

УДК: 57.043:577.322.4

Влияние низких температур на состав и конформационное состояние белков спермальной плазмы человека**Т.С.Дюбко¹, А.Б.Малышев², Н.Н.Чуб¹, В.Л.Родионова¹, М.И.Крамар¹, А.А.Гапон¹**¹*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)*²*НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

В работе с использованием методов флуоресцентной спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле исследовано влияние условий низкотемпературного хранения на состав и конформационное состояние белков спермальной плазмы человека. Показано, что хранение при температуре -196°C оказывает минимальное негативное воздействие на состав и конформационное состояние белков спермальной плазмы по сравнению с ее содержанием при -12°C .

Ключевые слова: *спермальная плазма человека, белки, конформационное состояние, низкие температуры, флуоресценция, синхронные спектры.*

Вплив низьких температур на склад та конформаційний стан білків спермальної плазми людини**Т.С.Дюбко, А.Б.Малишев, Н.Н.Чуб, В.Л.Родионова, М.І.Крамар, А.А.Гапон**

В роботі з використанням методів флуоресцентної спектроскопії й електрофорезу в поліакриламідному гелі досліджено вплив умов низькотемпературного зберігання на склад і конформаційний стан білків спермальної плазми людини. Показано, що зберігання при температурі -196°C спричиняє мінімальний негативний вплив на білковий спектр і конформацію білків спермальної плазми у порівнянні з її утриманням при -12°C .

Ключові слова: *спермальна плазма людини, білки, конформаційний стан, низькі температури, флуоресценція, синхронні спектри.*

The effect of low temperature on the composition and conformational state of proteins of human spermal plasma**T.S.Dyubko, A.B.Malyshev, N.N.Tchoob, V.L.Rodionova, M.I.Kramar, A.A.Gapon**

In the work using fluorescent spectroscopy and electrophoresis in polyacrylamide gel the effect of low-temperature storage on the composition and conformational state of proteins of human spermal plasma has been investigated. It has been shown that storage at -196°C has minimal negative effect on the protein spectrum and conformation of spermal plasma proteins in comparison with storage at -12°C .

Key words: *human spermal plasma, proteins, conformational state, low temperatures, fluorescence, synchronous spectra.*

Введение

В литературе достаточно широко представлены работы, посвященные изучению влияния замораживания-отогрева на изолированные белки. Среди причин, вызывающих повреждение белков в процессе замораживания-отогрева, могут быть названы: дегидратация клетки (Гулевский и др., 1982), гиперконцентрация солей (Иванов и др., 1977; Морозова и др., 1982; Науменко, Розанова, 1984), вне- и внутриклеточная кристаллизация (Пушкарь, Белоус, 1981). Перечисленные факторы в значительной степени влияют и на гетерогенные белковые смеси, находящиеся в составе природных жидкостей. Однако свойства и реакция на факторы криоконсервирования изолированных белков могут значительно отличаться от их свойств в комплексе с другими белками и низкомолекулярными веществами (аминокислотами, пептидами, гормонами). Тем не менее, именно оценка поведения гетерогенной белковой системы в биологических жидкостях как единого целого часто необходима на практике при определении степени её повреждения при действии различных физико-химических факторов, в том числе низких температур. Имеется незначительное число работ, посвященных изучению воздействия низких температур на структурное состояние белков, находящихся в составе плазмы крови (Мошко, 2003), фолликулярной жидкости (Яковлева, 2007).

Сперма – биологическая жидкость организма человека, в норме содержащая различные клетки (сперматозоиды, лейкоциты и др.) и спермальную плазму (СП). СП богата белками, содержание

которых у разных видов животных находится в пределах от 1 до 10%, содержит аминокислоты, углеводы, особенно фруктозу. В ней находится значительное количество солей: карбонатов, цитратов, лактатов, фосфатов, поддерживающих pH спермы. СП играет значительную роль в решении проблем коррекции патологии спермиев (Cross, 1996). Было показано, что подвижность спермиев человека при астенозооспермии может быть увеличена при инкубации их с донорской СП (Дунаевская, 2000) и статистически достоверно выше после размораживания, если в среду консервирования добавляли 35–50 % СП (Check et al., 1993; Ben et al., 1997; Дунаевская, 2000).

