

ИЗМЕНЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Ион БАЛАН

Институт физиологии и санокреатологии Академии наук Молдовы

În articol sunt prezentate rezultatele cercetărilor teoretice și practice privind transformările criogenice în interacțiunile proteice intermoleculare din biomembrane. A fost evidențiată derularea proceselor fizico-chimice în membranele plasmatice ale celulei, care depinde de gradul modificărilor matricelui proteic și de schimbările fizico-chimice ale proprietăților proteinelor în membrane la etapele de precongelare. Prin urmare, au fost elucidate mecanismele de criodestrucție, care sunt reacții specifice, condiționate de dereglările interacțiunilor intermoleculare ale proteinelor. S-a stabilit că conținutul sumar al proteinelor spermei de cocoș și de taur la crioconservare nu suportă schimbări esențiale comparativ cu spectrul individual al fracțiilor proteice. La crioconservare în plasma seminală modificarea conținutului α -, β - și γ -globulinelor este specifică pentru cocoș și taur, iar în spermatozoizi dinamica valorii α -, β - și γ -globulinelor manifestă stabilitate cu caracter nespecific pentru speciile studiate.

In this article are presented the results of theoretical and practical research of the cryogenic transformations in intermolecular protein interactions from biomembrane. It was relieved the performance of physicochemical processes in plasma membrane of the cell, which depends on the level of protein matrix modifications and physicochemical changes of the proteins in membrane at the stages of prefreezing. Therefore, has been elucidated the mechanisms of cryodestruction which are specific reactions, conditioned by intermolecular interactions disorders of proteins. It was established that summary content of protein in rooster and ox sperm in cryoconservation does not support significant changes compared with individual spectrum of protein fractions. At cryoconservation, in seminal plasma, modification content of the α -, β - and γ -globulin is specific for rooster and bull, but in spermatozoa the dynamic value of α -, β - and γ -globulins exhibit stability with nonspecific character for the studied species.

Основной проблемой современной криобиологии являются эффективное применение низких температур для сохранения биологических систем и связанные с этим исследования влияния холода на реализацию механизмов, лежащих в основе функционирования данных систем на различных уровнях организации.

В настоящее время ученые проявляют большой интерес к проблеме криоконсервации генома. Один из центральных аспектов этой проблемы – исследование механизмов криоповреждения гамет различных видов животных и разработка эффективных методов их криоконсервации.

Накоплен огромный фактический материал, позволивший высказать различные гипотезы относительно механизмов повреждения биологических объектов и разработать способы криоконсервации семени различных видов животных и человека [1-6]. Однако проблема криоконсервации еще далека от разрешения и в настоящее время, что не позволяет в полной мере использовать генетический потенциал. Это, на наш взгляд, объясняется сложностью механизмов криодеструкций, недооценкой комплексности в изучении влияния низких температур на геном (разобщенностью исследований, осуществляемых физиологами, биохимиками, физиками, медиками, биофизиками и др.), как и недооценкой системного подхода при исследовании крионарушений. Вследствие этого, часто встречаются узкие, лишённые общепризнанного смысла механические трактовки накопленного материала, хотя последний является достаточно ценным и получен при использовании весьма современных методик [7-10].

Одним из экстремальных факторов, воздействующих на геном, является действие низких и сверхнизких температур. Охлаждение любого биологического объекта можно считать мощным стрессорным влиянием, которое, во-первых, вызывает сложный комплекс структурно-функциональных изменений [11] и, во-вторых, ведет к расстройству функций не только организма в целом, но и каждой жизненно важной физиологической системы и органа в отдельности [12, 13]. В клеточных системах при замораживании не успевают развиваться процессы адаптационных перестроек. Охлаждение гамет в зоне гипотермических температур в период эквilibрации хотя и сопровождается резким снижением метаболических процессов, однако не прекращает их полностью. Это обусловлено течением адаптационно-компенсаторных реакций [14].

Учитывая, что вынесенные из организма клетки некоторый временной интервал сохраняют жизнеспособность, можно считать возможным осуществление в них в этот период процессов саморегуляции за счет отрицательной обратной связи, направленной к восстановлению исходного уровня живой системы в целом. [15]. По мнению автора, в ответ на экстремальное воздействие происходит мобилизация потенциальных возможностей, направленная на сохранение гомеостаза клетки.

В случае недостаточной эффективности адаптационно-компенсаторных реакций в клетках имеют место криогенные изменения. Следует отметить, что наиболее лабильными клеточными структурами являются мембраны [16,17].

Из всего многообразия физико-химических процессов, протекающих в клетке, а следовательно – и в плазматической мембране при замораживании и оттаивании [18-20], показано, что решающим из них является возникновение трансмембранных дефектов в плазматической мембране, развитие которых зависит от степени модификации белкового скелета и изменения физико-химических свойств липидов и белков в самой мембране на разных этапах, предшествующих замораживанию.

Специфическая особенность биологического действия холода заключается в том, что первичные повреждения в гаметех локализуются лишь в крайне малых объемах молекулярных размеров. Если повреждения гамет относятся к уникальным структурам клетки (хромосомы, ядро) и затрагивают состав ядерной или клеточной мембраны, эти повреждения вторично могут вызвать большие необратимые нарушения функционального характера [16,21]. Повреждение мембран может существенно нарушить стационарное состояние в гаметех посредством изменения межмолекулярных взаимодействий, их диффузионных параметров, течения ферментативных реакций и других жизненно важных процессов [22-24]. Отсюда следует, что усилия исследователей должны быть направлены на стабилизацию первичных, обратимых изменений, тогда как необратимые регулированию не подлежат.

Повреждения биологических объектов относятся к числу фундаментальных проблем современной криобиологии. Интерес к данной проблеме возрастает по ряду причин, и прежде всего – его стимулируют практические задачи. В настоящее время все больше возникает вопросов о возможности жизни людей, животных и растений в условиях, необычных для нормального функционирования, – при высоких и низких температурах и давлении, повышенной радиации, высоких ускорениях, при недостатке воды, повышенном содержании солей и т. д.

