

ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕПТИДІВ

Л. А. Рогоза¹

О. О. Богатирьова¹

Т. С. Дюбко¹

А. Л. Татарець²

Є. А. Поврозін²

С. Є. Гальченко¹

В. П. Сандомирський¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

²ДНУ «НТК Інститут монокристалів НАН України»,
Харків

E-mail: liliyarogoz@gmail.ru, tatarets@isc.kharkov.com

Отримано 16.11.2012

Метою роботи було з'ясувати можливість використання зондів E-176, K8-3000 і K8-1300 для дослідження специфічності складу пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят і їх взаємодії з альбуміном сироватки крові. У роботі було застосовано безпротеїнові екстракти кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят, селезінки свиней, а також серця статевозрілих свиней та новонароджених поросят.

Титрування екстрактів дослідженими зондами виявило відмінності у здатності пептидів, які входять до їхнього складу, зв'язувати зонди, що відображає тканинну специфічність пептидного складу препаратів.

Додавання екстрактів до розчину альбуміну спричинювало гасіння власної флуоресценції альбуміну і впливало на стан триптофанових залишків протеїну.

Досліджені зонди виявляють високу чутливість до взаємодії з альбуміном сироватки крові речовин пептидної природи і тому можуть набути застосування як нові флуоресцентні зонди в медико-біологічних дослідженнях. Оскільки флуоресценція зазначених зондів збуджується в довгохвильовій ділянці спектра, це дає змогу в разі їх використання зменшити артефакти, що їх вносять хромофорні групи біомакромолекул, які поглинають у видимій ділянці.

Ключові слова: флуоресцентні зонди, екстракти органів, пептиди, альбумін.

Флуоресцентні методи вивчення структури і функцій протеїнів та пептидів набули широкого застосування в біологічних дослідженнях [1–5]. Попереднє тестування нових флуоресцентних зондів (E-176 і K8-3000), які випромінюють в жовто-зеленій ділянці спектра, виявило високу чутливість їх спектрів флуоресценції до присутності в розчині альбуміну. Зонд K8-1300 було запропоновано для практичного застосування з метою дослідження олігонуклеотидів та інших низькомолекулярних біомолекул [6, 7].

З огляду на це вважали за доцільне більш докладно вивчити взаємодію цих зондів з альбуміном і з'ясувати можливість їх використання для оцінки виконання цим протеїном однієї зі своїх основних функцій — сорбції та подальшого транспортування

в руслі крові різних біомолекул, зокрема низькомолекулярних пептидів.

Показано, що пептиди з високою біологічною активністю, які входять до складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів і тканин [8, 9], взаємодіють як з альбуміном сироватки крові донорів, так і з розчинним ізольованим альбуміном, призводячи до зміни конформації молекули цього протеїну [10, 11]. Проте для конкретизації механізмів цієї взаємодії необхідні додаткові дослідження із залученням альбумін-специфічних флуоресцентних зондів, які дають змогу оцінити здатність альбуміну зв'язувати пептиди.

Метою роботи було з'ясувати можливість використання зондів E-176, K8-3000 і K8-1300 для дослідження пептидів в екстрактах

кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят та вивчення їх взаємодії з альбуміном сироватки крові.

Матеріали і методи

У роботі використовували сироватковий альбумін людини (САЛ) (Sigma, США). Розчини САЛ (у концентрації 0,2 і 6,7 мг/мл) готували на натрійфосфатному буфері, pH 7,2.

Сироватку крові здорових донорів (5 зразків) для спектральних досліджень розводили натрійфосфатним буфером у 40 разів. Середній вміст альбуміну в сироватці становив 0,2 мг/мл.

Екстракти кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят (ЕШНП), селезінки свиней (ЕСС), серця статевозрілих свиней (ЕСЦС) та новонароджених поросят (ЕСЦП), що не містять протеїну, одержували згідно з методом [12]. Експерименти проводили на 5–6 незалежно одержаних екстрактах з початковим вмістом пептидів 100 мкг/мл.

