

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОТЕИНОВ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ–ОТТАИВАНИЯ

© С. Л. РОЗАНОВА, Е. Д. РОЗАНОВА, О. А. НАРДИД

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: sv.rosanova@gmail.com*

*Представлены экспериментальные данные, полученные при сравнительной оценке влияния различных режимов замораживания на антиоксидантную активность изолированных протеинов: сывороточного альбумина человека, цитохрома с из сердца лошади и глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*. Предполагается, что наблюдаемые изменения антиоксидантной активности протеинов связаны с изменением их конформации. Характер влияния замораживания–оттаивания на антиоксидантную активность протеинов зависит от особенностей структуры молекулы и режимов охлаждения.*

Ключевые слова: альбумин, глюкозооксидаза, цитохром с, замораживание–оттаивание, антиоксидантные свойства.

Достаточно долгое время протеины рассматривались как основная мишень для повреждающего действия прооксидантов. В настоящее время представления о роли протеинов в оксидативном стрессе значительно расширились. Появились данные об их антиоксидантной активности. Так, в условиях продолжительного окислительного стресса сывороточный альбумин рассматривается как основной антиоксидант плазмы крови [1]. Исследованы антиоксидантные свойства ряда протеинов, в частности протеинов-гормонов [2]. Изучение механизмов антиоксидантной активности протеинов показало, что она обусловлена доступными растворителю аминокислотами, которые по эффективности можно расположить в следующем порядке: цистеин >> триптофан > тирозин > гистидин > цистин. Значительную роль могут играть также метионин и фенилаланин [3].

Установлена тесная взаимосвязь между структурой некоторых протеинов и их антиоксидантными свойствами. Например, антиоксидантные участки сывороточного альбумина в литературе представлены следующим образом: хелатирующий центр, обеспечивающий связывание ионов металлов переменной валентности; один свободный Cys34, обеспечивающий восстановительную способность благодаря наличию сульфгидрильной группы; участки Lys351, Lys475, связывающие ненасыщенные жирные кислоты, препятствуя их вовлечению в процессы пероксидного окисления липидов; Lys240, связывающий билирубин; 6 метиониновых аминокислотных остатков, которые являются эффективными хелаторами и

в небольшой степени ингибиторами свободных радикалов [4]. Показано, что антиоксидантная активность протеинов повышается, когда они подвергаются температурному и окислительному стрессу, УФ-облучению, действию глюкозы и альдегидов. Объясняется это структурными изменениями макромолекул, которые сопровождаются увеличением доступности антиоксидантных групп [5].

Проведенные нами ранее исследования по изучению влияния низкотемпературного воздействия на антиоксидантные свойства водно-солевых экстрактов плаценты человека [6] позволило сделать предположение о том, что наблюдаемые изменения в значительной степени обусловлены антиоксидантной активностью входящих в их состав протеинов.

Известно, что низкотемпературное воздействие, в большинстве случаев, приводит к изменению конформации протеинов, обычно заключающемуся в разрыхлении протеиновых молекул и увеличении доступности растворителю их внутренних участков [7, 8], что, в свою очередь, может привести к изменению их антиоксидантной активности. Поэтому несомненный интерес представляет исследование влияния низкотемпературного воздействия на антиоксидантные свойства протеинов.

Цель работы – изучить влияние низкотемпературного воздействия на антиоксидантные свойства сывороточного альбумина, глюкозооксидазы и цитохрома с.

Материалы и методы

В работе использовали сывороточный альбумин человека, выделенный из плазмы

донорской крови с использованием метанола [9], дополнительно очищенный на хроматографической колонке с сефадексом G-75, цитохром *c* из сердца лошади (Serva, Германия), и глюкозооксидазу из *Aspergillus niger* (фирмы Faizyme, Китай), дополнительно очищенную методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Растворы протеинов с концентрацией 1 мг/мл в натрий-фосфатном буфере pH 7,4 замораживали медленно до -20 °C со скоростью 1 °C/мин или быстро до -196 °C со скоростью 100 °C/мин. Отогревали на водяной бане при 20 °C.