В связи с этим особую значимость приобретает изучение реакции биологических объектов на действие экстремальных по мощности и характеру раздражителей. Велико значение этой проблемы для медицины и сельского хозяйства: альтерация клеточных элементов является одним из звеньев патологического процесса.

Исследование проблемы повреждения привлекает внимание и с теоретической стороны. Это позволит полнее вскрыть механизмы данного процесса. Криоповреждение представляет собой частную форму реакции биологических объектов в ответ на действие температурных факторов среды.

В такой сложной и взаимосвязанной системе, каковой является геном животных, нарушение какой-нибудь одной части, какого-либо элемента или структуры не может оставаться ограниченным, оно, как правило, должно передаваться на другие части и генерализовываться, подчиняясь закономерностям повреждения биологических объектов [19]. Поэтому становится понятным, что при действии повреждающих факторов в процессе криоконсервации изменения свойств гамет обычно должны быть многосторонними и проявляться в разнообразных нарушениях морфологического, физиологического, биохимического и биофизического характера. Вместе с тем, нарушение функциональной активности гамет является наиболее демонстративным и наиболее доступным для исследователя.

Криоповреждения имеют место на всех этапах технологической обработки семени. Однако на температурной шкале существуют критические зоны [25]. Так, исследования температуроиндуцированных структурных переходов на водно-липидной поверхности мембран [26] позволили обнаружить перестройки водно-белковых взаимодействий при температурах 30, 25, 17 и 7 °С. При этом, эти взаимодействия происходят как на внешней поверхности белков, доступной свободному растворителю, так и в полостях биомакромолекул, обусловленных третичной структурой, а также контактами субъединиц в олигомерных ансамблях белков. Аналогичные температурные зоны определены [27] при изучении механизмов стабилизации нативной конформации водорастворимых белков.

Кроме того, существуют силы притяжения, обусловленные гидратацией, причем они гораздо значительнее дисперсионных сил и обладают большей специфичностью. Поверхность мембраны возмущает структуру воды на расстояниях вплоть до нескольких сот пикометров. Для удаления этой воды требуется затратить очень большое количество энергии, что приводит к экспоненциальной зависимости «гидратационных сил» от расстояния между взаимодействующими системами. Специфичность биохимических ассоциаций, например – ассоциаций между белковыми молекулами, зависит не только от взаимодействия между белками, но в значительной мере еще и от взаимодействия поверхности белка с молекулами воды [28].

Анализ, обобщение результатов фундаментальных исследований и проведенных нами экспериментов позволяют выдвинуть положение, согласно которому криоповреждения сперматозоидов различных видов животных носят многофакторный характер и имеют место за счет общих (неспецифических) и частных (специфических) реакций. При этом ведущими механизмами криоповреждения являются видоспецифические реакции, в основе которых лежат нарушения межмолекулярных взаимодействий, в частности – белок-белковых.

Выявленная зависимость межмолекулярных взаимодействий цитоскелета, в смысле белок-белковых, от уровня их фосфорилирования позволила Сторожку С.А. и др. [29] утверждать о наличии предопределяющего звена регуляции механических характеристик мембран, какими являются их стабильность и деформабильность, опосредованной изменением активности протеинкиназных систем клетки.

Стабильность и лабильность биологических мембран во многом зависят от жесткости цитоскелета, обусловленной межмолекулярными взаимодействиями его компонентов [29].

Снижение температуры приводит к полимеризации белков, сопровождающейся появлением деформации мембран, чему способствуют процессы фосфорилирования, которые активируются в процессе криоконсервации [19].

Так как основными компонентами биомембран являются белки и липиды, исследование их криогенных изменений представляет большой интерес. Анализ спектра собственной флюоресценции периферических и интегральных белков показал, что он обладал одинаковой направленностью и необратимым характером [30]. При этом белки цитоскелета рассматриваются как центральный механизм, обеспечивающий стабильность клеток [19].

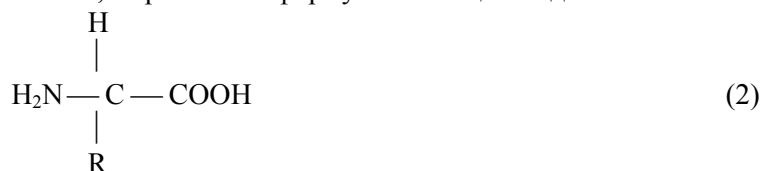
В повреждении биологических структур на этапе низкотемпературного консервирования важное значение имеет нарушение белково-липидных взаимодействий [16, 30]. В связи с этим вызывает интерес как определение степени криоповреждений белков в зависимости от их окружения и локализации в липидном бислое, так и выяснение роли мембранных белков в реакции клеточных структур на криовоздействие в целом.

Общую структуру белков можно выразить следующим образом:



где $\text{R}^1 \dots \text{R}^n$ – аминокислоты, соединенные характерной для белков пептидной связью;

α - аминокислоты, из которых строятся белки, выражаются формулой в общем виде



где R - тип боковой группы.

В α -аминокислотах амино- и карбоксильная группы ковалентно связаны с одним атомом углерода, C^α -атомом, в отличие от β , γ и δ -аминокислот, где они разделены несколькими валентными связями.

Порядок расположения остатков в полипептидной цепи представляет собой аминокислотную последовательность (рис.1). Принято считать, что направление полипептидной цепи соответствует направлению от аминного (N-) к карбоксильному (C-) концу. Полипептидная цепь состоит из остова (основная цепь) и боковых радикалов (боковые цепи), которые присоединяются к C^α -атомам.