У дослідженнях використовували флуоресцентні зонди К-35, Е-176, К8-3000 і К8-1300, синтезовані в ДНУ «НТК Інститут монокристалів НАН України» (Харків). Для проведення досліджень зонди К-35 і Е-176 готували у вигляді спиртових розчинів, а К8-3000 і К8-1300 розчиняли у двічі дистильованій воді.

Спектри збудження і флуоресценції зразків записували в стандартних односантиметрових кварцових кюветах на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian) і коригували з урахуванням спектральної чутливості приладу. Ширина вхідної і вихідної щілин монохроматорів становила 5 нм. Для усунення ефекту концентраційного гасіння зразки розводили так, щоб їх абсорбція на довжині збудження флуоресценції дорівнювала приблизно 0,1. Спектри флуоресценції зондів збуджували в ділянці максимуму довгохвильової смуги поглинання. Для оброблення та візуалізації спектрів застосовували програму Microcal Origin 6.0. Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом MANOVA. Розрахунок показників виконували за допомогою програми SPSS Statistics 17.0.

Результати та обговорення

Передусім провели дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей зондів Е-176, К8-3000 і К8-1300, оцінювання їх у водно-сольовому середовищі (фосфатний буфер) та розчині САЛ. Для порівняння було

обрано відомий зонд К-35, який використовують для вивчення властивостей альбуміну [11, 13].

Результати титрування протеїну зондами К8-3000 і Е-176 показали, що характерною особливістю зонда Е-176 є те, що інтенсивність його флуоресценції за зв'язування з протеїном збільшується майже в 30 разів, а максимум спектра флуоресценції зміщується в короткохвильову ділянку на 26 нм. Інтенсивність спектра флуоресценції зонда К8-3000 в розчині альбуміну збільшується в 15 разів, а спектр флуоресценції зміщується на 7 нм також у короткохвильову ділянку. Одержані результати свідчать про те, що обидва ці барвники досить перспективні для застосування їх як флуоресцентних зондів для дослідження пептидів.

Зонд К8-1300 є найбільш довгохвильовим. Максимум його флуоресценції (у воді близько 683 нм) за зв'язування з протеїном (залежно від концентрації протеїну) поступово зміщується до 694–705 нм. У разі зв'язування із САЛ цей зонд здатен збільшувати інтенсивність флуоресценції до 5 разів і тому може мати застосування як довгохвильовий флуоресцентний зонд.

Присутність біологічних молекул по-різному впливає на інтенсивність флуоресценції досліджуваних зондів (рис. 1). Титрування екстрактів зондами виявляє також відмінності у здатності пептидів, які входять до їхнього складу, зв'язувати зонди. Найбільшу чутливість до індивідуальних властивостей пептидів в екстрактах виявив зонд Е-176. Ця особливість дозволяє рекомендувати його як зонд для дослідження речовин пептидної природи, що, однак, не виключає можливості застосування із цією метою й інших зондів.

Як еталон для оцінювання здатності альбуміну зв'язувати пептиди, що містяться в екстрактах, використовували відомий альбумінспецифічний флуоресцентний зонд К-35, параметри зв'язування і локалізації центрів зв'язування на молекулі альбуміну для якого було визначено раніше [11].

Додавання екстрактів до розчину альбуміну суттєво впливало на спектральні характеристики протеїну, зокрема викликало гасіння власної флуоресценції альбуміну ($\lambda_{\text{збудж}} = 280$ нм), та на стан триптофанових залишків протеїну ($\lambda_{\text{збудж}} = 296$ нм).

Максимуми спектрів флуоресценції (параметр $\lambda_{\text{макс}}$) зонда К-35 у розчині альбуміну, в сироватці крові, а також з додаванням екстрактів істотно не відрізняються. Водночас квантовий вихід флуоресценції