Об изменении конформации протеинов судили по изменению спектров их поглощения.

Спектрофотометрические исследования антирадикальной активности протеинов проводили по методу Re et al. [10]. Катионный радикал ABTS⁺ получали путем реакции между 7 мМ ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Sigma, Канада) в H₂O и 2,45 мМ аммония персульфатом (Sigma, Канада), хранившимся 12 ч в темноте при комнатной температуре. Раствор ABTS⁺ (0,1 мл) разводили 2,5 мл дистиллированной воды. Исходные и подверженные замораживанию–оттаиванию растворы протеинов (0,1 мл) добавляли к полученному веществу и регистрировали кинетику обесцвечивания раствора ABTS⁺. Значения антирадикальной активности (АРА) определяли по формуле:

$$АРА (\%) = (A_0 - A_t)/A_0 \times 100,$$

где A_0 – абсорбция при $t = 0$ мин, A_t – абсорбция через исследуемый промежуток времени.

Хелатирующую активность исследуемых образцов оценивали по методу Dinis et al. [11]. К 0,2 мл исследуемого образца добавляли раствор 2 мМ FeCl₂ (0,05 мл). Реакцию инициировали добавлением 5 мМ феррозина (Sigma, Канада). Смесь хорошо встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. После достижения в смеси равновесия измеряли на спектрофотометре поглощение образцов на длине волны 562 нм. Хелатирующую активность оценивали по способности исследуемых веществ связывать ионы Fe²⁺, в результате чего уменьшается количество окрашенного феррозин-Fe²⁺ комплекса.

$$\text{Связанный Fe}^{2+} (\%) = [(A_k - A_o)/A_k] \times 100,$$

где A_k – абсорбция феррозин-Fe²⁺ комплекса; A_o – абсорбция феррозин-Fe²⁺ комплекса в присутствии исследуемого образца.

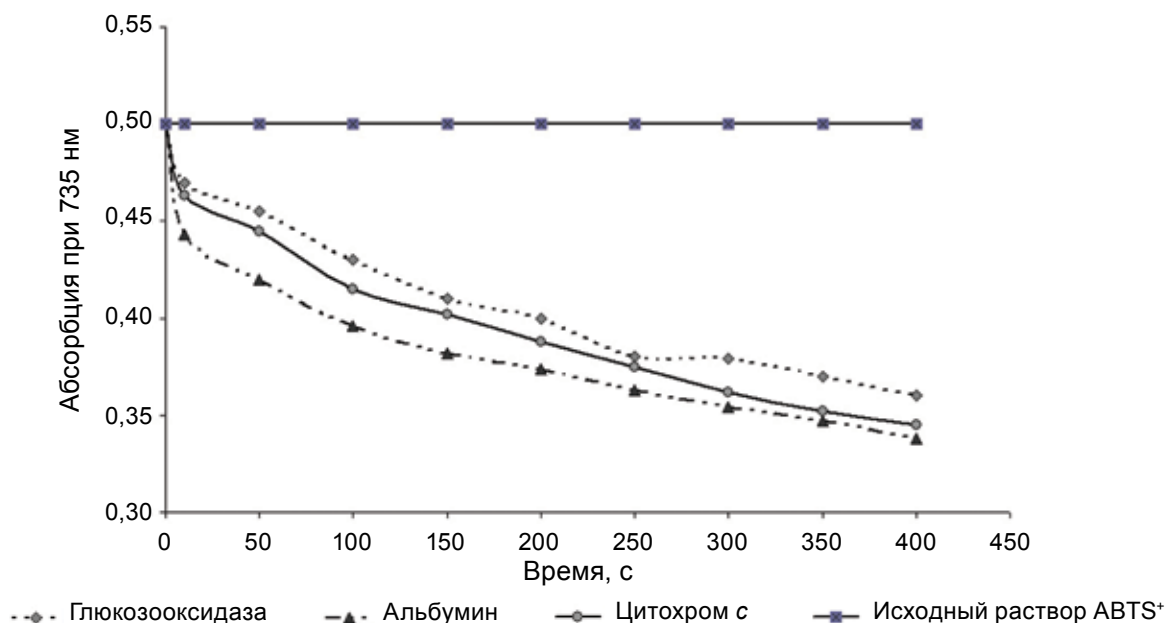
Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Origin 6.1. Значимость различий результатов для нативных протеинов и после замораживания оценивали на основании парного *t*-теста. Уровень статистической значимости принят как $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Объектами исследования для оценки влияния замораживания на антиоксидантные свойства были выбраны протеины с различной структурой. Глюкозооксидаза – димер с молекулярной массой 180 кДа, конформация которого изменяется после замораживания–оттаивания [12]. Альбумин – глобулярный субъединичный протеин с доменной структурой с молекулярной массой 63 кДа. Замораживание растворов альбумина приводит в ряде случаев к агрегации молекул [13]. Цитохром *c* из сердца лошади – небольшой глобулярный протеин с молекулярной массой 12 кДа в окисленной форме. Влияние на его структуру замораживания–оттаивания практически не исследовалось. Антиоксидантные свойства были изучены ранее только для молекулы альбумина: показана его способность ингибировать ABTS⁺-радикал и хелатировать ионы металлов [4, 14, 15].