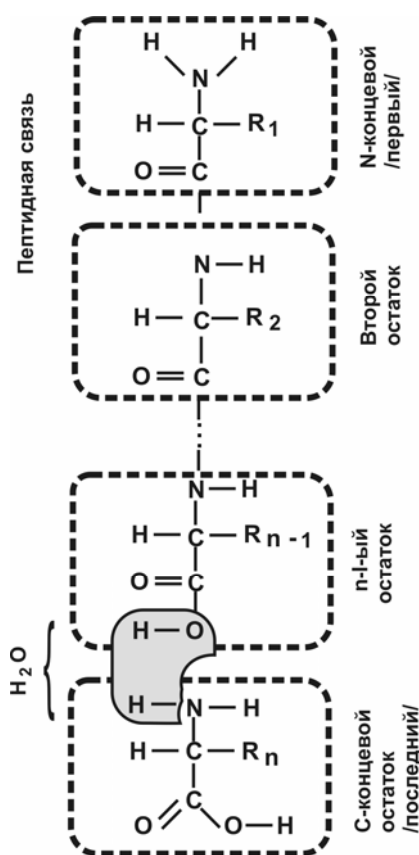


Рис.1. Схема образования полипептидной цепи.

В белках различают ряд структур.

- *Первая структура* (последовательность аминокислот в полипептидных цепях) вместе с другими ковалентными связями (как S-S и диэфирфосфорной кислоты) составляет скелет молекулы.

- *Вторичная структура* образуется геликоидальным закручиванием белков и стабилизируется водородными мостиками между амидными связями (CONH) цепи. Образующаяся конфигурация – плоская. В так называемой α -спиральной конфигурации кератин представляет 3-7 остатков аминокислот для каждого оборота, причем каждый остаток соответствует 1,47 Å передаче вдоль центральной оси.

- *Третичная структура* обязана своим происхождением взаимодействию сил Ван-дер-Ваальса, скоплению гидрофобных боковых цепей ввиду взаимного отталкивания растворителя, некоторых связей S-S между цепями и особым водородным мостиком, существующим между группами OH тирозина или между аминогруппами лизина (другими электроотрицательными группами вдоль цепи). Они обуславливают глобулярную или фибриллярную и другую форму в растворе.

Конкуренция между аминокислотными остатками и молекулами воды за водородные связи и влияние гидрофильных и гидрофобных участков белковой молекулы на структуру воды в ближайшем их окружении делают взаимоотношения между нею и водой важнейшим фактором, определяющим стабильность белковой макромолекулы [31].

В настоящее время полагают, что стабилизация, обеспечиваемая ассоциацией неполярных групп внутри молекулы белка, определяется не столько вандерваальсовыми взаимодействиями, сколько фактом того, что неполярные группы, становясь доступными воде, оказываются причиной неблагоприятной потери энтропии системы, по крайней мере – при низких температурах.

Некоторые типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру белка, представлены на рисунке 2.

- *Четвертичная структура* представляет собой объединение нескольких полипептидных субъединиц, обладающих своей определенной структурой, в единую молекулу [32].

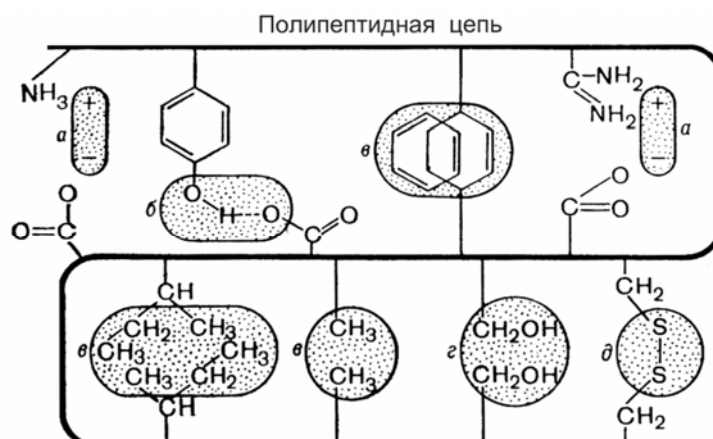


Рис.2. Типы нековалентных связей, стабилизирующих структуры белка.

а – электростатическое взаимодействие; б – водородная связь; в – гидрофобные взаимодействия неполярных групп; г – диполь-дипольные взаимодействия; д – дисульфидная (ковалентная) связь.

При изучении белок-белковых взаимодействий типичны большие значения энтальпии и энтропии. В то время как изменения энтальпии и энтропии характеризуются очень большой зависимостью от температуры, изменение свободной энергии Гиббса в процессах с участием белков остается почти постоянным в широком диапазоне температур. Энтальпийный фактор обычно оказывается преобладающим в реакциях ассоциации при высоких температурах, тогда как при низких температурах более важное значение имеет энтропийный фактор. В некоторых взаимодействиях с участием белков важная роль принадлежит конфигурационной энтропии [28].

Большинство чрезвычайно важных свойств белков обусловлены слабыми невалентными связями, участвующими в межмолекулярных взаимодействиях биополимеров. Энергия этих взаимодействий на один-три порядка меньше энергии ковалентного связывания, однако их многочисленность придает высокую прочность белковым молекулам.

На межбелковые взаимодействия существенное влияние оказывают ионы кальция, которые меняют характер межмолекулярных взаимодействий, направленных на стабилизацию мембранных структур [29, 33-35].

Существенным фактором стабилизации пространственной структуры белков является взаимодействие белковой молекулы с водным окружением [29]. Появление неполярных групп в водной среде приводит к упорядочиванию воды, которая формирует вокруг них регулярные структуры типа квазиполимерной и квазикристаллической льдоподобной решетки, понижая энтропию и увеличивая свободную энергию системы неполярная группа – вода. Таким образом, взаимодействие неполярных групп с водой энергетически менее выгодно, нежели их взаимодействие одна с другой.

Способность неполярных групп ассоциироваться, уменьшая контакты с водой, получила название *гидрофобного эффекта*. Благодаря такому эффекту молекула белка предпочитает сворачиваться в глобулу, на поверхности которой локализованы преимущественно гидрофильные радикалы, а внутри располагается гидрофобное ядро.

Иногда полярные боковые группы белков погружены внутрь глобулы, образуя водородные связи, а отдельные неполярные группы располагаются на поверхности с образованием так называемых “гидрофобных кластеров”, играющих важную роль при взаимодействии с другими белками или липидными участками мембран.

