются положение спектра в шкале длин волн ( $\lambda_{\text{макс}}$ ), интенсивность СФ ( $F_{\text{макс}}$ ) или квантовый выход ( $\varphi$ ). В ряде случаев анализируют также полуширину спектра ( $\Delta\lambda_{1/2}$ ), форму спектра, поляризацию ( $P$ ) или анизотропию ( $A$ ) флуоресценции (Баренбойм и др., 1966).

Значительный интерес для криобиологов представляет изучение влияния растворителя на основные параметры флуоресценции. Факторы, действующие на белковые молекулы в процессе криоконсервирования (низкие температуры, изменение рН, ионной силы растворителя, органические добавки и т.п.), оказывают влияние прежде всего на четвертичную и третичную структуры белков, которые поддерживаются различными силами (гидрофобными, электростатическими, ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, водородными связями). Чувствительность основных параметров СФ белков к таким характеристикам как подвижность, полярность и гетерогенность состава ближайшего микроокружения хромофоров позволяет судить о разнообразных изменениях структурного состояния белков: конформационных, предденатурационных и денатурационных, а также поверхностной топографии макромолекул, которая проявляется в изменении доступности для молекул растворителя поверхностных ароматических остатков (например, при сорбции на поверхности белков молекул криопротекторов (КП)).

Анализ СФ как изолированных белков, так и их природных смесей (сыворотка или плазма крови, белки цитоплазмы, мембранные белки и т.п.), практически всегда сталкивается с проблемой разделения вкладов флуоресценции отдельных видов ароматических остатков. Для решения этой задачи применяют различные методические подходы (см. табл. 1). Задача существенно упрощается, если в состав белковой молекулы входит один триптофановый остаток. И, хотя чаще всего такой остаток располагается внутри белковой глобулы и мало реагирует на внешние воздействия, применяемые к белковой молекуле, тем не менее, в ряде случаев он, являясь фактически природной «флуоресцентной меткой», может предоставлять ценную информацию о конформационных изменениях белка.

Таблица 1.

#### Методические подходы, применяемые при анализе спектров флуоресценции белков

Методические подходы	Получаемая информация
▲ избирательное возбуждение флуоресценции ароматических остатков белков;	▲ оценка вклада триптофановых остатков в спектры флуоресценции белков и анализ их свойств;
▲ двухволновой метод регистрации спектров ультрафиолетовой флуоресценции белков;	▲ разделение вклада триптофана и тирозиновых остатков в случае анализа одготриптофановых белков;
▲ тушение флуоресценции ароматических остатков белков;	▲ оценка доступности для тушителей поверхностных и внутренних ароматических остатков; ▲ определение глубины локализации в бислое интегральных и периферических белков;
▲ анализ производных спектров флуоресценции;	▲ повышение эффективности разделения вкладов отдельных групп ароматических остатков в отдельных белках или смесях белков; ▲ снижение эффектов светорассеяния;
▲ изучение температурных зависимостей изменения спектральных параметров при положительной температуре ( $0 \div 100^\circ\text{C}$ );	▲ оценка изменений конформационной стабильности белков после действия различных физико-химических факторов;
▲ низкотемпературная флуоресценция белков ( $0 \div -196^\circ\text{C}$ );	▲ оценка взаимодействия белок-растворитель непосредственно в зоне низких температур;
▲ синхронные и изопотенциальные синхронные спектры флуоресценции	▲ разделение вкладов тирозиновых и триптофановых остатков в спектры флуоресценции белков; ▲ экспресс-анализ состава и качества белковых смесей (сыворотка и плазма крови, криоэкстракты и т.п.)

Одним из достаточно простых подходов, позволяющих разделить вклад тирозиновых и триптофановых флуорофоров в СФ белков, является *двухволновой метод регистрации спектров ультрафиолетовой флуоресценции белков* (Туроверов, Щелчков, 1970), основанный на возбуждении

флуоресценции белков светом с длинами волн: 280 нм (общая флуоресценция) и 296 нм (флуоресценция триптофана). В этом случае, для одотриптофановых белков (САЧ, цитохром Р-450), может быть определен относительный вклад тирозинов и триптофана в суммарный спектр флуоресценции белка.

Применение данного метода к анализу формы спектра интегрального микросомального белка цитохрома Р-450 позволило установить (Дюбко, 1992), что встраивание цитохрома Р-450 в липидный бислой и его реакция на замораживание–отогрев сопровождается конформационными изменениями белка, зависящими от вида и заряда окружающих белок фосфолипидов (табл. 2). В составе нейтральных ФХ-липосом замораживание почти не оказывало влияния на конформацию полипептидной части цитохрома Р-450, тогда как в присутствии отрицательно заряженного ФС белок оказывался менее устойчивым к криовоздействию. Метод дает возможность также оценить влияние КП на конформационное состояние интегрального белка, находящегося в липидном бислое. В присутствии КП наблюдаются конформационные изменения белка, сопровождающиеся увеличением вклада триптофановой и снижением вклада его тирозиновой флуоресценции. В то же время, замораживание–отогрев проявляет различия в механизме действия КП на мембраностроенный гемопротейн. Как видно из табл. 2, ГЛ не приводит к существенному изменению микроокружения хромофорных остатков цитохрома Р-450 при замораживании, как это наблюдается в средах, содержащих ПД и ДМСО. Поскольку триптофановый остаток цитохрома Р-450 расположен внутри глобулы, использованные КП в сочетании с действием низкой температуры не оказывают существенного влияния на часть цитохрома Р-450, погруженную в липидный бислой и их влияние ограничивается тушением флуоресценции поверхностно локализованных тирозиновых остатков белка.