Для оценки антиоксидантной активности биологических жидкостей широко используется метод, основанный на способности исследуемых веществ восстанавливать ABTS⁺-радикал. Кинетика восстановления ABTS⁺-радикала имеет две фазы, которые обусловлены наличием быстро и медленно восстанавливающих антиоксидантов. Активность быстро восстанавливающих центров (предполагается, что для протеинов это прежде всего цистеин, содержащий SH-группу [16]), оценивали по снижению поглощения за первые 10 с, активность медленно восстанавливающих центров определяли по ингибированию окраски за следующие 390 с [10, 17] (рис. 1).

Результаты исследований показали, что медленное замораживание до -20 °C приводит к уменьшению общей антирадикальной активности альбумина, которое происходит за счет снижения активности как быстро, так и медленно восстанавливающих центров. Для цитохрома *c* общая антирадикальная активность практически не изменяется, но при этом отмечается уменьшение активности быстро восстанавливающих центров и увеличение медленно восстанавливающих. Общая антирадикальная

Рис. 1. Кинетика восстановления протеинами ABTS⁺-радикала

Влияние различных режимов замораживания на активность быстро и медленно восстанавливающих ABTS⁺-радикал-центров протеинов: альбумина, глюкозооксидазы, цитохрома с

Образец	АРА быстро восстанавливающих центров, %	АРА медленно восстанавливающих центров, %	Общая АРА, %
<i>Альбумин</i>			
Нативный	7,60 ± 0,29	12,5 ± 0,6	20,10 ± 0,58
После замораживания до -20 °С	4,30 ± 0,21*	9,1 ± 0,4*	13,40 ± 0,41*
После замораживания до -196 °С	5,40 ± 0,19*	13,40 ± 0,61*	18,8 ± 0,6*
<i>Глюкозооксидаза</i>			
Нативная	5,80 ± 0,22	20,60 ± 1,03	26,40 ± 1,06
После замораживания до -20 °С	6,7 ± 0,3*	29,40 ± 1,37*	36,1 ± 1,7*
После замораживания до -196 °С	8,70 ± 0,34*	32,70 ± 1,28*	41,4 ± 1,4*
<i>Цитохром с</i>			
Нативный	7,20 ± 0,17	21,00 ± 0,35	28,20 ± 0,35
После замораживания до -20 °С	4,60 ± 0,15 *	23,7 ± 0,2*	28,30 ± 0,21
После замораживания до -196 °С	5,7 ± 0,2*	25,40 ± 0,25 *	31,1 ± 0,2*

* Отличия достоверны по сравнению со значениями антирадикальной активности для нативного протеина, $P < 0,05$.