Аминокислотные остатки, входящие в состав белков, по их предрасположенности к локализации внутри или на поверхности глобулы можно разделить на три основных класса: *гидрофобные*, *гидрофильные* и *амбивалентные*. В результате анализа известных пространственных структур белков или сопоставления значений свободной энергии переноса аминокислотного остатка из воды в органический растворитель (например, в этиловый спирт), свойства которого близки к свойствам внешней части белка, можно получить детальную шкалу гидрофобности [36].

Согласно [37], для анализа роли различных взаимодействий между группами атомов в зависимости от их удаленности один от другого по валентной цепи удобно выделить пять классов взаимодействий: *внутриостаточные, локальные, ближние, средние и дальние* (рис.3).

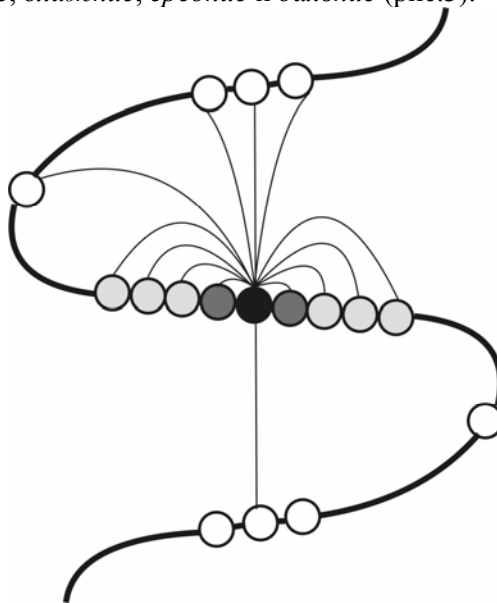


Рис.3. Межмолекулярные взаимодействия в белках.

К *внутриостаточным* относят все взаимодействия между атомами, принадлежащими структурной единице, состоящей из двух смежных пептидных групп и боковой цепи, присоединенной к общему C^{α} -атому.

Взаимодействия атомов данного аминокислотного остатка с ближайшим соседним остатком по валентной цепи со стороны N- или C-конца есть *локальные* взаимодействия. Под *ближними* принято подразумевать взаимодействия остатка с четырьмя предыдущими и четырьмя последующими остатками в аминокислотной последовательности. Взаимодействия между остатками, разделенными по валентной цепи как минимум четырьмя, но не более чем двадцатью остатками, относят к *средним* взаимодействиям. Все заряженные группы молекулы белка взаимодействуют друг с другом на достаточно больших расстояниях в соответствии с обычной обратной зависимостью от расстояния. В случае, когда все заряженные группы расположены на поверхности белковой молекулы, а сама молекула имеет сферическую форму, суммарная электростатическая свободная энергия $F_{\text{элек}}$ может быть весьма приближенно оценена на основе теории Дебая-Хюккеля. Если молекула денатурированного белка отличается по размерам, форме и характеристикам зарядов от молекулы нативного белка, то значения электростатической свободной энергии обоих белков будут различаться между собой и процесс денатурации оказывается связанным с изменением электростатической свободной энергии. При крайних значениях pH, когда молекула белка несет высокий суммарный заряд, указанное изменение электростатической свободной энергии должно благоприятствовать образованию денатурированной формы, так как в этом состоянии заряженные группы будут в среднем разделены большими расстояниями и силы отталкивания будут более слабыми. Эти взаимодействия с другими, более удаленными по цепи аминокислотными остатками считаются *дальними* взаимодействиями [37].

Вполне понятно, что такая классификация не является единственной. Известны и другие классификации [38], (рис.4).

Среди них следует отметить классификацию, которая выделяет взаимодействия между атомами остова, остова и боковых цепей или между атомами, принадлежащими разным боковым цепям. Они так и получили соответствующие названия: взаимодействия *остов-остов*, *остов-боковой радикал*, *боковой радикал-боковой радикал*. Взаимодействия остов-остов определяют общие конформационные возможности полипептидного остова. Взаимодействия остов-боковой радикал – более тонкий механизм регулирования структурной организации, учитывающий взаимное влияние основной и боковой цепи и проявляющийся в дифференциации локальных стерических условий полипептидной

цепи. Взаимодействия боковой радикал-боковой радикал относятся к так называемым специфическим взаимодействиям. Именно благодаря им осуществляется юстировка полной пространственной структуры белковой молекулы.

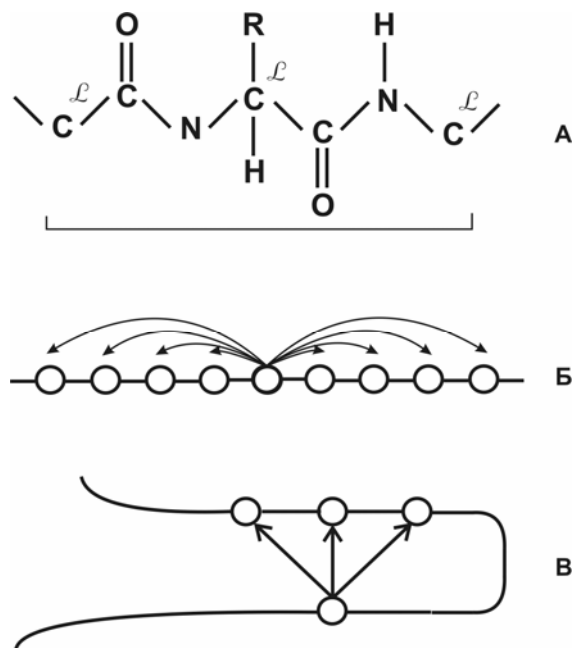
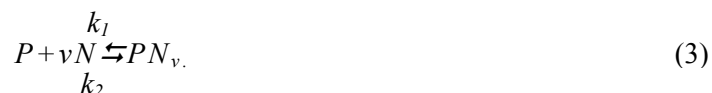


Рис.4. Ближние (А), средние (Б) и дальние (В) взаимодействия в белках.