Таблица 2.

**Влияние липидного окружения, замораживания–отогрева и 20% криопротекторов на триптофановую (А) и тирозиновую (Δ) составляющие спектра флуоресценции цитохрома Р-450 LM2**

Среда	А	Δ
Трис-буфер	0,92 0,92*	0,94 0,86*
ФХ+ФС-липосомы	0,89 0,88*	2,04 1,92*
ФХ-липосомы	1,00 0,94*	1,46 1,47*
То же+ГЛ	1,07 1,08*	1,46 1,48*
То же+ПД	1,09 1,07*	1,43 1,2*
То же+ ДМСО	1,12 1,15*	1,39 1,29*

*Примечание.*

*ФХ– и ФХ+ФС-липосомы – липосомы, сформированные из яичного фосфатидилхолина и смеси яичного фосфатидилхолина с фосфатидилсерином;*

*\* – после замораживания-отогрева;*

*ГЛ – глицерин;*

*ПД – 1,2-пропандиол;*

*ДМСО – диметилсульфоксид*

Получать ценную дополнительную информацию об изменении конформационного состояния биомакромолекул в растворе и в составе мембран позволяет *метод тушения собственной флуоресценции белков*. Уменьшение квантового выхода флуоресценции (тушение) может быть обусловлено как внутримолекулярными процессами, так и межмолекулярным взаимодействием флуоресцирующей молекулы с молекулами среды (Баренбойм и др., 1966; Лакович, 1986). При этом, особый интерес для криобиологов представляет тот факт, что резонансное тушение не требует соударения молекул донора и акцептора и поэтому не зависит от вязкости раствора. Это дает возможность проводить исследования непосредственно в средах, содержащих КП. Частным случаем резонансного тушения является концентрационное тушение, которое проявляется в снижении

квантового выхода люминесценции для данного количества вещества, начиная с некоторого значения концентрации. Этот вид тушения может быть обусловлен также образованием ассоциатов (димеров или эксимеров).

Применение внешних тушителей позволяет судить о доступности растворителю ароматических остатков, расположенных на различном расстоянии от поверхности белка. В качестве подобных тушителей традиционно используют акриламид и КJ, однако арсенал тушителей флуоресценции постоянно пополняется новыми соединениями. С наиболее популярными из них можно ознакомиться на сайте фирмы Molecular Probes (<http://www.probes.com>). Молекула акриламида нейтральна, благодаря чему она может свободно диффундировать внутрь молекулы белка и осуществлять тушение расположенных не только на поверхности, но и внутри глобулы хромофоров по динамическому механизму, обусловленному случайными столкновениями между флуорофором и тушителем. Ион J<sup>-</sup> несет отрицательный заряд, не позволяющий ему глубоко проникать в белки, и тушит флуоресценцию поверхностных ароматических остатков по статическому механизму, то есть путем образования комплекса с хромофором. На практике, однако, нередки случаи, когда тушение происходит по смешанному типу, включающему динамическую и статическую составляющие, вклад которых можно разделить, используя специальные приемы (Лакович, 1986).

С помощью тушения флуоресценции цитохрома P-450 акриламидом удалось показать, что в присутствии кислых фосфолипидов – фосфатидилсерина (ФС) и дифосфатидилглицерина (ДФГ) уменьшается глубина погружения цитохрома P-450 в липидный матрикс (табл. 3) (Горбенко и др., 1991). Возможно, именно этот факт является причиной большего повреждения в процессе замораживания–отогрева цитохрома P-450, находящегося в составе липосом, содержащих ФС (см. табл. 3). В то же время, поскольку липосомы, состоящие из смесей ФХ и ФС (4:1) или ФХ и ДФГ (9:1) имеют одинаковый суммарный заряд, можно предположить, что глубина встраивания цитохрома P-450 в липидный матрикс отрицательно заряженных везикул определяется, главным образом, физико-химическими свойствами полярных головок фосфолипидов, а не зарядом поверхности бислоя.

Исследования влияния факторов криоконсервирования на высокоочищенные белки представляют интерес в первую очередь для понимания молекулярных механизмов их криоповреждения и криозащиты. В то же время, флуоресцентный анализ природных смесей белков, таких, в частности, как плазма и сыворотка донорской и кордовой крови – материала, постоянно используемого в практической медицине, – имеет, наряду с теоретическим, и большое практическое значение.

Особенностью реакции многокомпонентных белковых систем на действие замораживания–отогрева и КП является их неодинаковая чувствительность к указанным факторам. Так, процесс низкотемпературного хранения (при  $-196^{\circ}\text{C}$ ) приводит к изменениям белков плазмы, выражающимся в частичной дегидратации и агрегации белковых макромолекул (альбуминов, иммуноглобулинов), снижению функциональных свойств глобулиновой фракции, изменению макроструктуры фибриногена. Поэтому, для успешного применения криобиологических технологий длительного хранения плазмы и сыворотки крови с целью их последующего использования в клинике необходимо детальное исследование влияния низких температур и КП на входящие в их состав белковые компоненты.

Таблица 3.