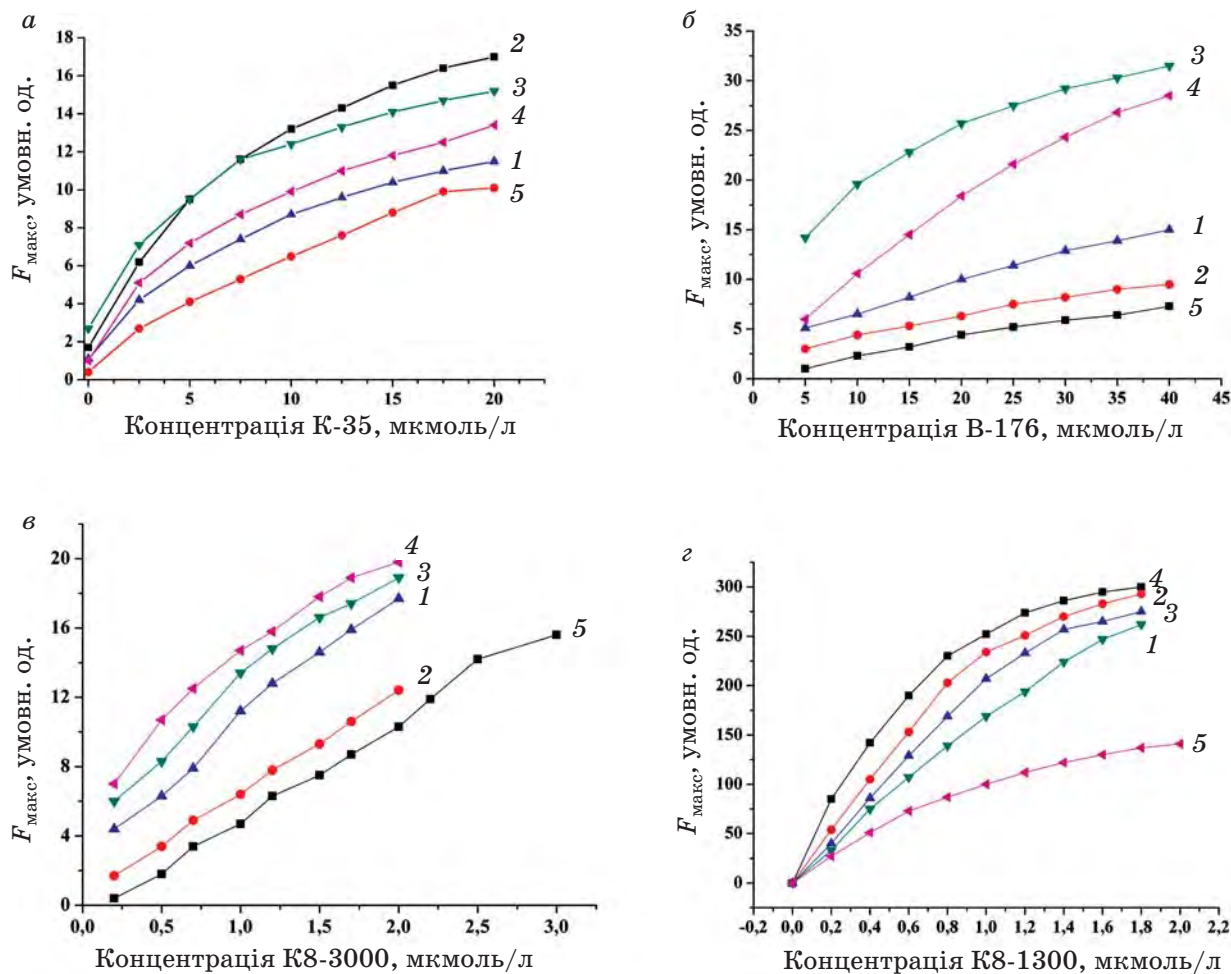


Рис. 1. Інтенсивність флуоресценції зондів: К-35 (а), В-176 (б), К8-3000 (в) і К8-1300 (г) в ЕШНП (1), ЕСС (2), ЕСцС (3), ЕСцП (4) та буфері (5)

цього зонда в екстрактах у декілька разів нижчий, ніж у розчині САЛ або в сироватці.

Для дослідження впливу екстрактів на зв'язування флуоресцентних зондів з альбуміном було проведено титрування зондами сироватки крові й розчину САЛ у присутності екстрактів. Контролем у цих експериментах слугували зразки сироватки і САЛ без додавання екстрактів. Титрування зондом К-35 сироватки крові (рис. 2, а), серед пептидів якої близько половини (47–65%) припадає на альбумін [14, 15], показало, що найбільший ефект взаємодії К-35 із сироватковим альбуміном виявляють ЕСцС і ЕСцП. Аналогічний за ефективністю дії вплив справляли екстракти і на зв'язування К-35 з ізолюваним САЛ (рис. 2, б).