активность глюкозооксидазы повышается в основном за счет медленной фазы (таблица).

Быстрое замораживание до -196 °С приводит к увеличению антирадикальной активности цитохрома с и глюкозооксидазы. Причем

при замораживании цитохрома с это увеличение происходит только за счет медленно восстанавливающих центров. Для глюкозооксидазы увеличение общей антирадикальной активности происходит как за счет медленно,

так и быстро восстанавливающих центров. Замораживание альбумина вызывает снижение данной активности за счет уменьшения быстрой фазы (таблица).

Одним из основных механизмов антиоксидантной защиты биологических макромолекул во внеклеточной среде является способность некоторых соединений образовывать хелатные комплексы с ионами металлов переменной валентности и препятствовать тем самым вовлечению последних в реакции разложения пероксидов с образованием гидроксильного радикала [18].

Экспериментальные данные показали, что влияние замораживания на хелатирующую активность не зависит от режима охлаждения и только в случае глюкозооксидазы наблюдается ее достоверное увеличение. Хелатирующая способность цитохрома *c* и альбумина не изменяется после низкотемпературного воздействия (рис. 2).

Полученные результаты показали, что замораживание глюкозооксидазы приводит к наиболее значительным изменениям ее антиоксидантной активности по сравнению с другими протеинами. Проведенные ранее исследования влияния различных режимов охлаждения на конформацию энзима показало, что наблюдается разрыхление протеиновой

молекулы и увеличение доступности растворителю протеиновых хромофоров, более выраженное при высоких скоростях охлаждения. При медленных скоростях наблюдается значительная агрегация, которая происходит за счет гидрофобных областей молекулы [12, 19]. В молекуле глюкозооксидазы есть свободные остатки Cys, которые могут являться основным центром, ответственным за быструю фазу кинетики ABTS⁺-радикала, благодаря наличию SH-группы [3]. Поэтому увеличение активности быстрой фазы восстановления радикала можно объяснить увеличением доступности этих остатков.

Молекула альбумина также содержит свободный Cys, однако результаты исследования первых производных спектров поглощения протеина (рис. 3) показали отсутствие изменений, свидетельствующих об увеличении доступности растворителю протеиновых хромофоров, а небольшое смещение спектров в длинноволновую область и увеличение уровня светорассеяния, о чем можно судить по возрастанию абсорбции при 325 нм (рис. 4) в растворах свидетельствует об агрегации молекул [20], которая в альбумине обычно происходит за счет SH-групп Cys [21]. Наиболее выражены эти изменения после замораживания до -20 °С. Полученные результаты можно объяс-