Внутриостаточные, локальные, ближние, средние и дальние взаимодействия играют различную роль в формировании пространственной структуры белков. Благодаря внутриостаточным взаимодействиям часть конформационного пространства остова, определяемая углами φ и ψ , а также конформационного пространства бокового радикала, задаваемого углами χ , оказывается запрещенной, т.е. эти взаимодействия ограничивают конформационную свободу. Исследование внутриостаточных взаимодействий позволяет отбросить маловероятные конформационные состояния.

Согласно данным Мартин Р. [39], который исследовал взаимодействующие системы, взаимодействия между молекулами одного белка, молекулами различных белков и небольшими ионами характеризуются различными константами скорости. Поскольку измерение скорости диффузии, ультрацентрифугирование и электрофорез требуют для получения желаемой информации сравнительно много времени (порядка нескольких часов), такое взаимодействие в той или иной мере, в зависимости от соотношения различных констант скорости, может сказаться на результатах эксперимента.

Общее уравнение обратимой реакции молекулы белка P с ν молекулами произвольного соединения N (это могут быть молекулы того же белка, какие-либо другие макромолекулы или небольшие ионы или молекулы) имеет вид:



Далее предлагаем рассмотреть отдельно несколько случаев, характеризующихся различными относительными значениями констант скоростей реакций k_1 и k_2 .

1. При $k_1 \ll k_2$ количество образующегося комплекса крайне незначительно или он вовсе не образуется. Система состоит из невзаимодействующих компонентов.

2. При $k_1 \gg k_2$ комплекс образуется в значительных количествах, и система состоит из двух компонентов – комплекса и избыточного количества реагентов. Если избытка исходных соединений нет, в системе присутствует один лишь комплекс и при электрофорезе наблюдается одна-единственная граница, соответствующая этому комплексу.

3. Если значения k_1 и k_2 близки по величине и малы по сравнению со скоростью разделения при электрофорезе, в системе имеются три компонента – оба реагента и комплекс. Необходим внимательный контроль, поскольку система в начальный момент может не находиться в равновесном состоянии.

4. Если k_1 и k_2 велики по величине, равновесие в системе будет восстанавливаться со скоростью, значительно превосходящей скорость разделения.

5. Если скорость реакции и разделения сравнимы между собой (случай, промежуточный между случаями 3 и 4), наблюдаемая электрофореграмма зависит от скорости разделения.

На поверхности раздела между воздухом и водным раствором белка образуется поверхностная пленка, в которой белковые молекулы в значительной степени денатурированы. Их пептидные цепи развернуты и образуют слой толщиной 1 мкм, причем гидрофильные (имеющие сродство к воде) боковые группы ориентированы в сторону водной фазы, а гидрофобные (не взаимодействующие с водой) группы направлены в сторону воздушной фазы. То же самое происходит и на поверхности раздела масло-вода. Понятно, что для глобулярных белков подобное развертывание должно сопровождаться большими изменениями в третичной и четвертичной структурах, ибо при этом все сегменты пептидной цепи должны быть уложены на поверхности раздела в слой толщиной 1 мкм. Отсутствует информация, насколько такая денатурация затрагивает вторичную структуру (иначе говоря, в какой мере изменяется количество альфа-спиралей). Однако там, где гидрофильные и гидрофобные группы чередуются, следует, по-видимому, ожидать полного развертывания цепи. Если же большая часть гидрофильных групп находится с одной стороны альфа-спирали, а большинство гидрофобных групп - с другой, то альфа-спиральная конфигурация должна сохраниться на поверхности раздела. По предположению Д. Хаггиса и др. [40], в целом на поверхности раздела – подобно тому, что имеет место в субъединицах глобулярных белков, часть цепи имеет альфа-спиральную, а часть – какую-то более случайную конфигурацию. Развертывание глобулярного белка, сопровождающееся полным изменением третичной структуры, схематически изображено на рис.5.

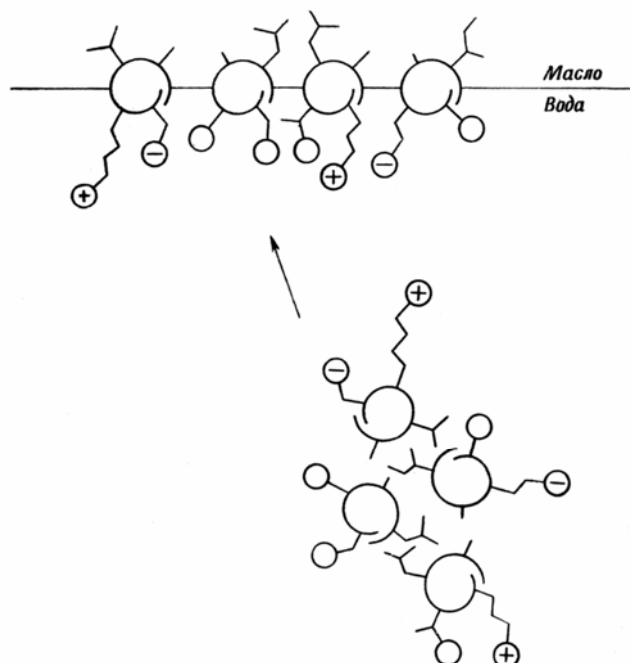


Рис.5. Схема развертывания молекулы белка на поверхности раздела масло-вода и воздух-вода.

Белковая молекула представлена в виде α -спиралей. Схема показывает тип развертывания глобулярной белковой молекулы, который позволяет уложить молекулу в слой толщиной 1 мкм; при этом гидрофобные (углеводородные) группы находятся преимущественно в воздушной или масляной фазе, а гидрофильные ($-O$, $-\oplus$, $-\ominus$) – преимущественно в водной фазе. Пептидные цепи развернутой молекулы изображены в виде α -спиралей; это согласуется с результатами экспериментов Малькольма, выполненных на пептидах со специфическим аминокислотным составом. В какой степени при таком развертывании глобулярного белка сохраняется α -спиральная структура, фактически не известно. На схеме для наглядности все углеводородные боковые группы размещены в масляной фазе или внутри глобулярной молекулы белка, а все полярные группы – в водной фазе. В действительности тенденция к разделению гидрофильных и гидрофобных боковых цепей никогда в полной мере не осуществляется.