Одержані результати можна розглядати як непрямий доказ того, що флуоресцентний зонд К-35 і складові екстрактів мають загальні центри зв'язування на молекулі сироваткового альбуміну. Разом з тим виявлено відмінності у взаємодії К-35 з розчи-

ним САЛ і альбуміном сироватки крові. Вони полягають у тому, що, на відміну від сироватки, взаємодія компонентів екстрактів з очищеним САЛ призводила до збільшення інтенсивності флуоресценції, а отже, і до збільшення зв'язування флуоресцентного зонда з протеїном (рис. 2, б).

Тим часом близький за хімічною будовою і спектральними характеристиками до зонда К-35 зонд В-176 виявляв більшу чутливість залежно від органа, з якого одержано екстракт (рис. 3). Положення його спектрів залежить від екстракту, що, ймовірно, відображає ступінь гідрофобності біомолекул, які входять до складу екстрактів.

Таким чином, флуоресценція зондів К-35 і В-176, зв'язаних із компонентами екстрактів, практично не заважає реєстрації спектрів флуоресценції цих зондів, зв'язаних з альбуміном у присутності екстрактів. Водночас, для зондів К8-3000 і К8-1300 разом з положенням спектрів в екстрактах, близьких до аналогічних показників в сиро-

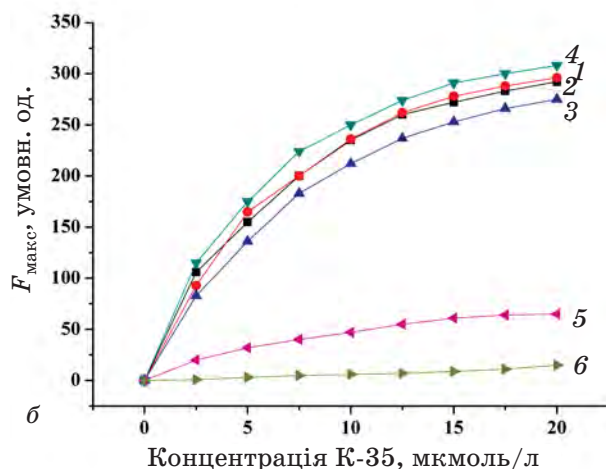
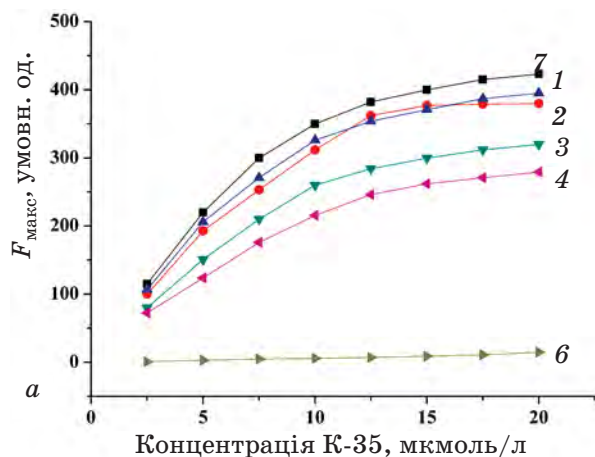


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції під час титрування зондом К-35 сироватки крові (а) і розчину САЛ (б), в які додано: 1 — ЕШНП; 2 — ЕСС; 3 — ЕСцС; 4 — ЕСцП; 5 — К-35 у розчині САЛ, 6 — К-35 у буфері; 7 — К-35 у сироватці крові

ватці і розчині САЛ, спостерігається значна інтенсивність флуоресценції в екстрактах (і, відповідно, більший квантовий вихід), що досягає 15–20% від інтенсивності їх флуоресценції в біологічних розчинах (рис. 1). Ця обставина свідчить про необхідність враховувати вплив флуоресценції зазначених зондів в екстрактах під час аналізу їх зв'язування з альбуміном.