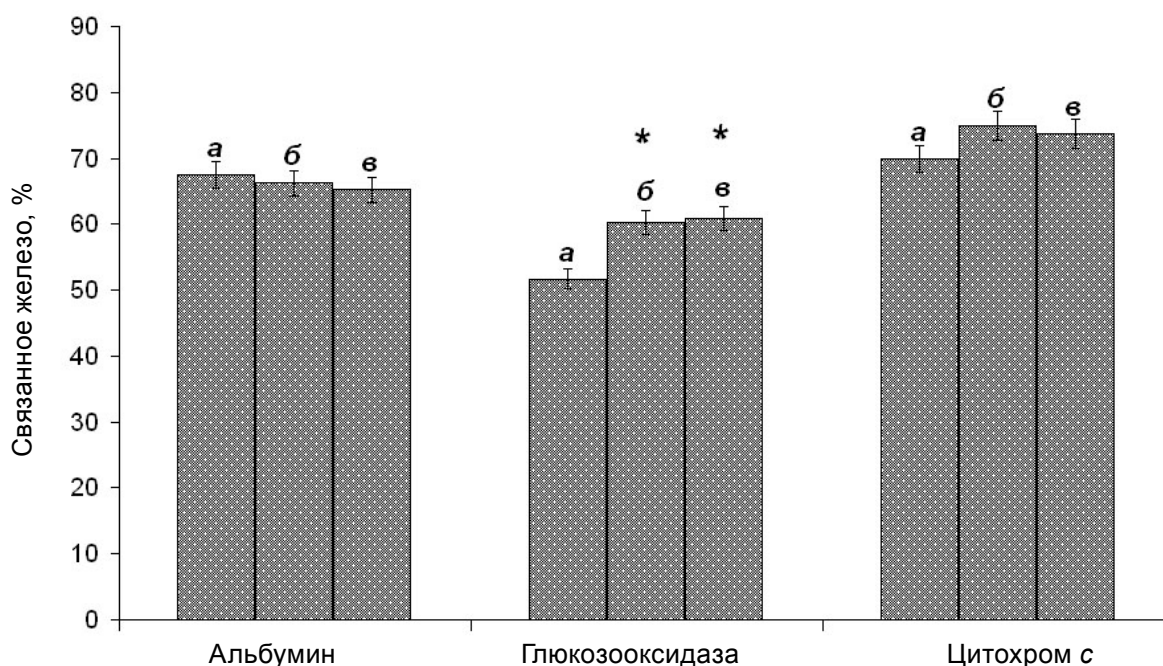


Рис. 2. Хелатирующая способность протеинов: а – контроль, б – после замораживания до -20 °С, в – после замораживания до -196 °С. * Отличия достоверны по сравнению со значениями хелатирующей способности для нативного протеина, $P < 0,05$

нить тем, что при использовании медленного охлаждения увеличивается время нахождения протеина в концентрированном растворе, образующимся в процессе кристаллизации, и увеличивается степень агрегации альбумина, приводящая к снижению антиоксидантной активности протеина.

Одним из параметров, которые используют для изучения конформации молекулы цитохрома *c*, является полоса поглощения при 695 нм [22]. Она обусловлена переносом заряда между остатком метионина (Met-80) и гемовым железом. Разворачивание молекулы в области Met-80 приводит к исчезновению этой полосы в результате потери связи этой аминокислоты с гемовым железом. Замораживание цитохрома *c* приводит к снижению интенсивности этой полосы (рис. 5), более значительному при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, что свидетельствует о разрыхлении молекулы протеина.

Учитывая данные литературы, согласно которым хелатирующая способность альбумина в основном обусловлена остатками Met [14] можно предположить, что и в глюкозооксидазе, и цитохроме *c*, в которых присутствуют эти группы, они ответственны за антиоксидантную активность. Небольшое изменение хелатирующей способности протеинов после

замораживания—оттаивания, по-видимому, объясняется тем, что доступность хелатирующих центров практически не изменяется.

Исследованные протеины входят в многочисленную группу макромолекул, которые используются в медицинской практике. Нестабильность препаратов на основе протеинов влечет за собой многочисленные исследования, посвященные поиску методов хранения, одним из которых является замораживание до различных температур. В большинстве случаев замораживание растворов протеинов не приводит к денатурации, но даже небольшие изменения в локальных доменах макромолекул могут приводить к изменениям их функции. При выборе режимов замораживания антиоксидантные свойства протеинов могут рассматриваться как один из параметров их конформационной стабильности. В ряде случаев при использовании препаратов протеинов, например альбумина, их антиоксидантная активность играет важную роль, и ее увеличение будет улучшать эффективность препарата. В то же время увеличение антиоксидантной активности протеинов, для которых более важным является сохранение их нативной структуры, будет нежелательно, поскольку они будут быстрее подвергаться окислению.