Целью настоящей работы является исследование влияния низких и сверхнизких температур на состав и конформационное состояние белков СП человека с помощью методов флуоресцентной спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Объекты и методы исследования

Материалом исследования служили образцы спермы, полученные у 7 доноров с нормозооспермией. Оценку качества спермы производили с помощью стандартных методов, согласно рекомендациям ВОЗ (World Health Organization, 1997). В экспериментах были использованы эякуляты с концентрацией спермиев $80 \pm 7,9$ млн. в 1 мл и содержанием активно-подвижных и подвижных спермиев – $26 \pm 2,1$ % и $37 \pm 3,2$ % соответственно. После анализа спермокинезисграммы эякулят центрифугировали при 3000 об/мин и отбирали СП в 1 мл полиэтиленовые ампулы. Одну часть проб СП замораживали со скоростью $300\text{--}400^\circ\text{C}/\text{мин}$ путем погружения в жидкий азот (-196°C), вторую – охлаждали со скоростью $2\text{--}3^\circ\text{C}/\text{мин}$ в морозильной камере холодильника «Минск» и хранили при -12°C .

Отогревали СП на водяной бане при 37°C . Для анализа белкового состава СП подвергали электрофорезу в пластинах с 7,5% ПААГ, pH 8,9, по стандартной методике (Остерман, 1984). После проведения электрофореза гели окрашивали кумасси G-250. Высушенные гели сканировали и анализировали распределение плотности окраски с помощью программы «Digitize». Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) с автоматической коррекцией спектров. Ширины входной и выходной щелей монохроматоров составляли 5 нм. Образцы СП разводили физиологическим раствором так, чтобы их оптическая плотность на длине волны возбуждения флуоресценции не превышала 0,1 D. Все спектральные измерения выполнялись при 20°C в стандартных кварцевых кюветках (13 см). Спектры собственной флуоресценции (СФ) белков СП возбуждали при длинах волн 280 нм (общая флуоресценция тирозиновых и триптофановых остатков), 296 нм (триптофановая флуоресценция) и 340 нм (продукты деградации белков). Спектры возбуждения (СВ) образцов регистрировали в максимуме их спектров флуоресценции. Синхронные спектры флуоресценции (ССФ) получали, сканируя монохроматоры возбуждения и флуоресценции от 200 до 500 нм, при их сдвиге $\Delta\lambda$ от 10 до 200 нм, с шагом 10 нм. Изопотенциальные синхронные спектры флуоресценции (ИПССФ), представляющие собой трехмерный вариант ССФ, строили, используя программное обеспечение Cary Eclipse. Обработку спектров производили в программе Microcal Origin 6.0.

Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента-Фишера с использованием программного пакета «Statgraf».

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1, СФ белков СП характеризуются значениями $\lambda_{\text{макс}}=344 \pm 2,5$ нм, что свидетельствует о существенном вкладе в спектры триптофановых остатков (Добрецов и др., 1981; Черницкий, 1972), доступных водному окружению (Burstein et al., 1973; Бурштейн, 1977; Драган, Храпунов, 1989). О вкладе триптофанилов в спектры флуоресценции белков свидетельствуют также спектры возбуждения образцов СП, в которых выделяется характерный для триптофана максимум при 290–292 нм (рис. 1). В то же время, присутствие интенсивного максимума при 291 ± 1 нм, наблюдающегося в спектрах возбуждения 20-кратно разведенных образцов СП и отсутствующий в 200-кратно разведенных образцах, может быть связано с протеканием в данной гетерогенной системе процессов индуктивно-резонансного переноса энергии электронного возбуждения на триптофан. При этом донорами энергии могут быть как тирозиновые остатки белков, так и свободные аминокислоты при их нековалентном связывании с белками СП. Присутствие тирозиновых остатков проявляется в спектрах флуоресценции в виде плеча при 315–319 нм.

Так как белки СП представляют собой гетерогенную смесь белковых молекул, в состав которой входят альбумин, иммуноглобулины, орозомукоид, бета-1-трансферрин и др., параметры их СФ являются некоторой интегральной характеристикой, которая отражает общую реакцию белков СП на низкотемпературное воздействие.