На уровне ди- и трипептидов формируются различные типы локальной кривизны полипептидного остова. При этом основными направляющими силами, кроме внутриостаточных взаимодействий, являются локальные взаимодействия, которые формируют потенциальную предрасположенность к появлению определенного типа локальной кривизны. Выбор структуры определенного типа осуществляется преимущественно благодаря ближним взаимодействиям. Но это необязательно, поскольку некоторая часть молекулы может сворачиваться однозначно, в то время как другая часть должна комплементарно к ней пристраиваться благодаря средним и дальним взаимодействиям. Важная роль средних и дальних взаимодействий проявляется при формировании различных элементов супервторичных структур: α -, β -, $\alpha\beta$ - и $\beta\alpha$ -шпилек, $\alpha\alpha$ -углов (включающих α -спирали, β -участки и перетяжки), а также различных типов супервторичных структур.

Локальные и ближние взаимодействия формируют конформационно жесткие фрагменты полипептидной цепи и намечают лабильные участки, вариации которых позволяют комплементарно пристраивать друг к другу разные части молекулы усилиями средних и дальних взаимодействий [37].

Таким образом, в компактных структурах олигопептидов имеет место согласованность между всеми ближними, средними, дальними, внутриостаточными и локальными межмолекулярными взаимодействиями.

Наиболее общий вывод, исходя из специальной литературы, заключается в том, что в фазовых переходах принимают участие как белки, так и липиды с самым различным вкладом этих компонентов для разных мембран и температур, но с обязательным взаимовлиянием липид-белковой или белок-липидной генерализации [41]. Белки не только принимают участие в термических структурных перестройках биологических мембран, но и способны выступать в роли их триггера [6, 17, 19, 42].

Так как в молекуле белков существует большое количество связей и разнообразных взаимодействий [43] (рис.6) и в связи с исключительной их ролью в обеспечении функционирования гамет, особую значимость приобретают исследования этих биополимеров при криоконсервации.

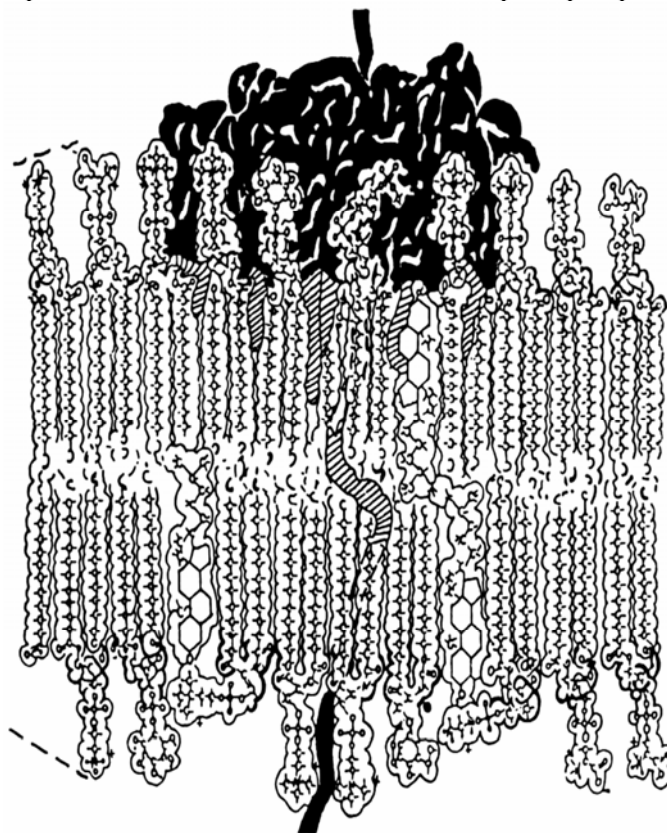


Рис.6. Локализация мембранных компонентов.

Схема-модель предполагаемой локализации белковых субъединиц малого молекулярного веса (черное), осуществляющих полярные и аполлярные (косые линии) взаимодействия с липидным монослоем мембраны. Гидрофобный участок (спиралевидный) субъединицы белка (или гликопротеида) прошивает жирнокислотную область липидного бислоя мембраны с выходом рецепторного участка на ее противоположную гидрофильную поверхность.

В процессе замораживания и оттаивания они существенно не меняются, могут иметь место конформационные изменения, количественные и качественные изменения отдельных белковых фракций.

Белковые фракции определяли экспресс-методом по Олл-Маккорду. Принцип метода основан на свойстве фосфатных растворов различной концентрации осаждать белки. Величину оптической плотности растворов определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 750 нм. Содержание отдельных фракций определяли в грамм-процентах. Принимая количество общего белка за 100 и зная количество каждой фракции, проводили расчет содержания белковых фракций в процентах (табл. 1-2).

Таблица 1

Белковый спектр нативного и оттаянного семени быка

Наименование	Цельное семя	%	Оттаянное семя	%
	M ± m		M ± m	
Плазма, мг/мл				
Альбумины	3,6 ± 0,26	13,5	13,7 ± 2,84*	35,8
Альфа-глобулины	18,2 ± 1,84	68,7	17,2 ± 0,84	44,9
Бета-глобулины	2,0 ± 0,40	7,6	4,0 ± 1,48	10,5
Гамма-глобулины	2,7 ± 0,18	10,2	3,4 ± 1,48	8,8
Всего	26,5 ± 1,91	100	38,3 ± 3,63	100
Гаметы, г/млрд				
Альбумины	5,1 ± 1,48	14,4	12,8 ± 7,92	49,7
Альфа-глобулины	7,6 ± 4,0	21,6	4,0 ± 1,13	15,6
Бета-глобулины	5,8 ± 1,27	16,4	2,5 ± 1,15	9,7
Гамма-глобулины	16,8 ± 3,27	47,6	6,5 ± 1,73*	25,0
Всего	35,7 ± 5,52	100	25,8 ± 8,27	100
Итого, плазма+гаметы	61,8 ± 5,84		64,1 ± 9,03	

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с цельным семенем.