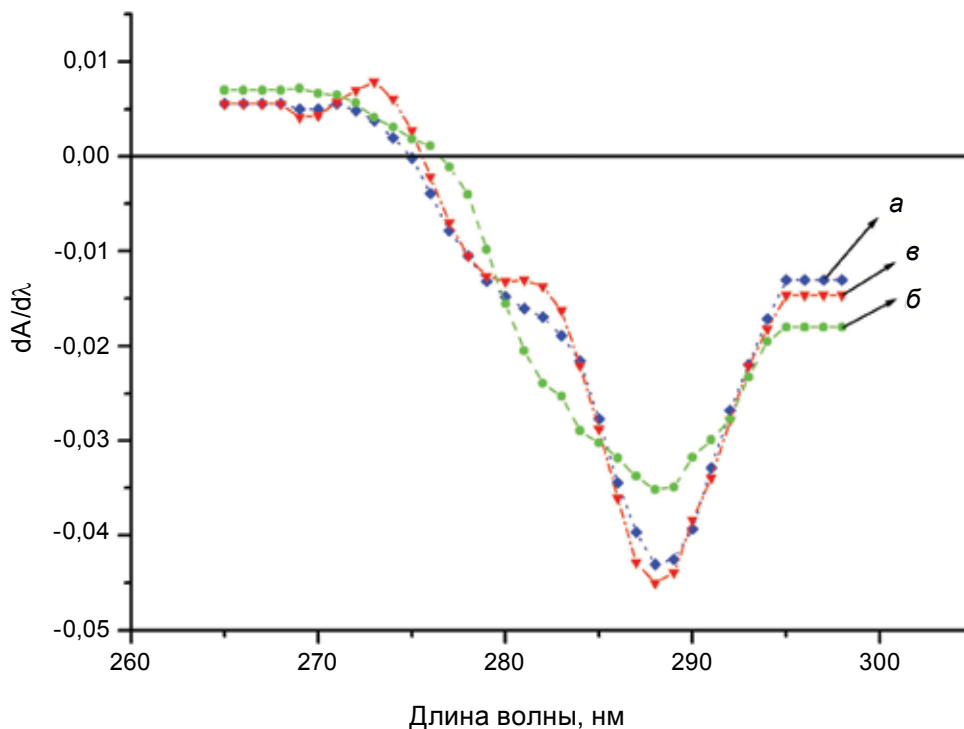


Рис. 3. Влияние различных режимов замораживания на первые производные спектров поглощения альбумина: а — нативного; б — замороженного до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; в — замороженного до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

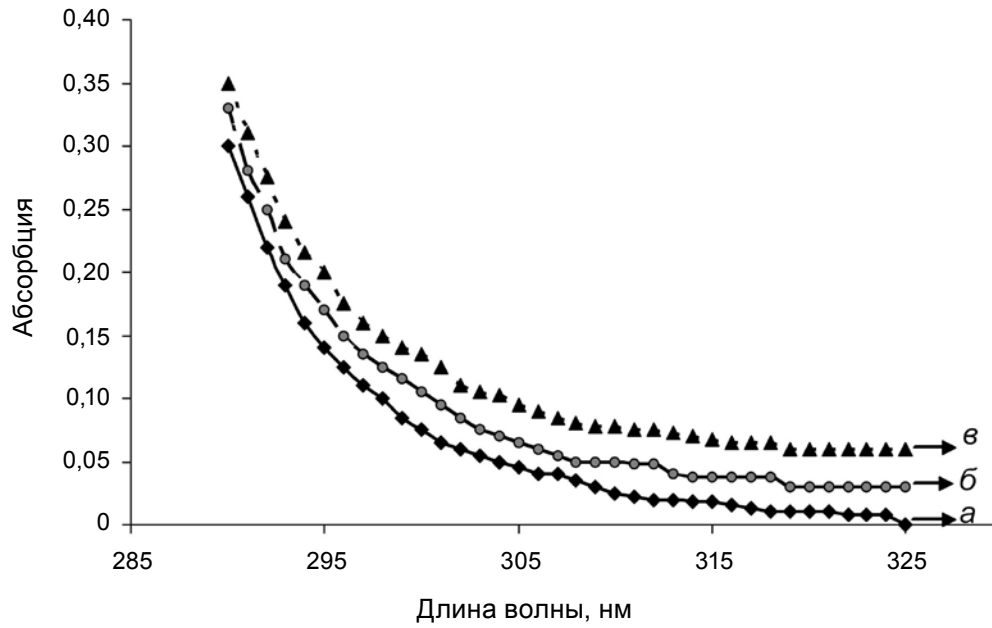


Рис. 4. Влияние различных режимов замораживания на спектры поглощения альбумина: а – нативного; б – замороженного до -20°C ; в – замороженного до -196°C