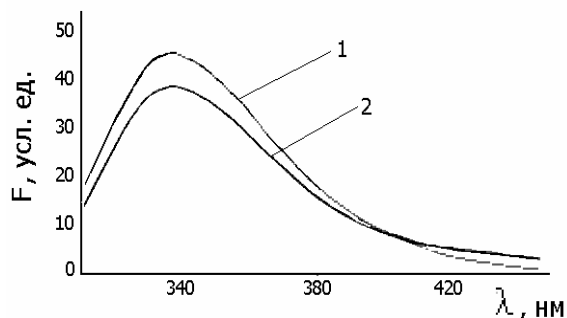
**Влияние липидного состава на эффективность тушения акриламидом флуоресценции цитохрома P-450 LM2 в протеолипосомах**

Система	$K_{SV}, M^{-1}$
Цитохром P-450	2,0
+ ФХ	0,2
+ ФХ/ФС (4:1)	0,9
+ ФХ/ДФГ (9:1)	0,5

Примечание:  $K_{SV}$  – константа тушения Штерна-Фольмера

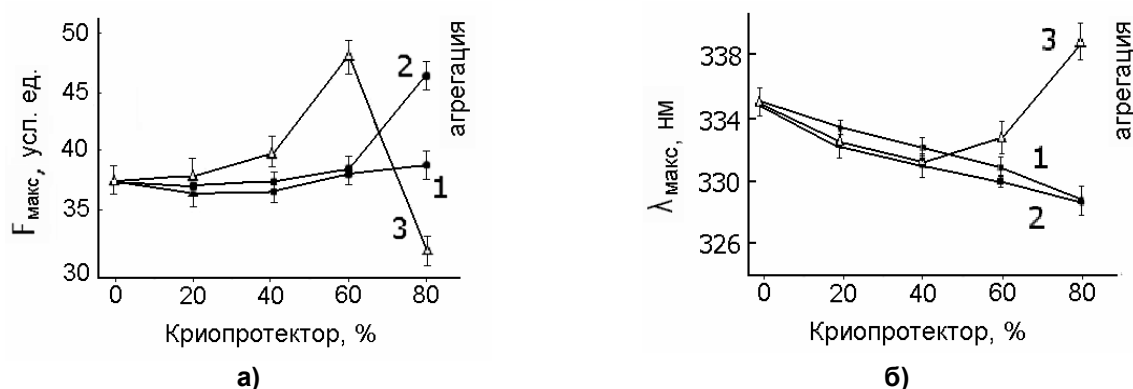
Метод флуоресцентной спектроскопии позволяет получить оперативную информацию о влиянии различных режимов замораживания и КП на состояние белков сыворотки или плазмы крови, спермальной плазмы, других природных белковых смесей. Так, например, быстрое замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  и последующий быстрый отогрев изменяют спектральные характеристики белков сыворотки кордовой крови, выражающиеся в повышении доступности растворителю поверхностных белковых хромофоров (рис. 1). Полученные данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом СВЧ-диэлектротрии, из которого следует, что после замораживания повышается гидратация белковых молекул сыворотки (Мошко, 2003). Однако, обнаруженные изменения невелики

(около 10–12 %), не сопровождаются существенным изменением функциональных свойств сывороточных белков, тогда как медленный режим замораживания приводит к значительно более выраженным изменениям как спектральных параметров (на рис. 1 не показано), так и функциональных свойств белков сыворотки. Это позволило заключить, что сыворотка кордовой крови после быстрого замораживания/отогрева может быть использована в клинических целях. Таким образом, анализ спектров флуоресценции позволяет, не прибегая к более трудоемким методам исследования, оценить влияние режимов замораживания на состояние плазмы или сыворотки крови.



**Рис. 1.** Влияние «быстрого» замораживания на спектр флуоресценции белков сыворотки кордовой крови ( $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$ ):  
1 – нативная сыворотка;  
2 – то же после быстрого замораживания

Анализ основных параметров спектров флуоресценции ( $F_{\text{max}}$  и  $\lambda_{\text{max}}$ ) позволяет оценить степень возмущающего влияния КП на белки в растворе и их предельно допустимые концентрации, что особенно актуально при предварительном тестировании новых веществ – потенциальных КП. При этом, линейность зависимости параметров  $F_{\text{max}}$  и  $\lambda_{\text{max}}$  от концентрации КП может служить критерием того, что в этом диапазоне концентраций КП не оказывает возмущающего влияния на конформацию белка, и наоборот, нарушение линейности этих зависимостей свидетельствует о том, что по достижении определенных концентраций КП перестают быть нейтральными растворителями для исследуемых белков (Баренбойм и др., 1966; Myers, Jakoby, 1975). Из рис. 2 видно, что наименьшее влияние на белки плазмы крови оказывает ГЛ, в то время как ПД, при содержании в растворе более 60%, и ДМСО, в концентрации более 40%, вызывают агрегацию белков, регистрируемую по резкому возрастанию интенсивности флуоресценции; которая при концентрации ДМСО свыше 60% переходит в преципитацию (проявляется в снижении интенсивности флуоресценции, сопровождающейся длинноволновым сдвигом спектра), свидетельствующей о денатурации части белков плазмы. В то же дополнительное влияние на белки плазмы, находящиеся в среде КП оказывают сама низкая температура и сопутствующие факторы, а также скорость замораживания (рис. 3).



**Рис. 2.** Влияние КП на интенсивность (а) и длину волны (б) максимума спектра флуоресценции белков плазмы крови: 1 – ГЛ; 2 – ПД; 3 – ДМСО

Наряду с анализом традиционных параметров СФ, информативными методическими подходами для решения криобиологических задач являются применение вторых производных спектров флуоресценции (2ПСФ), анализ температурных зависимостей спектров флуоресценции в

положительной (0–90°C) и отрицательной (при отогреве от –196°C до 0°C) температурных областях, поляризационные измерения, анализ синхронных спектров флуоресценции (ССФ).