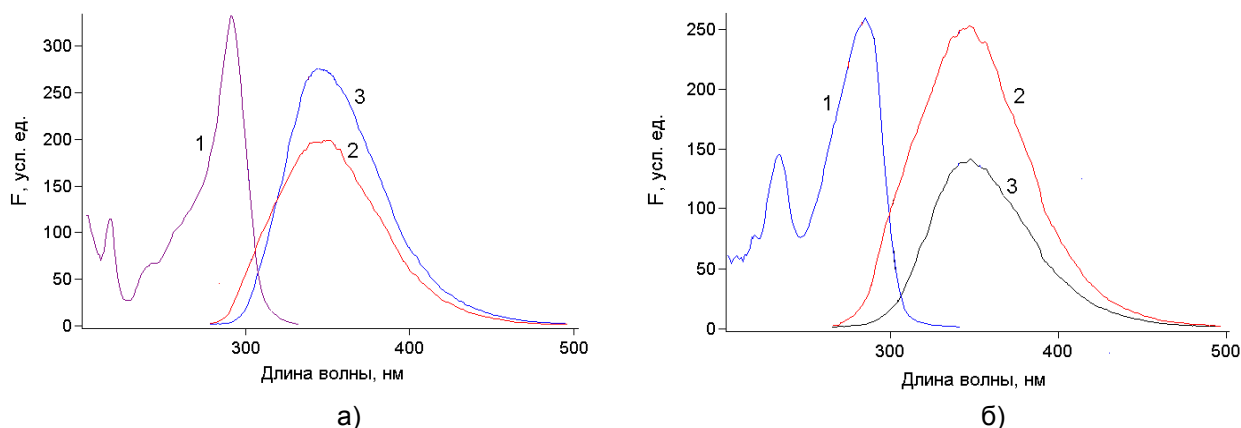


Рис. 1. Спектры возбуждения (1) и флуоресценции (2, 3) белков спермальной плазмы: 2 – $\lambda_{\text{возб}}=280$ нм; 3 – $\lambda_{\text{возб}}=296$ нм; а) разведение в 20 раз; б) разведение в 200 раз (F – интенсивность флуоресценции)

Дополнительной оценкой конформационного состояния белков СП являются ССФ, чувствительные к изменению состояния микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков в белках (Векшин, 1996). По сути, ССФ представляют собой срез спектров возбуждения и флуоресценции, в которых, при варьировании величины смещения ($\Delta\lambda$) монохроматоров возбуждения и флуоресценции, появляется возможность выделения отдельных компонент, огибающих набор кривых ССФ, полученных при различных фиксированных значениях $\Delta\lambda$, которая совпадает со спектром возбуждения образца (рис. 2).

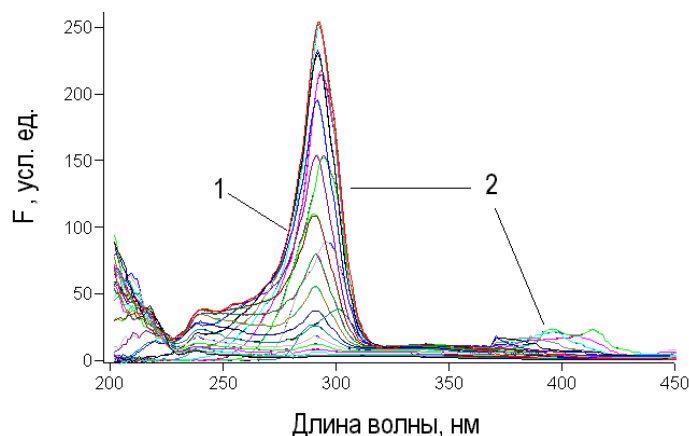


Рис. 2. Спектр возбуждения (1) и синхронные спектры флуоресценции (2) белков спермальной плазмы

Как видно на рис. 2, в нативной СП разделяются компоненты ССФ с максимумами при 286–288, 300 нм ($\Delta\lambda=10$ нм) и 294 нм ($\Delta\lambda=30$ нм), относящиеся к тирозиновым и триптофановым остаткам белков, а также при 215 и 240 нм ($\Delta\lambda=130$ нм), представленные аминокислотными остатками белков и свободными аминокислотами.

Хранение образцов при -12°C , наряду с общим снижением интенсивности флуоресценции, приводило к длинноволновому смещению СФ белков СП на 6–8 нм (к 352–354 нм) с одновременным снижением интенсивности триптофановой флуоресценции белков ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм) (рис. 3). В СВ и ССФ появляется пик с максимумом при 340–345 нм, возбуждение флуоресценции которого приводит к появлению эмиссии при 430–440 нм (рис. 3). Подобные спектральные изменения связаны с денатурацией части белков СП и повышением доступности для воды триптофановых остатков.