Для оцінювання чутливості нових зондів К8-3000 і К8-1300 до зміни структури САЛ під впливом екстрактів було проведено титрування сироватки крові цими зондами. Як випливає з рис. 4 і 5, обидва зонди чутливі до зв'язування складових екстрактів з альбуміном. При цьому інтенсивність гасіння флуоресценції К8-3000 екстрактами дещо перевищує аналогічний показник для зонда К8-1300. Одержані дані дають підстави при-

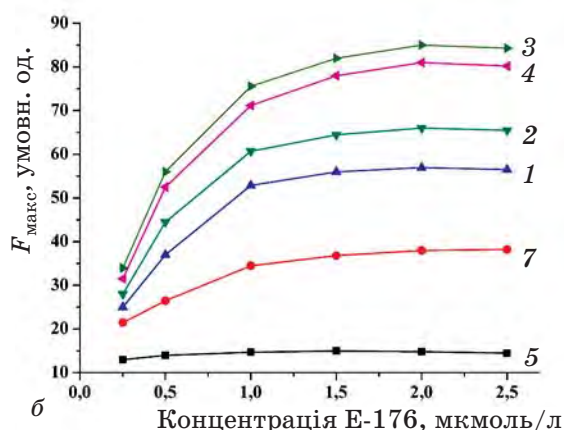
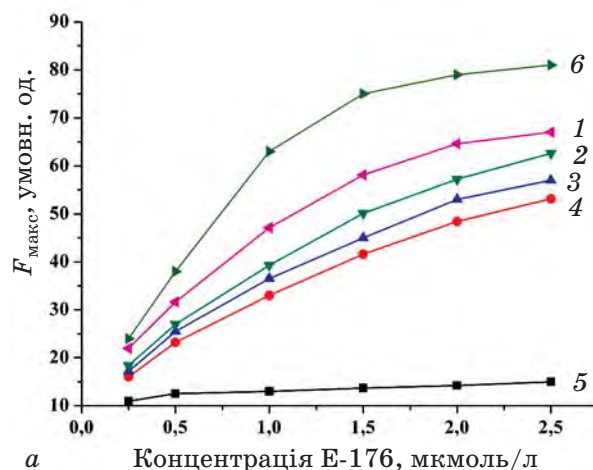


Рис. 3. Інтенсивність флуоресценції під час титрування зондом Е-176 сироватки крові (а) і розчину САЛ (б), в які додано: 1 — ЕШНП; 2 — ЕСС; 3 — ЕСцС; 4 — ЕСцП; 5 — Е-176 у буфері; 6 — Е-176 у сироватці крові, 7 — Е-176 у розчині САЛ

пустити, що К8-3000 і К-35 мають на молекулі альбуміну загальні центри зв'язування. І хоча вплив екстрактів на зв'язування альбуміном зондом К8-1300 схожий за характером на вплив екстрактів на флуоресценцію К8-3000, ефективність гасіння К8-1300 дещо нижча. Цей барвник виявляє певну селективність стосовно виду використовуваних екстрактів.

Такий ефект може свідчити про вплив компонентів екстрактів на конформацію молекули альбуміну, внаслідок чого може змінюватися спорідненість зонда до протеїну або кількість сайтів його зв'язування на САЛ. У разі надлишку зонда зв'язування відбувається як з високоафінними, так і з низькоафінними центрами сорбції. Ця обставина дає змогу оцінити зв'язувальну здатність протеїну залежно від конкуренції