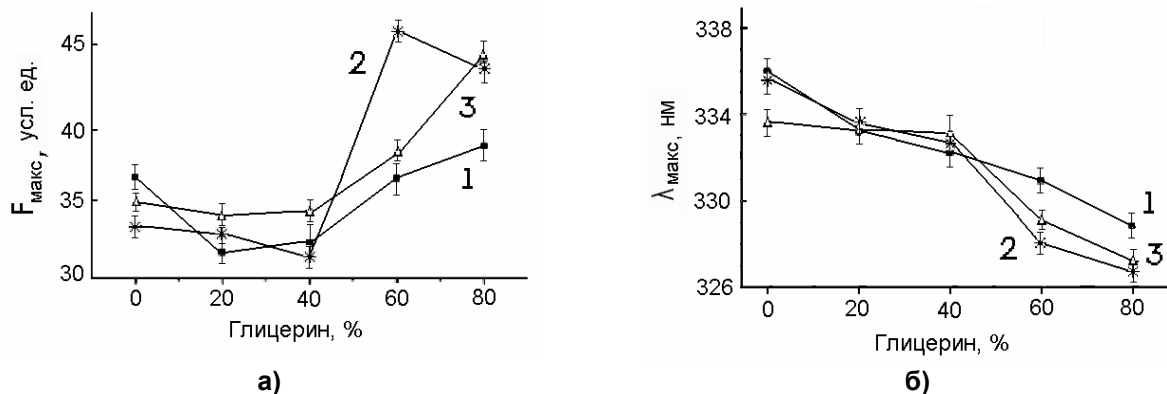


Рис. 3. Влияние ГЛ и скорости замораживания на интенсивность (а) и длину волны (б) максимума спектра флуоресценции белков плазмы крови:

- 1 – контроль;
- 2 – после «быстрого» замораживания;
- 3 – после «медленного» замораживания

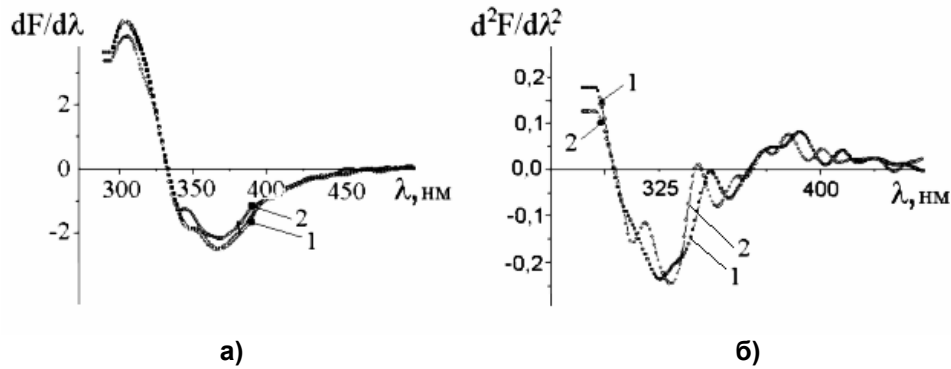
При анализе спектров флуоресценции предпочтительно применять *вторые производные спектров флуоресценции* (2ПСФ) (Restall et al., 1986; Mozo-Villarias, 2002) как наиболее информативные (в отличие от спектров поглощения, где информативны первые производные (1ПСП)) (Демченко, 1981). Использование 2ПСФ оправдано тем, что они, по сравнению с исходными спектрами, дают возможность получить более детальную информацию о состоянии микроокружения ароматических остатков белков, а в ряде случаев также и разделить вклад тирозиновой и триптофановой составляющих в суммарный спектр. Последнее обстоятельство обусловлено тем, что СФ триптофана имеют значительно большую полуширину в сравнении со спектрами флуоресценции тирозина и положение их максимумов по исходным спектрам может быть определено менее точно, чем в случае спектров поглощения (Демченко, 1981). Поэтому анализ 2ПСФ особенно актуален для анализа СФ белков, флуоресценция которых обусловлена преимущественно триптофановыми остатками.

2ПСФ белков регистрируются в области 300–400 нм и могут быть представлены одной или двумя основными полосами, расположенными в областях 300–350 и 350–370 нм. Структура полос 2ПСФ часто имеет отрицательные пики и плечи, положение и интенсивность которых зависят от количественного и качественного состава белков, входящих в состав анализируемого образца, а также от их чувствительности к действию различных физико-химических факторов.

Для плазмы крови характерными можно считать полосы с отрицательными максимумами около 334 нм и 356 нм (рис. 4). В ряде случаев разрешаются полосы или плечи при 310, 322 и 367 нм. При возбуждении светом с длиной волны 296 нм в спектрах лучше разрешаются длинноволновые компоненты, что свидетельствует о существенном вкладе триптофановой флуоресценции в эту область спектра (Альбумин сыворотки ..., 1998).