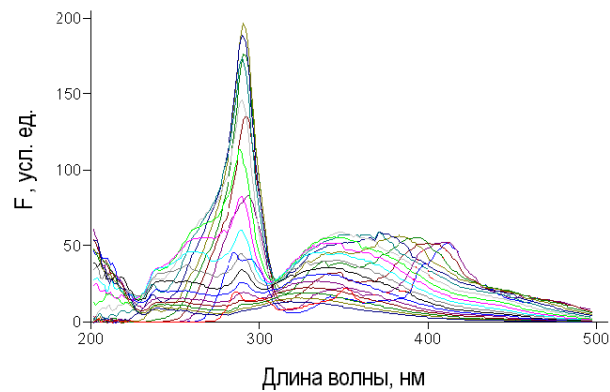


Рис. 3. Влияние хранения при -12°C на синхронные спектры флуоресценции белков спермальной плазмы

Анализ спектральных характеристик образцов СП, подвергнутых хранению при -196°C , показал, что имеет место снижение как общей флуоресценции белков, так и разницы между суммарной ($\lambda_{\text{возб}}=280$ нм) и триптофановой ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм) флуоресценцией, однако длинноволновый сдвиг СФ составлял 1–5 нм. Криоконсервирование вызывает относительно меньшее снижение вклада тирозиновой флуоресценции в суммарные СФ и не приводит к появлению дополнительных пиков в СВ и ССФ.