Таблица 2

Белковый спектр нативного и оттаянного семени петуха

Наименование	Цельное семя	%	Оттаянное семя	%
	M ± m		M ± m	
Плазма, мг/мл				
Альбумины	6,0 ± 2,45	47,8	4,8 ± 1,90	46,3
Альфа-глобулины	2,8 ± 0,88	22,1	1,5 ± 0,21	14,5
Бета-глобулины	3,8 ± 1,08	30,1	2,6 ± 0,50	25,0
Гамма-глобулины	0	0	1,5 ± 0,23	14,2
Всего	12,6 ± 2,82	100	10,4 ± 1,99	100
Гаметы, мг/млрд				
Альбумины	11,8 ± 0,47	54,3	2,1 ± 0,91*	9,6
Альфа-глобулины	2,7 ± 1,53	12,4	1,2 ± 0,12	5,5
Бета-глобулины	1,9 ± 1,85	9,0	0,6 ± 0,08	2,8
Гамма-глобулины	5,3 ± 0,70	24,3	17,9 ± 1,08*	82,1
Всего	21,7 ± 1,72	100	21,8 ± 1,42	100
Итого, плазма+гаметы	34,3 ± 3,30		32,2 ± 2,44	

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с цельным семенем.

Из данных таблиц 1 и 2 следует, что белковый спектр семени быка и петуха резко отличается. Если в плазме семени быка преобладают альфа-глобулины ($18,2 \pm 1,84$), а в гаметех – гамма-глобулины ($16,8 \pm 3,27$ мг/млрд), то в семени петуха, как в плазме, так и в гаметех, больше всего альбуминов ($6,0 \pm 2,45$ и, соответственно, $11,8 \pm 0,47$ мг/млрд). Отличительной особенностью белкового спектра является и то, что в гаметех петуха содержится намного меньше глобулинов, чем в гаметех быка (у петуха общее содержание альфа, бета и гамма-глобулинов составило $9,9 \pm 1,89$, а у быка - $30,2 \pm 5,32$ мг/млрд).

Изменения белкового спектра при криоконсервации носят специфический для каждого вида характер. И только количество альфа- и бета-глобулинов в гаметех быка и петуха при оттаивании одинаково уменьшается.

Процесс криоконсервации семени петуха, в отличие от такового быка, вызывает снижение количества альбуминов. Это может быть объяснено денатурацией белков, а именно – альбуминов.

Появление фракции гамма-глобулинов в оттаянной плазме семени петуха, резкое снижение содержания альбуминов в оттаянной плазме семени петуха, резкое снижение содержания альбуминов в гаметех позволяет отметить, что низкие температуры могут инициировать транслокацию, агрегацию и дезагрегацию белков. Конкретным проявлением этих нарушений может быть снижение вязкости фосфолипидного бислоя, что приводит к нарушению барьерных свойств плазматических мембран в цикле криоконсервации.

Проведенными исследованиями не были обнаружены криогенные изменения общего количества белков плазмы и сперматозоидов. Это свидетельствует о том, что как латеральные, так и трансмембранные белки (рис.7) обладают высокой криоустойчивостью по сравнению с липидами, независимо от их локализации в биологических мембранах (рис.8).

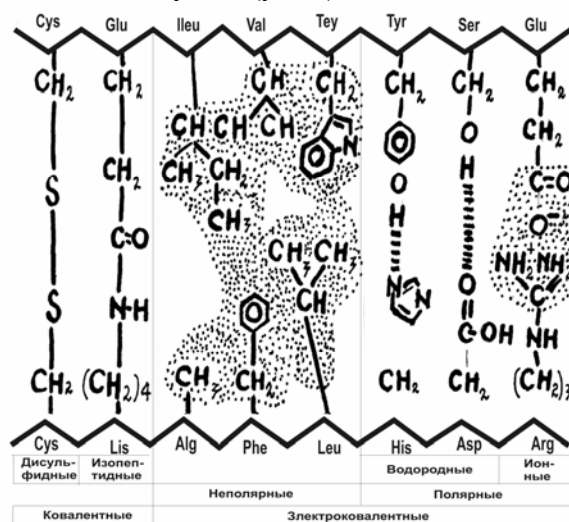


Рис.7. Типы связей и взаимодействий в белках (Леви, 1971).

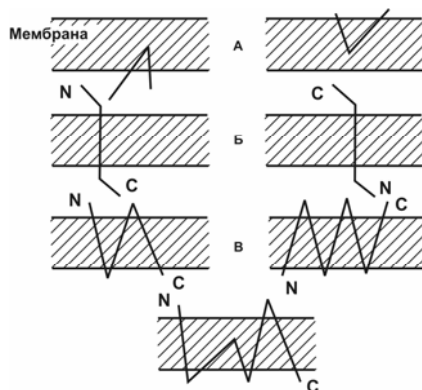


Рис.8. Локализация белков в биологических мембранах.

А – латеральная, Б,В – трансмембранная; А – монотопическая, Б – битопическая, В – политопическая. Указана локализация N- и C-концов.

Таким образом, хотя общее содержание белка семени животных при криоконсервации не изменяется (см. табл. 1-2), его белковый спектр претерпевает достаточно выраженные модификации. В процессе криоконсервации семени в его плазме изменения содержания альфа-, бета- и гамма-глобулинов специфичны для каждого вида животных, в то время как в гаметях динамика альфа-, бета- и гамма-глобулинов носит неспецифический характер [17].

При температурах ниже физиологических пределов возможны структурно-фазовые переходы как внутри биомакромолекул, так и в молекулярных ансамблях. Проведенные исследования на большом количестве белков искусственных и биологических мембран показали, что все переходы, наблюдаемые при температурах выше перехода воды в лед, носят обратимый характер. Переходы, наблюдаемые при более низких температурах, обычно носят необратимый характер [20]. Следовательно, при разработке новых приемов криозащиты биологических объектов необходимо стимулировать обратимые переходы и ограничивать необратимые переходы.