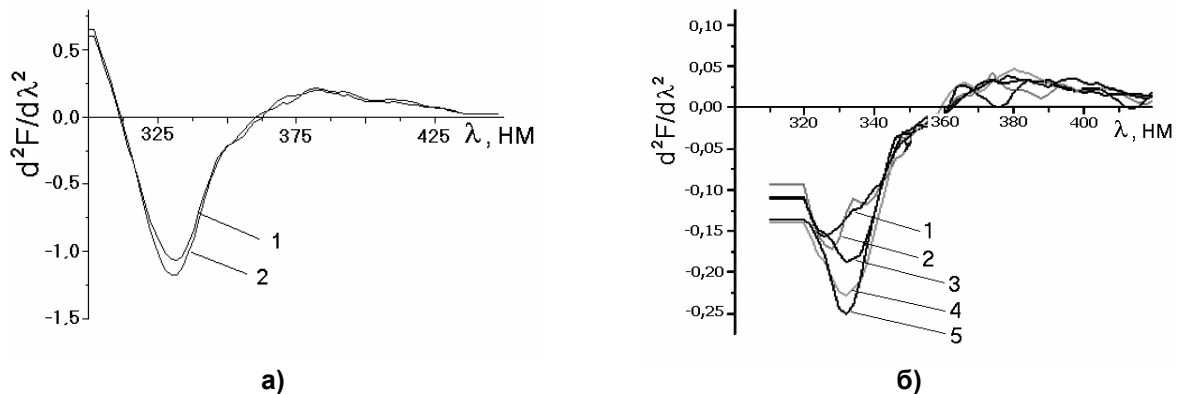
Исследование собственной флуоресценции белков, входящих в состав плазматических и внутриклеточных мембран, дает возможность как получать информацию о влиянии факторов криоконсервирования на состояние мембранных белков, так и косвенно оценивать влияние упомянутых факторов на белок-липидные взаимодействия и на состояние самих мембран.

Преобладающим вкладом триптофановых остатков характеризуются спектры флуоресценции белков микросомальных мембран (Добрецов и др., 1981; Черницкий, 1972). Об этом свидетельствует, наряду с положением максимума их спектра флуоресценции ( $\lambda_{\text{max}} = 335 \pm 0,5$  нм) также 2ПСФ, на которых, наряду с основным отрицательным пиком при  $331 \pm 0,6$  нм, обнаруживается плечо при  $355 \pm 0,5$  нм (рис. 5, а). Согласно гипотезе двух состояний, выдвинутой в работах (Конев, 1965; Burstein et al., 1973), триптофановые остатки, находящиеся в контакте с водным растворителем, характеризуются положением максимума около 330 нм, а полностью доступные водному окружению – при 345–350 нм. В соответствии с этой классификацией, положение основного отрицательного максимума во 2ПСФ может быть отнесено к триптофановым остаткам, контактирующим с водным окружением, а плечо при 355 нм – к поверхностно локализованным остаткам триптофана.



**Рис. 4. Влияние замораживания на первые (а) и вторые производные СФ (б) плазмы крови донора ( $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$ ):**  
**1 – контроль;**  
**2 – после «медленного» замораживания**

“Быстрое” замораживание и последующий отогрев приводят к незначительному изменению интенсивности 2ПСФ (на 5–10 %) без существенного изменения их формы (см. рис. 5, а), которое может быть интерпретировано как изменение доступности для воды контактирующих с ней поверхностных ароматических остатков белков микросом. Эти результаты хорошо согласуются с данными других методов, с помощью которых показана сравнительно высокая устойчивость микросомальных мембран к процедуре быстрого замораживания–отогрева (Макевнина и др., 1978; Лемешко и др., 1978), и позволяют сделать вывод, что применение данного режима криовоздействия оказывает наименьшее повреждающее влияние на микросомальные мембраны и на состояние белков микросом, которое, по-видимому, ограничивается поверхностной областью мембран.



**Рис. 5. Влияние замораживания-отогрева (а) и ГЛ (б) на 2ПСФ белков мембран микросом ( $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$ ):**  
**а) 1 – контроль; 2 – после замораживания-отогрева;**  
**б) Концентрация ГЛ: 1 – 5; 2 – 10; 3 – 20; 4 – 30; 5 – 40 мас. %**

С помощью флуоресцентного анализа установлено (Онищенко и др., 2004), что криопротекторы ГЛ, ПД и ДМСО активно взаимодействуют с микросомальными мембранами уже на этапе эквilibрации при комнатной температуре, приводя к изменению конформационного состояния мембранных белков, которое может сенсibilизировать мембраны к последующему воздействию низкой температуры. Эффект ГЛ на 2ПСФ белков микросом иллюстрирует рис. 5, б.

*Метод регистрации температурных изменений белков в положительной области температур* после действия факторов криоконсервирования (низкотемпературного воздействия, солей, КП и т.п.) позволяет оценить влияние указанных факторов на конформационное состояние белков, проявляющееся в изменении их термостабильности. При этом, дополнительную полезную информацию можно получить, сопоставляя данные спектрофлуориметрии, отражающей процессы, происходящие в возбужденном состоянии, со спектрофотометрией, характеризующей процессы, протекающие в основном состоянии.

Так, анализ температурных зависимостей спектров поглощения позволил установить, что термоденатурация белков плазмы крови донора и кордовой крови протекает поэтапно, что может быть связано как с неодинаковой чувствительностью к действию низких температур белков, входящих в состав плазмы, так и с более фундаментальными процессами, отражающими общие закономерности реакции белковых молекул на действие низкой температуры (Биофизика ..., 2002). Изменения конформации белков донорской плазмы наблюдаются в интервалах 25–32, 39–41, 49–52 и более 78°C. Для плазмы кордовой крови, отличающейся от плазмы донора не только большим количеством биологически активных веществ, но и функциональными характеристиками ее основных белков, спектральные параметры белков изменяются при температурах: 9–11, 30–36, 46–51, 60–72, 81–84 и более 84°C (Морозова и др., 2002). Обнаруженные волнообразные зависимости спектральных параметров от температуры находятся в хорошем соответствии с немонотонными изменениями подвижности водорастворимого спинового зонда ТЕМПОН при температурах 13, 17, 21, 25 и 33°C, которые связывают с температурной зависимостью структурированности водного раствора белков плазмы (Цымбал, 2001) и позволяют предположить, что наблюдаемые методами оптической и радиоспектроскопии волнообразные изменения параметров отражают общие закономерности реакции структуры водно-белковых растворов на изменение температуры.