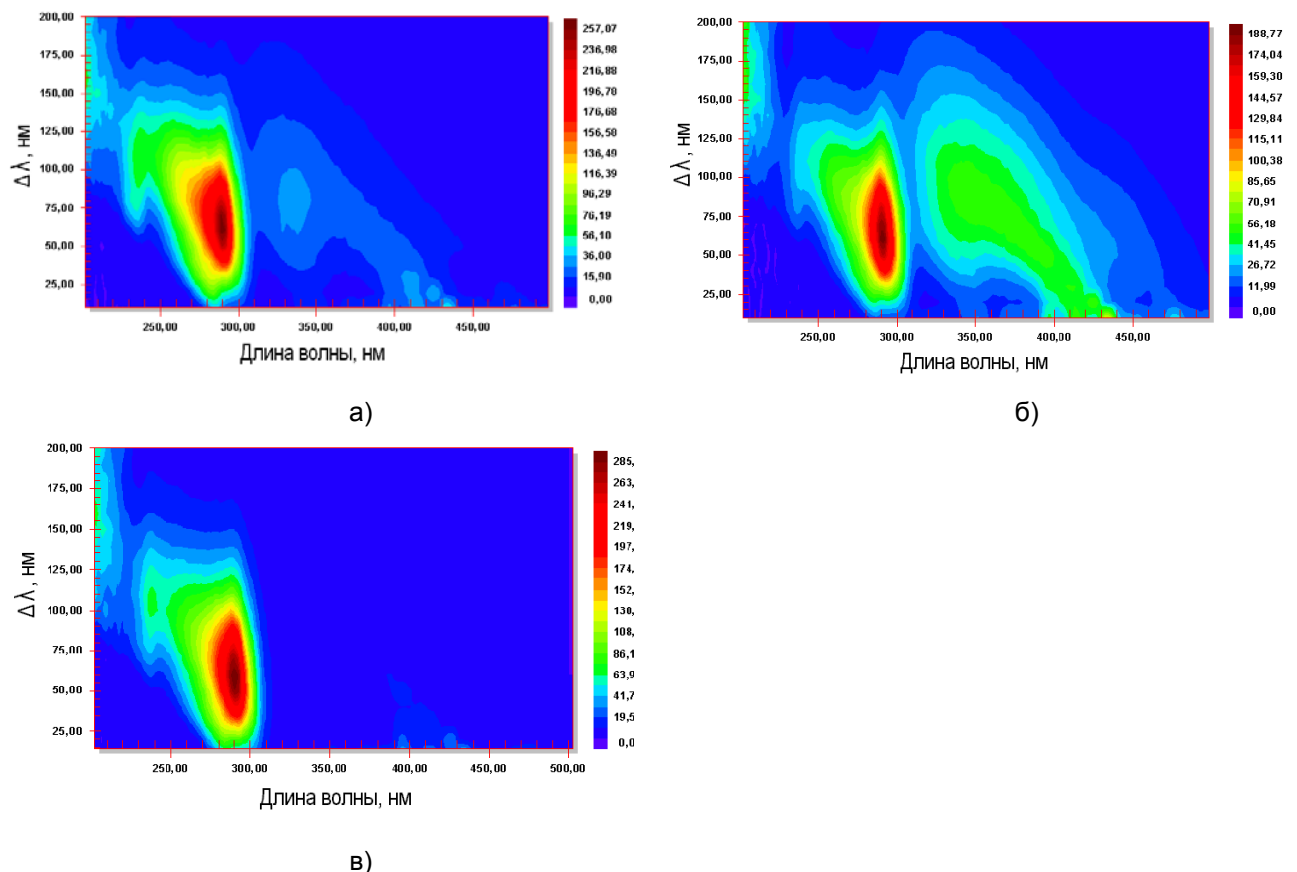


Рис. 4. Влияние температуры хранения на изопотенциальные синхронные спектры флуоресценции белков спермальной плазмы: а) нативная сперма; б) хранение при -12°C ; в) хранение при -196°C

Трехмерный вариант ССФ, называемый изопотенциальными спектрами флуоресценции (ИПССФ), представляет собой соединенные огибающими линии ССФ с равной интенсивностью и

является наиболее наглядной спектральной характеристикой белков СП (рис. 4, а). ИПССФ белков СП, полученные при сканировании монохроматоров возбуждения и флуоресценции от 10 до 200 нм с шагом 10 нм, имеют вид локализуемого в области 225–325 нм пятна неправильной формы с центром при 290–292 нм. После действия низких температур на СП наблюдали незначительные изменения в ИПССФ при хранении -196°C (рис. 4, в), в то время как содержание СП при -12°C характеризуется появлением эмиссии в длинноволновой области с максимумом при 345–350 нм и 380–450 нм (рис. 4, б). Приведенное описание в целом характеризует ИПССФ белков СП, однако, могут быть вариации формы изображений, что связано с индивидуальными особенностями спермы доноров.

По-видимому, содержание в СП фосфолипидсодержащих протеинов и глюкозаминогликанов способствуют формированию мелкокристаллической структуры льда, что снижает повреждение макромолекул. По сути, СП в данном случае выступает как природный криопротектор (Ben et al., 1997). Кроме того, в условиях глубокого замораживания снижено влияние факторов, способствующих окислительной деградации белков.

Анализ данных гель-электрофореза показал, что хранение при -12°C приводит к уменьшению содержания белков в СП, что может быть связано с необратимыми конформационными изменениями и окислительной деградацией части белков (рис. 5). Наиболее повреждаются при этом фракции иммуноглобулинов, а также, частично, альбумина и некоторых низкомолекулярных белков (рис. 5, б). Хранение при температуре жидкого азота меньше влияет на белковый спектр СП (рис. 5, в), однако, при этом также наблюдается снижение общего количество белка в образцах, что может быть связано с частичной агрегацией и выпадением в осадок наиболее криолабильных компонент.

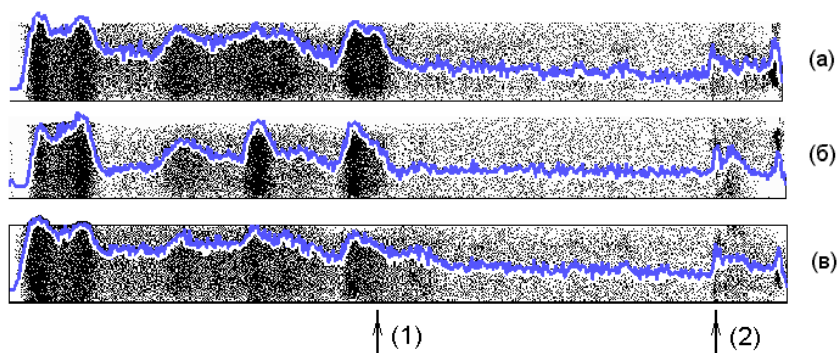


Рис. 5. Гель-электрофореграммы и денситограммы (наложены) спермальной плазмы: (а) – нативная СП; (б) – хранение при -12°C ; (в) – при -196°C в течение 1 месяца. Стрелками указано положение фракций альбумина (1) и иммуноглобулинов (2)