Литература:

1. Adabi S.G. et al. L.carnitine effects on quantity and quality of African black neck ostrich sperm // Journal of Veterinary and Animal Advance, 2008, vol.7, p.51-55.
2. Tamburrino Lara et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage // Asian Journal of Andrology, 2012, vol.14, p.24-31.
3. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при криоконсервации. - Ch.: Tipografia AȘM, 2008. - 633 с.
4. Levis Sheena E.M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? // Reproduction, 2007, vol.134, no.1, p.31-40.
5. Yamaguchi S. et al. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis // Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, vol.106, no.26, p.10859-10864.
6. Линник Т.П. и др. Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха // Проблемы криобиологии, 2010, том 20, № 1, с.34-46.
7. Turner R. M. Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation // Reprod Fert Develop., 2006, vol.18, p.25-38.
8. Сынчикова О.П. и др. Динамический анализ морфологических изменений эритроцитов в процессе гипертонического гемолиза // Проблемы криобиологии, 2002, №2, с.62-63.
9. Perdichizzi A. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. // J Clin Immunol., 2007, vol.27, p.152-162.
10. Leduc F. et al. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. // Biol Reprod., 2008, vol.78, p.324-32.
11. Фурдуй Ф.И. Физиологические механизмы стресса и адаптации при остром действии стресс-факторов. - Кишинев: Штиинца, 1986. - 240 с.
12. Ciochină V., Furdui V. Dezvoltarea fiziologiei și sanocreatologiei. Rezultate și perspective // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, 2006, nr.1, p.12-18.
13. Фурдуй Ф.И. Проблемы стресса и преждевременной биологической деградации человека. Санокреатология. Современные проблемы физиологии и санокреатологии. Их настоящее и будущее. - Ch.: Tipografia AȘM, 2005, p.16-35.
14. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Фурдуй В.Ф. Понятие здоровье – отправная точка санокреатологии: стресс, адаптация, функциональные нарушения и санокреатология. - Кишинев: Картя Молдовеняскэ, 1999, с.44-51.
15. Юрченко Т.Н. Охлаждение и адаптационные процессы в плотных тканях. // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тезисы Междунар. конф. - Харьков, 1988, с.96-97.
16. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991. - 200 с.
17. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. - Ch.: Tipografia AȘM, 2003. - 336 с.
18. Гулевский А.К. и др. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. - Киев: Наукова думка, 1988. - 208 с.
19. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. - Киев: Наукова думка, 1982. - 256 с.
20. Мойсеев В.А. Молекулярные механизмы криоповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. - Харьков, 1984. - 48 с.
21. Новиков А.Н., Пичугин Н.И., Линник Т.П. Влияние криопротекторов и ряда органических добавок на процесс рекристаллизации льда в модельных системах // Проблемы криобиологии, 1992, №2, с.20-21.

22. Катков И.И. Связь между состоянием мембранного аппарата спермиев и их физиологическими показателями после замораживания: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Харьков, 1985. - 24 с.
23. Zamfirescu S., Anghel A., Researches regarding the ultrastructural modifications of sperm cells before and after freezing in different media: *Lucrări științifice. Seria Zootehnie*, 2010, vol.53, nr.15, p.67-74.
24. Ortman K., Rodriquez-Martinez H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packed in plastic bags. // *J. Vet. Med. A.*, 1994, vol.41, no.1, p.37-47.
25. Малиновская В.А. Оптимальные режимы замораживания спермы быков в соломинках // *Современные методы воспроизводства и искусственного осеменения с-х животных*. - М., 1983, с.100-108.
26. Цымбал Л.В. и др. Исследование вода-белок-липидных взаимодействий в эритроцитах пойкилотермного организма // *Проблемы криобиологии*, 1995, №1, с.10-13.
27. Жуковский А.П. и др. Термолабильность структуры белков в нативном состоянии и механизм ее поддержания // *Биофизика*, 1987, том 32, №40, с.583-587.
28. Хобза П., Заградник Р. Межмолекулярные комплексы. - Москва: Мир, 1989. - 375 с.
29. Сторожок С.А. и др. Зависимость стабильности деформальности мембран от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета // *Научный вестник Тюменского государственного университета*, 2000, том 3, с.35-41.
30. Нардид О.А. и др. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов // *Физико-химические процессы в криобиологических системах*. - Харьков, 1991, с.102-106.
31. Александров В.Я. Клетки макромолекулы и температура. - Л.: Наука, 1975. - 330 с.
32. Ленинджер А. Основы биохимии. - Москва: Мир, 1985. Том 1. - 365 с.
33. Shiba K. et al. Ca^{2+} bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol.105, p.19312-19317.
34. Strünker T. et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. // *Nature*, 2011, vol.471, p.382-386.
35. Lishko P. V. et al. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. // *Nature*, 2011, vol.471, p.387-391.
36. Leo A. et al. Partition Coefficients and Their uses. // *Chemical Reviews*, 1971, vol.71, no.6, p.116-525.
37. Шерман С.А. и др. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. - Минск: Наука и техника, 1989. - 239 с.
38. Попов Е.М. Подход к решению проблемы структурно-функциональной организации природных пептидов // *Мол. биол.*, 1985, том 19, вып.4, с.1107-1137.
39. Мартин Р. Введение в биофизическую химию. - М.: Мир, 1986. - 431 с.
40. Хаггис Д. и др. Введение в молекулярную биологию. - Москва: Мир, 1967. - 436 с.
41. Stevanovic J. et al. Some quantitative and qualitative characteristics of serum lipoproteins in bovine seminal plasma // *Acta. Vet.*, 1997, vol. 47, no.4, p.187-193.
42. Graham L.A. et al. Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites. // *Biochemistry*, 2008, vol.47, no.7, p.2051-2063.
43. Боровягин В.А. Об интерпретации данных методов электронной микроскопии в изучении структурной организации модельных и биологических мембран // *Биофизика. Итоги науки и техники. ВИНТИ*. - М., 1975, том 4, с.226-307.

Prezentat la 15.06.2012