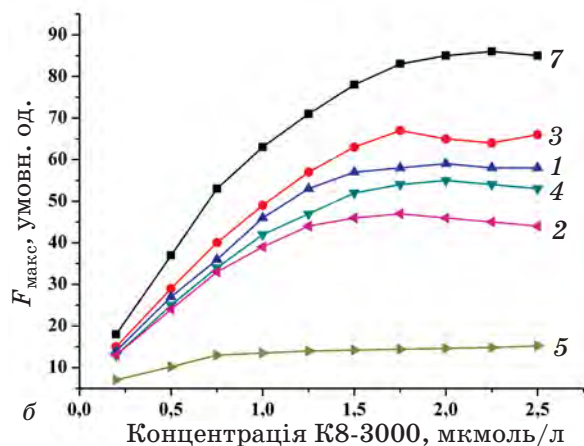
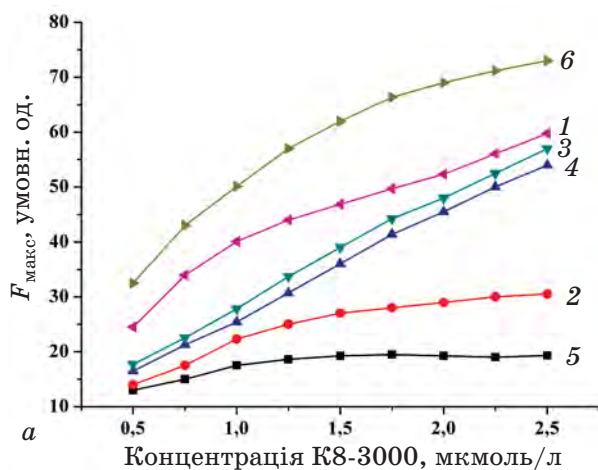


Рис. 4. Інтенсивність флуоресценції під час титрування зондом К8-3000 сироватки крові (а) і розчину САЛ (б), в які додано: 1 — ЕШНП; 2 — ЕСС; 3 — ЕСДС; 4 — ЕСДП; 5 — К8-3000 у буфері; 6 — К8-3000 у сироватці крові, 7 — К8-3000 у розчині САЛ

з іншими лігандами і є основою застосування флуоресцентних зондів [13]. Також можливо, що у взаємодії К-35 та інших зондів з альбуміном сироватки крові важливу роль відіграє і ступінь навантаження протеїну іншими лігандами. Цей факт може мати певне значення для прогностичної оцінки ефективності терапії з використанням екстрактів.

Наведені вище експериментальні дані, окрім додаткового підтвердження на користь зв'язування складових екстрактів з альбуміном, можуть також свідчити про зміну конформаційного стану САЛ під впливом речовин, які входять до складу екстрактів. Добре відомо, що, наприклад, надмірне насичення САЛ низькомолекулярними лігандами може призвести до конформаційних змін протеїну за типом денатурації (або «розпушування»). Водночас зв'язування

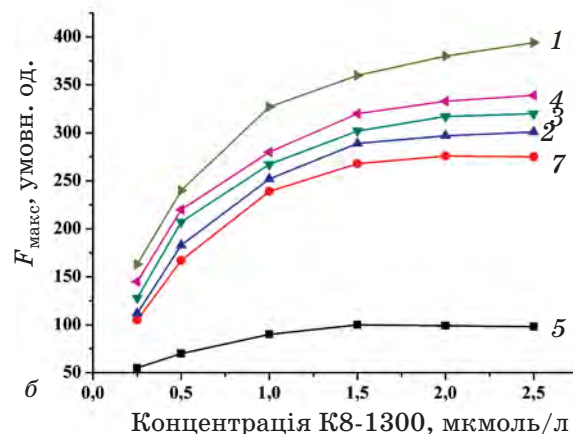
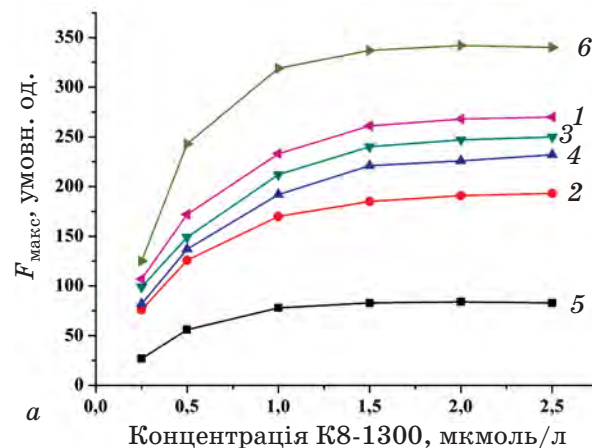


Рис. 5. Інтенсивність флуоресценції під час титрування зондом К8-1300 сироватки крові (а) і розчину САЛ (б), в які додано: 1 — ЕШНП; 2 — ЕСС; 3 — ЕСДС; 4 — ЕСДП; 5 — К8-1300 у буфері; 6 — К8-1300 у сироватці крові, 7 — К8-1300 у розчині САЛ

неетерифікованих жирних кислот може спричинювати зміни параметрів зв'язування (зниження константи зв'язування та/або підвищення питомого числа місць зв'язування) [13–15], що інтерпретується як утворення («розкриття») нових центрів зв'язування за навантаження альбуміну жирними кислотами.