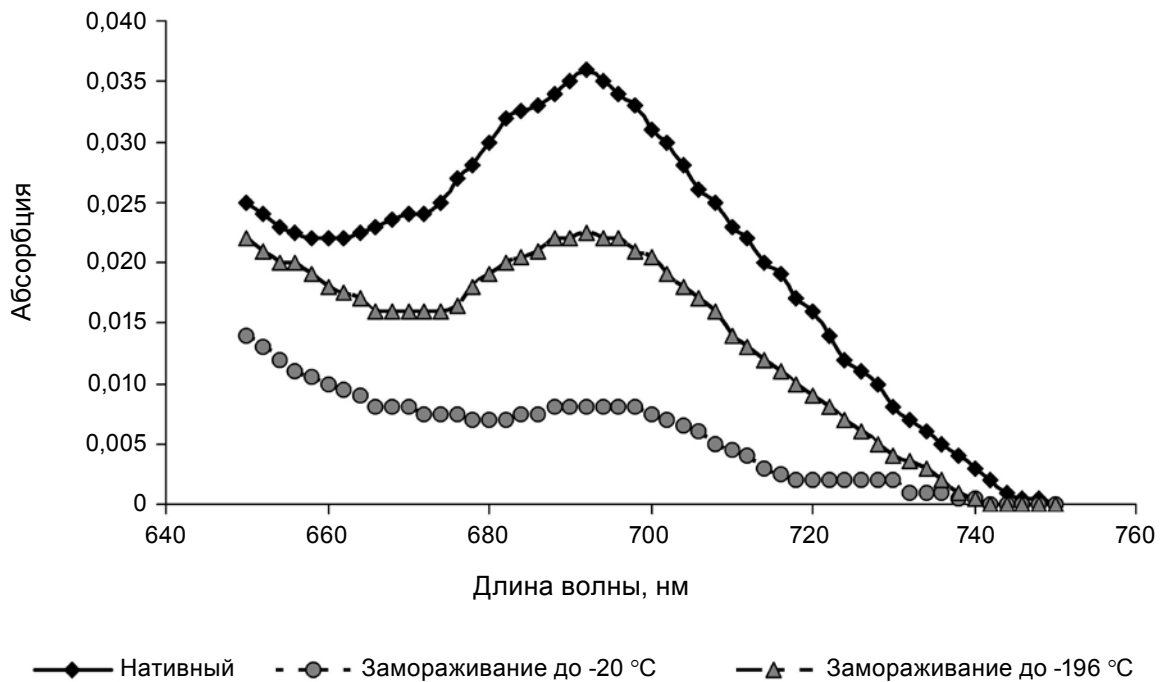


Рис. 5. Влияние различных режимов замораживания на спектры абсорбции цитохрома с

АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ ПІСЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ— РОЗМОРОЖУВАННЯ

С. Л. Розанова, К. Д. Розанова,
О. А. Нардід

Інститут проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: sv.rosanova@gmail.com

Представлено експериментальні дані, одержані за порівняльної оцінки впливу різних режимів заморожування на антиоксидантну активність ізольованих протеїнів: альбуміна із сироватки крові людини, цитохрома *c* із серця коня та глюкозооксидази з *Aspergillus niger*. Зміна антиоксидантної активності протеїнів може бути пов'язана зі змінами конформації протеїнів. Характер впливу заморожування—розморожування на протеїни залежить від особливостей структури молекули та режимів охолодження.