Таким образом, проведенные исследования показали, что белки СП проявляют высокую чувствительность к условиям хранения. При этом степень сохранности образцов определяется не только температурой хранения, но и зависит от исходного состояния и соотношения различных типов белков в образцах. Следует отметить, что расширенное исследование экскреторной функции мужских репродуктивных органов может быть использовано не только для выявления причин бесплодия, но представляет возможным выяснение эндокринных и белково-ферментативных отклонений.

Выводы

1. Хранение спермальной плазмы человека при умеренно низкой температуре (-12°C) приводит к деградации входящих в ее состав белков.
2. Замораживание и хранение при температуре жидкого азота (-196°C) оказывает минимальное повреждающее воздействие на белки и является предпочтительным для длительного хранения спермальной плазмы человека.
3. Использование методов флуоресцентной спектроскопии и электрофореза для оценки состояния белков в спермальной плазме человека может быть рекомендовано в качестве теста для индивидуальной оценки спермы человека.

Список литературы

Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белков. (Природа и применение) // Биофизика. – М.: ВИНТИ АН СССР, 1977. – Т.7. – 189с.

- Векшин Н.Л. Разделение тирозиновой и триптофановой компонент флуоресценции методом синхронного сканирования // Биофизика. – 1996. – Т.41, №6. – С. 1176–1179.
- Гулевский А.К., Сахаров Б.В., Волков В.Я. Низкотемпературное нарушение проницаемости плазматических мембран, связанное с дегидратацией // Докл. АН СССР. – 1982. – Т.263, №5. – С. 1250–1254.
- Добрецов Г.Е., Спиринов 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, №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, №2. – С. 187–193.
- Дунаевская А.В. Влияние спермальной плазмы, кордовой сыворотки и сыворотки крови человека в среде криоконсервации на сохранность криоконсервированных спермиев // Пробл. криобиологии. – 2000. – №3. – С. 44–49.
- Иванов Л.В., Моисеев В.А., Гаврилова И.И. Исследование влияния гиперконцентрации солей на структуру Hb методом спин-меток // III Всес. конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. – Харьков, 1977. – С. 82–83.
- Морозова Т.Ф., Грек А.М., Коптелов В.А. и др. Изменения спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина в концентрированных растворах хлористого натрия // Криобиология и криомедицина. – 1982. – №10. – С. 22–29.
- Мошко Ю.О. Криоконсервация сыворотки кордовой крови, визначення її біологічної активності та клінічної ефективності в терапії хронічних сальпінгофоритів. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Х., 2003. – 19с.
- Науменко Е.И., Розанова Е.Д. Изучение механизмов и криповреждения изолированной цитохромоксидазы // II Всес. конф. «Криобиология и криомедицина». – Харьков, 1984. – Т.1. – С.61.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1984. – 288с.
- Пушкар Н.С., Белоус А.М. Актуальные проблемы криобиологии. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608с.
- Черницкий Е.А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. – Минск: Наука и техника, 1972. – 134с.
- Яковлева Е.А. Вплив низьких температур на деякі біофізичні та біохімічні характеристики фолікулярної рідини яєчника людини. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Х., 2007. – 20с.
- Ben W.X., Fu M.T., Mao L.K. et al. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm // Arch. Androl. – 1997. – Vol.39. – P. 211–216.
- 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.
- Check J., Check M.L., Bollendorf A. et al. Failure of the addition of fresh seminal plasma to cryopreserved-thawed sperm to improve semen parameters // Arch. Androl. – 1993. – Vol.31. – P. 121–125.
- Cross N.L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor // Biol. Reprod. – 1996. – Vol.54. – P. 138–145.
- World Health Organization Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. – Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997. – 22p.

Представлено: Л.Д.Паценкер / Presented by: L.D.Patsenker

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 17.04.2009

© Т.С.Дюбко, А.Б.Малишев, Н.Н.Чуб, В.Л.Родіонова, М.Й.Крамар, А.А.Гапон, 2009

© T.S.Dyubko, A.B.Malyshev, N.N.Tchoob, V.L.Rodionova, M.I.Kramar, A.A.Gapon, 2009