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про безпосередню взаємодію складових екстрактів з альбуміном сироватки крові, що призводить до зміни сорбційної здатності цього протеїну.

Встановлено, що зонди (Е-176, К8-3000 і К8-1300) виявляють високу чутливість до взаємодії речовин пептидної природи з альбуміном сироватки крові. При цьому флуоресценція цих зондів збуджується в більш довгохвильовій ділянці спектра (467 і 670 нм

для K8-3000 і K8-1300, відповідно, порівняно з 420 нм для K-35). Ця особливість дає змогу у разі використання нових зондів зменшити артефакти, що їх вносять хромофорні групи біомакромолекул, які поглинають у видимій ділянці спектра. Зонд K8-1300 можна розглядати як довгохвильовий аналог зонда K-35, який широко застосовують для дослідження альбуміну.

Роботу виконано за підтримки УНТЦ (грант № P313) та НАН України (грант 0110U000488) і конкурсної теми ІПКіК НАН України «Ідентифікація пептидного пулу серця в нормі та при ішемії з метою з'ясування ролі ендogenous пептидів у розвитку некрозу та ремодуляції міокарда», державний реєстраційний номер 0122U003137.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гаврилов В. Б. Определение параметров связывания флуоресцентного зонда пирронового красного с сывороточным альбумином человека // Биофизика. — 2001. — Т. 46, Вып. 1. — С. 39–42.
2. Albani J. R. Relation between Proteins tertiary structure, tryptophan fluorescence lifetimes and tryptophan So 1Lb and So 1La transitions. Studies on α 1-acid glycoprotein and β -lactoglobulin // J. Fluoresc. — 2011. — V. 21, N 3. — P. 1301–1309.
3. Hawe A., Friess W., Sutter M., Jiskoot W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization // Pharmaceut. Res. — 2008. — V. 25, N 7. — P. 1487–1499.
4. Klitgaard S., Neves Petersen M. T., Petersen S. B. Quenchers induce wavelength dependence on protein fluorescence lifetimes // J. Fluoresc. — 2006. — V. 16, N 4. — P. 595–609.
5. Wang B., Li H. W., Gao Y. et al. A multifunctional fluorescence probe for the detection of cations in aqueous solution: the versatility of probes based on peptides // J. Fluoresc. — 2011. — V. 21, N 5. — P. 1921–1931.
6. Татарец А. Л., Поврозин Е. А., Дюбо Т. С. и др. Новые длинноволновые флуоресцентные зонды для исследования белков // Тез. докл. XXI Междунар. науч.-практ. конф. «Применение лазеров в медицине и биологии», Одесса, 26–29 мая 2004. — С. 134.
7. Dyubko T. S., Okladnoy Yu. G. On the approaches to new fluorescent probes for properties and biomembranes structural changes research selection and classification // 8th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAFS). — Prague, Czech Republic, August 24–27, 2003. — P. 208.
8. Гальченко С. Є. Склад водно-сольових екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней // Пробл. криобиол. — 2004. — № 4. — С. 72–78.
9. Гальченко С. Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Там само. — 2005. — Т. 15, № 3. — С. 403–406.
10. Гальченко С. Є., Дюбо Т. С., Паценкер Л. Д., Сандомирский Б. П. Спектрофлуориметрическое исследование экстрактов кріоконсервированных фрагментов органов свиней. I. Собственная флуоресценция // Эксперим. клін. мед. — 2006. — № 1. — С. 48–52.
11. Гальченко С. Є., Дюбо Т. С., Сандомирский Б. П., Паценкер Л. Д. Спектрофлуориметрическое исследование экстрактов кріоконсервированных фрагментов органов свиней. II. Анализ с помощью флуоресцентного зонда K-35 // Там же. — 2006. — № 3. — С. 57–61.
12. Пат. 64381 А Україна, МПК⁷ A61K35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С. Є. Гальченко, Н. Ю. Шкодовська, Б. П. Сандомирський, В. І. Грищенко. ІПКіК НАН України. — № 2003054649; Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004, Бюл. Промисл. власність, № 2.
13. Гаврилов В. Б. Характеристика чувствительности и специфичности флуоресцентных маркеров структурного состояния и связывающей способности белков // Биофизика. — 2000. — Т. 45, Вып. 3. — С. 421–426.
14. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю. А. Грызунова и Г. Е. Добрецова. — М.: ИРИУС, 1994. — 226 с.
15. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю. А. Грызунова и Г. Е. Добрецова. Книга 2. — М.: ГЭОТАР, 1998. — 440 с.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДОВ

Л. А. Рогоза¹
О. А. Богатырева¹
Т. С. Дюбко¹
А. Л. Татарец²
Е. А. Поврозин²
С. Е. Гальченко¹
Б. П. Сандомирский¹

¹Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины,
Харьков

²ГНУ «НТК Институт монокристаллов
НАН Украины», Харьков

E-mail: liliyarogoza@mail.ru
tatarets@isc.kharkov.com

Целью работы было выяснение возможности использования новых зондов E-176, K8-3000 и K8-1300 для исследования специфичности состава пептидов в экстрактах криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят и их взаимодействия с альбумином сыворотки крови. В работе были использованы беспротеиновые экстракты криоконсервированных фрагментов кожи новорожденных поросят, селезенки свиней, а также сердца половозрелых свиней и новорожденных поросят.

Титрование экстрактов исследованными зондами выявило различия в способности пептидов, входящих в их состав, связывать зонды, что отражает тканевую специфичность пептидного состава препаратов.

Добавление экстрактов к раствору альбумина вызывало тушение собственной флуоресценции альбумина и влияло на состояние триптофановых остатков протеина.

Исследованные зонды проявляют высокую чувствительность к взаимодействию с альбумином сыворотки крови веществ пептидной природы и могут быть рекомендованы как новые флуоресцентные зонды для применения в медико-биологических исследованиях. Поскольку флуоресценция этих зондов возбуждается в длинноволновой области спектра, это позволяет уменьшить при их использовании артефакты, вносимые поглощающими в видимой области хромофорными группами биомакромолекул.

Ключевые слова: флуоресцентные зонды, экстракты органов, пептиды, альбумин.

FLUORESCENT PROBES FOR THE PEPTIDES INVESTIGATION

L. A. Rohoza¹
O. O. Bogatyryova¹
T. S. Dyubko¹
A. L. Tatarets²
Ye. A. Povrozin²
S. Ye. Galchenko¹
B. P. Sandomirsky¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv

²State Scientific Institution «Institute for Single
Crystals of the National Academy
of Sciences of Ukraine», Kharkiv

E-mail: liliyarogoza@mail.ru
tatarets@isc.kharkov.com

The work aimed to investigate the use of new probes E-176, K8-3000 and K8-1300 to research the specificity of peptides in the extracts of cryopreserved fragments of organs of pigs' and piglets' and their interaction with blood serum albumin. Extracts of cryopreserved fragments of skin of new-born piglets', spleen of pigs', heart of mature pigs' and new-born piglets' cleared of proteins were used in the research.

Titration of extracts with investigated probes revealed differences in the peptides properties that are a part of them, to bind probes, reflecting tissue specificity of peptide drugs.

Adding the extracts to albumin solution triggered quenching of intrinsic fluorescence of albumin and affected the state of tryptophan residues of the protein.

Investigated probes show a high sensitivity to the interaction with blood serum albumin substances of peptide nature and could be recommended as new fluorescent probes for use in the biomedical researches. Since fluorescence of these probes is excited in the long wavelength of spectrum, it enables to reduce the artifacts by their use that are introduced by chromophore groups of the biomacromolecules absorbing in the visible region.

Key words: fluorescent probes, extracts of organs, peptides, albumin.