Ключові слова: альбумін, глюкозооксидаза, цитохром *c*, заморожування—розморожування, антиоксидантна активність.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PROTEINS AFTER FREEZING- THAWING

S. L. Rozanova, E. D. Rozanova,
O. A. Nardid

Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv;
e-mail: sv.rosanova@gmail.com

Summary

Experimental data are presented which were obtained under comparative evaluation of influence of different freezing-thawing conditions on antioxidant properties of isolated proteins: human serum albumin, cytochrome *c* from the horse heart and glucose oxidase from *Aspergillus niger*. The observed protein antioxidant activity alterations are assumed to be a result of protein conformational changes. The character of freezing-thawing influence on the protein antioxidant activity depends on the molecular structure and cooling conditions.

Key words: albumin, glucoseoxidase, cytochrome *c*, freezing-thawing, antioxidant activity.

1. Bourdon E., Blache D. // *Antioxid. Redox Signal.* — 2001. — **3**. — P. 293–311.
2. Moosmann V., Behl C. // *Mol. Pharmacol.* — 2002. — **61**, N 2. — P. 260–268.
3. Aliaga C., Lissi E. A. // *Can. J. Chem.* — 2000. — **78**, N 8. — P. 1052–1059.
4. Roche M., Rondeau, Singha N. R. et al. // *FEBS Lett.* — 2008. — **582**, N 13. — P. 1783–1787.
5. Medina-Navarro R., Durán-Reyes G., Diaz-Flores M. et al. // *PLoS ONE.* — 2010. — **203**, N 4. — P. 316–319.
6. Розанова С. Л., Науменко Е. И., Розанова Е. Д. и др. // *Проблемы кріобіології.* — 2010. — **20**, № 3. — С. 288–297.
7. Нардід О. А. // Там же. — 1999. — № 3. — С. 31–34.
8. Cao E., Chen Y., Cui Z. et al. // *Biotechnol. Bioenerg.* — 2003. — **82**, N 6. — P. 684–690.
9. Michael S. E. // *Biochem J.* — 1962. — **82**. — P. 212–218.
10. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — **26**, N 9/10. — P. 1231–1237.
11. Dinis T. C. P., Madeira V. M. C., Almeida L. M. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1994. — **315**, N 1. — P. 161–169.
12. Грищенко В. І., Нардід О. А., Розанова К. Д. и др. // *Біополімери і клітина.* — 2006. — **22**, № 3. — С. 236–242
13. Hawe A., Friess W. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2006. — **64**, N 3. — P. 316–325.
14. Bourdon E., Loreau N., Lagrost L. et al. // *Free Radic. Res.* — 2005. — **39**, N 1. — P. 15–20.
15. Corstein S., Caspi A., Libman I. et al. // *J. Agric. Food Chem.* — 2004. — **52**, N 16. — P. 5215–5222.
16. Walker R. B., Everette J. D. // *Ibid.* — 2009. — **57**, N 4. — P. 1156–1161.
17. Henriquez C., Aliaga C., Lissi E. // *J. Chil. Chem. Soc.* — 2004. — **49**, N 1. — P. 74–76.
18. Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. // *Усп. совр. биол.* — 1993. — **113**, № 4. — С. 442–453.
19. Грищенко В. І., Нардід О. А., Розанова К. Д. и др. *Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій / За ред. Г. В. Єльскої, В. Д. Походенка, Київ, 2006.* — С. 58–67.
20. Aoki K., Sakurai S., Murata M. et al. // *Colloid Polym. Sci.* — 1984. — **262**, N 6. — P. 470–476.
21. Wetzl R., Becker M., Behlke J. et al. // *Eur. J. Biochem.* — 1980 — **104**, N 2. — P. 469–78.
22. Singh S. M., Hutchings R. L., Mallela K. M. G. // *J. Pharm. Sci.* — 2011. — **100**, N 5. — P. 1679–1689.

Получено 11.05.2011