Замораживание приводит к изменению спектральных характеристик плазмы, регистрируемых в основном в физиологической области температур (ниже 45°C), что свидетельствует об изменении межмолекулярных взаимодействий в водно-белковых растворах. Какие белки ответственны за вклад в криповреждение плазмы и нарушение в ней межмолекулярных взаимодействий, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях, однако, есть основания полагать, что такими белками могут быть глобулины и фибриноген.

Изучение методом низкотемпературной спектродиффузии (НТФ) (Permiakov, Deikis, 1995) конформационного состояния белков плазмы в области отрицательных температур и обоснование наличия конформационных изменений непосредственно в низкотемпературных зонах является важным вопросом кріобіофізики, особливо, если для криозащиты не используются криопротекторы. При этом, если исследование температурной зависимости поведения белков, предварительно подвергнутых замораживанию–отогреву, при положительных температурах позволяет выявить в сравнительном аспекте, как повлияло замораживание на конформационное состояние белка, то метод НТФ позволяет регистрировать конформационные изменения белков непосредственно в зоне отрицательных температур и выявлять температурные зоны, ответственные за эти изменения.

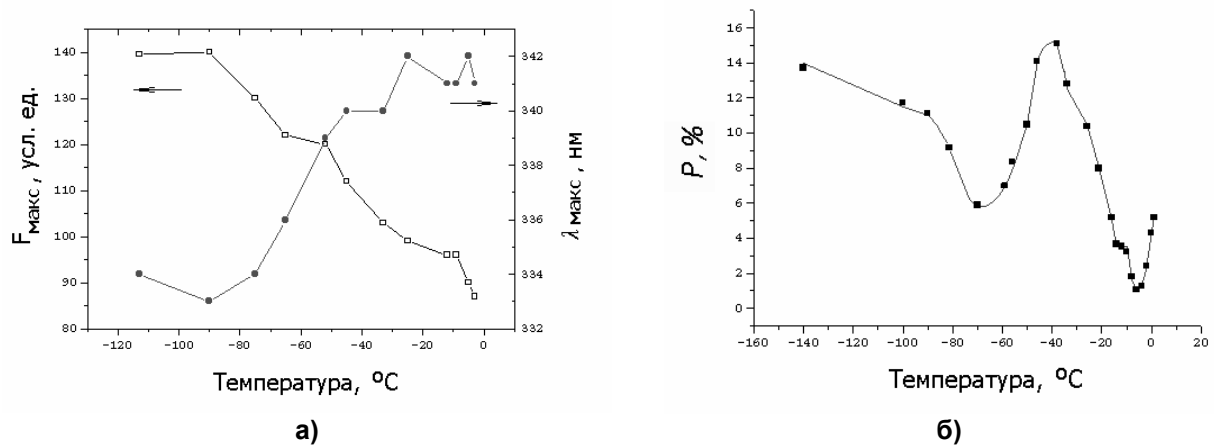
Считается (Permyakov, Burstein, 1975), что обнаруженное при изучении собственной флуоресценции ряда белков изменение спектральных характеристик при температурах ниже 0°C, которое происходит в несколько этапов, отражает поэтапное затормаживание подвижности кооперативной водно-белковой матрицы. При –50 ÷ –60°C замерзает близлежащая к белку вода, составляющая кооперативную систему с его поверхностными областями; а более слабо связанные с белком слои воды замерзают при температурах около –10 ÷ –20°C. Однако, факт конформационных изменений белков в этих диапазонах температур требует дополнительного исследования и доказательства.

Метод НТФ, включающий комплексный анализ таких параметров как  $\lambda_{\text{макс}}$ ,  $I_{\text{макс}}$ ,  $\Delta\lambda_{1/2}$ ,  $\rho$ , позволяет выявить изменения белков плазмы, связанные прежде всего с процессами замерзания–размерзания гидратной воды белков и изменениями их гидратной оболочки, которые происходят в основном при температурах от –80 до –30°C (рис. 6, а) и отделить их от конформационных изменений белков плазмы, происходящих при температурах выше –40°C. Особое значение при этом имеют поляризационные измерения, которые чувствительны к процессам растормаживания белковой подвижности, происходящим при появлении жидкой фазы (рис. 6, б). Установленный факт слабо выраженных низкотемпературных изменений флуоресценции белков нативной плазмы при температурах плавления эвтектики NaCl (–21,8°C), по сравнению с изменениями, происходящими при температурах плавления гидратной воды, позволил предположить, что основные повреждения в белках плазмы происходят не за счет солевой денатурации, а за счет замерзания–размерзания гидратной воды белков. Поэтому можно ожидать, что КП, замещающие гидратную или сольватную оболочку белков, в частности, ГЛ, ПД или ПЭО–400, будут действовать предохраняюще на белки плазмы и аналогичные белковые растворы. Эти экспериментальные результаты показывают, что метод НТФ может быть с успехом использован для теоретического предсказания выбора режимов замораживания–отогрева биологических объектов и подбора оптимальных КП.

Современная техника флуоресцентного анализа позволяет существенно расширить арсенал экспериментальных подходов, используемых при анализе собственной флуоресценции биообъектов. Одним из таких подходов является метод синхронного сканирования, состоящий в одновременном изменении положения монохроматоров возбуждения и флуоресценции при фиксированной разнице

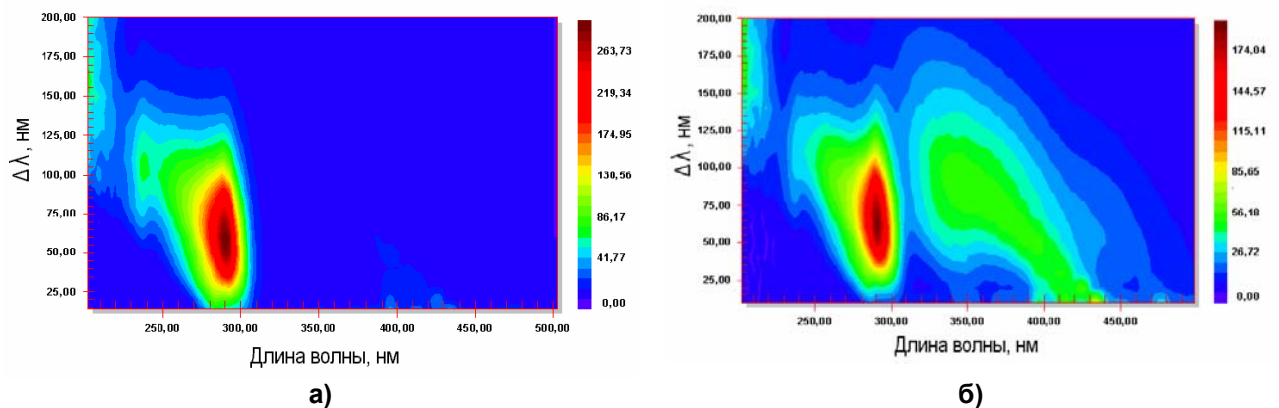


длин волн. Он дает возможность получать, по сути, срезы спектров возбуждения и флуоресценции, которые в ряде случаев позволяют добиться удовлетворительного разделения компонент в смеси, например, разделить вклад тирозиновых и триптофановых остатков в белках (Векшин, 1996).



**Рис. 6. Температурные зависимости интенсивности, положения (а) и поляризации (б) спектров низкотемпературной флуоресценции белков плазмы**

В то же время, его трехмерный вариант, т.н. *изопотенциальные синхронные спектры флуоресценции (ИПССФ)*, позволяет получать своеобразные «флуоресцентные отпечатки пальцев» исследуемого объекта, которые могут быть полезны при экспресс-оценке тканевых криоэкстрактов, оценке влияния условий хранения на белковые растворы и т.п. Возможности метода ИПССФ иллюстрирует рис. 7, из которого можно видеть, что длительное хранение спермальной плазмы при умеренно низких температурах ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) приводит к появлению продуктов окислительной деградации липидов и белков, регистрируемых в области 315–450 нм.



**Рис. 7. ИПССФ белков спермальной плазмы донора П. (нормоспермия); (а) контроль; (б) после хранения в течение 2 мес. при  $-12^{\circ}\text{C}$**

Подводя итог представленному материалу, можно отметить, что применение метода флуоресцентной спектроскопии и его модификаций к исследованию изолированных белков и их природных смесей (сыворотки крови, плазмы и т.п.), а также белков в составе мембран позволяет:

- изучать конформационные изменения белков, определять их устойчивость к действию факторов низкотемпературного консервирования (низкой температуры, КП, солей, pH и др.);
- экспериментально определять зоны низкотемпературных конформационных изменений и повреждений белков, а также давать практические рекомендации по разработке методов их низкотемпературного хранения;
- судить об обратимости конформационных изменений белков;

- оценивать доступность остатков ароматических аминокислот белков для растворителя (гидрофобность или гидрофильность окружения) и следить за ее изменением при действии различных физико-химических факторов;
- оценивать пертурбирующий и цитотоксический эффект КП на этапе эквilibрации с биообъектами при комнатной температуре и предсказывать их возможное негативное влияние при дополнительном действии низкой температуры и сопутствующих факторов;
- производить экспресс-оценку влияния условий получения и хранения на водорастворимые белки, природные смеси белков, тканевые экстракты и т.п.

Ввиду ограниченного объема публикации, в данной статье рассматривались подходы, основанные на методе измерения стационарной флуоресценции (основного состояния), и не затрагивались не менее важные и информативные современные подходы, основанные на время-разрешенной спектрофлуориметрии, фотон-корреляционной спектроскопии и др., ознакомиться с которыми можно в монографиях (Lakowicz, 1999; Rettig et al., 1999; Valeur, 2001).

### Список литературы

- Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова. Кн.2. – Москва: ГЭОТАР, 1998. – 440с.
- Баренбойм Г.М., Доманский А.Н., Туроверов К.К. Люминесценция биополимеров и клеток. – М.–Л.: Наука, 1966. – 234с.
- Биофизика живых систем: от молекулы к организму / Под общ. ред. акад. НАН Беларуси И.Д.Волотовского. – Минск: БЕЛСЭНС, 2002. – 205с.
- Векшин Н.Л. Разделение тирозиновой и триптофановой компонент флуоресценции методом синхронного сканирования // Биофизика. – 1996. – Т.41, вып.6. – С. 1176–1179.
- Горбенко Г.П., Дюбко Т.С., Нардид О.А., Моисеев В.А. Исследование взаимодействия цитохрома P-450 с фосфолипидами методом флуоресцентной спектроскопии // Биополимеры и клетка. – 1991. – Т.7, №1. – С. 82–84.
- Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208с.
- Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. – Киев: Наук. думка, 1988. – 277с.
- Добрецов Г.Е., Спириин М.М., Карякин А.В. и др. Исследование с помощью индуктивно–резонансного переноса энергии пространственных взаимоотношений между белками и липидами в мембранах микросом печени // Биохимия. – 1981. – Т.46, вып.3. – С. 504–511.
- Драган А.И., Храпунов С.Н. Адсорбционные и люминесцентные исследования межмолекулярных взаимодействий тирозинового хромофора. I. Анализ спектров поглощения и флуоресценции // Биофизика. – 1989. – Т.34, вып.2. – С. 187–193.
- Дюбко Т.С. Влияние замораживания-отогрева на структуру цитохрома P-450 и содержащих его мембран. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1992. – 17с.
- Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. – Минск: Наука и техника, 1965. – 184с.
- Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496с.
- Лемешко В.В., Кудокоцева Е.В., Белоус А.М. Криорезистентность мембран эндоплазматического ретикулаума печени крыс // Биохимия. – 1978. – Т.43, вып.1. – С. 72–77.
- Макевнина М.Г., Кудокоцева Е.В., Добрецов Г.Е., Белоус А.М. Влияние низких температур на функциональное состояние мембран эндоплазматического ретикулаума печени // Вопросы мед. химии. – 1978. – Т.24, №5. – С. 605–607.
- 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.
- Мошко Ю.О. Кріоконсервування сироватки кордової крові, визначення її біологічної активності та клінічної ефективності в терапії хронічних сальпінгофоритів. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 2003. – 19с.
- Онищенко Е.Н., Дюбко Т.С., Семенченко А.Ю. Влияние низкомолекулярных криопротекторов и замораживания на флуоресцентные свойства микросомальных белков // Актуальные проблемы медицины и биологии: Сб. научн. трудов. – Киев, 2004. – С. 106–117.
- Туроверов К.К., Щелчков Б.В. Исследование тепловой денатурации белков с помощью двухволнового метода регистрации изменений спектра их ультрафиолетовой флуоресценции // Биофизика. – 1970. – Т.15, вып.6. – С. 965–970.
- Цымбал Л.В. Исследование влияния температуры на микроструктуру кордовой крови методом спиновых зондов // Проблемы кріобіології. – 2001. – №4. – С. 71–73.

- Черницький Е.А. Люминесценція і структурна лабільність білків в розстворі і клітці. – Минск: Наука і техника, 1972. – 278с.
- Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // Photochem. and Photobiol. – 1973. – Vol.18, №1. – P. 263–279.
- Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / Second Ed. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. – 698p.
- Mozo-Villarias A. Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – Vol.50, № 2–3. – P. 163–178.
- Myers J.S., Jakoby W.B. Glycerol as an agent eliciting small conformational changes in alcohol dehydrogenase // The J. Biol. Chem. – 1975. – Vol.250, №10. – P. 3785–3789.
- Permyakov E.A., Burstein E.A. Relaxation processes in frozen aqueous solutions // Studia Biophysica. – 1975. – Vol.51, №2. – P. 91–103.
- Permiakov E.A., Deikis G.Iu. Study of conformation transitions in proteins by tryptophan fluorescence and phosphorescence at low temperatures // Mol. Biol. – 1995. – Vol.29, №2. – P. 339–344.
- Restall C.J., Coke M., Phillips E., Chapman D. Derivative spectroscopy of tryptophan fluorescence used to study conformational transitions in the (Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>)-adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol.874, №3. – P. 305–311.
- Rettig W., Strehmel B., Schrader S., Seifert H. Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine. – Berlin–Heidelberg–New York: Springer-Verlag, 1999. – 563p.
- Valeur B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. – New-York: Plenum Press, 2001. – 402p.

**ПРО ДЕЯКІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛІЗУ В КРІОБІОЛОГІЇ.  
I. ВЛАСНА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ БІЛКІВ  
Т.С.Дюбко**

В статті на конкретних прикладах розглянуто сучасні методичні підходи, що ґрунтуються на явищі власної флуоресценції білків, які застосовуються при аналізі структурних змін ізольованих білків, природних білкових сумішей та мембранних білків, спричинених дією фізико-хімічних факторів, супутніх кріоконсервуванню біооб'єктів (низьких температур, кріозахисних домішок тощо).

Ключові слова: *флуоресценція, білки, мембрани, низькі температури, кріопротектори.*

**ABOUT SOME ASPECTS OF FLUORESCENCE ANALYSIS APPLICATION IN CRYOBIOLOGY.  
I. INTRINSIC FLUORESCENCE OF PROTEINS  
T.S.Dyubko**

The modern methodical approaches grounded on the protein intrinsic fluorescence phenomenon which are used at the analysis of isolated proteins, natural protein mixtures and membranous proteins structural changes called by the physicochemical factors action, concomitant to bioobjects cryopreservation process (low temperatures, cryoprotectants etc.), surveyed on concrete examples at this paper.

Key words: *fluorescence, proteins, membrane, low temperatures, cryoprotectants.*

---

Представлено В.Д.Зінченком  
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським