

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ СШИВАЮЩЕГО ЭФФЕКТА КОНСЕРВИРУЮЩИХ РАСТВОРОВ

В.В. Краснов

д.б.н., зам. руководителя НИЦ БМТ по научной работе,
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)
E-mail: v.v.krasnov@mail.ru

Т.В. Володина

к.б.н., вед. науч. сотрудник,
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)
E-mail: vtvolodina@mail.ru

В.А. Дубинская

к.б.н., вед. науч. сотрудник,
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)

Цель исследования – разработка методики оценки сшивающего эффекта консервирующих растворов на основе анализа изменения электрофоретических спектров белка и регистрации образования межмолекулярных сшивок.

Материал и методы. Для оценки сшивающего эффекта использовали свежеприготовленный консервирующий раствор Мельникова–Разведенкова, содержащий глицерин и уксуснокислый калий, и аналогичный консервирующий раствор, в котором длительное время сохранялся биологический материал, содержащий костную, хрящевую и мышечную ткани человека. Осуществляли электрофорез бычьего сывороточного альбумина (обработанного консервирующими растворами) по методу Лэммли в пластинах полиакриламидного геля с концентрацией акриламида 5–20%. В качестве маркерных белков для определения относительной молекулярной массы использовали лизат белков мышцы сердца крысы.

Результаты. На основе анализа изменения электрофоретического спектра белка разработана методика, позволяющая выявлять в консервирующих растворах вещества, обладающие сшивающим эффектом в отношении белковых молекул. Изменение относительной молекулярной массы бычьего сывороточного альбумина позволяет регистрировать наличие в растворах формальдегида и глицеринового альдегида на уровне сотых долей процента. Инкубация бычьего сывороточного альбумина в консервирующем растворе, находившимся в контакте с биологическим материалом, приводит к появлению высокомолекулярных фракций, свидетельствующих об образовании меж- и внутримолекулярных сшивок.

Ключевые слова: консервирующий раствор, бычий сывороточный альбумин, формальдегид, глицериновый альдегид, электрофорез в полиакриламидном геле.

Для цитирования: Краснов В.В., Володина Т.В., Дубинская В.А. Методика оценки сшивающего эффекта консервирующих растворов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(11):38–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-06>

Способность формальдегида образовывать внутри- и межмолекулярные метиленовые сшивки белковых молекул лежит в основе механизма формальдегидного дубления и широко используется в технологии выделки кожи и меха, при изготовлении различных анатомических препаратов и длительном сохранении биологических объектов [1, 2].

Глицерин также входит в состав ряда консервирующих растворов. При мягком окислении глицерина образуется смесь глицеринового альдегида и 1,3-дигидроксиацетона [3]. Окисление глицерина и увеличение примесной концентрации глицеринового альдегида может сопровождаться появлением дополнительного сшивающего эффекта в отношении молекул белка. Однако прямых экспериментальных данных, свидетельствующих о воз-

можности образования межмолекулярных сшивок белковых молекул за счёт действия глицеринового альдегида, выявлено не было [4].

Цель исследования – разработка методики для оценки сшивающего эффекта (cross-link) консервирующих растворов на основе анализа изменения электрофоретического спектра белка и регистрации образования межмолекулярных сшивок.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для оценки сшивающего эффекта использовали свежеприготовленный консервирующий раствор (КР) Мельникова–Разведенкова, содержащий глицерин и уксуснокислый калий [5], и аналогичный КР, в котором длительное время сохранялся

биологический материал, содержащий костную, хрящевую и мышечную ткани человека.

Образцы лиофилизированного бычьего сывороточного альбумина (БСА), каждый массой 5,0 мг, растворяли в 1,0 мл КР, тщательно перемешивали до полного растворения белка и термостатировали при $t = 31-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 14 суток. Каждые сутки образцы встряхивали. По окончании инкубации отбирали по 0,2 мл исследуемого образца КР, добавляли к ним 4,8 мл дистиллированной воды и осаждали белок из образца холодным ацетоном (при t от -12 до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) в конечной концентрации 80% (20 мл), а затем выдерживали в течение 60 мин в морозильной камере. Образовавшийся осадок собирали центрифугированием при 2100 g 60 мин, $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Надосадочную жидкость декантировали, осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в концентрации 2 мг/мл в лизирующем буферном растворе следующего состава: 0,125 М трис-НСl рН 6,8, 10%-ный глицерин, 5%-ный 2-меркаптоэтанол, 2%-ный додецилсульфат натрия.

Контрольный препарат БСА растворяли в том же лизирующем буферном растворе в концентрации 2 мг/мл.

Электрофорез проводили по методу Лэммли в пластинах полиакриламидного геля с концентрацией акриламида 5–20% (GE Healthcare, Швеция) [6].

В качестве маркерных белков для определения относительной молекулярной массы (Мг) использовали лизат белков мышцы сердца крысы (ЛМСК). При электрофорезе с додецилсульфатом натрия ЛМСК разделяется на ряд полипептидных фракций с известной Мг в диапазоне от 200 до 12 кДа [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ денситограмм треков гелевых пластин показал, что инкубация БСА в КР, находившемся в контакте с биологическим материалом и содержащем высокие концентрации глицерина и солей, приводит к изменению электрофоретического (ЭФ) распределения полипептидных фракций исследуемого белкового препарата (рис. 1). Денситограммы контрольных образцов и препаратов, инкубированных в свежеприготовленном КР, практически не имели различий (рис. 1, а, б). При инкубации в КР, использованном для хранения биологического материала отмечалось увеличение высокомолекулярных фракций 1–3 (свидетельствующих об образовании межмолекулярных сшивок), слияние фракций в зоне 4–6 и уменьшение основной фракции 9 (рис. 1, в).

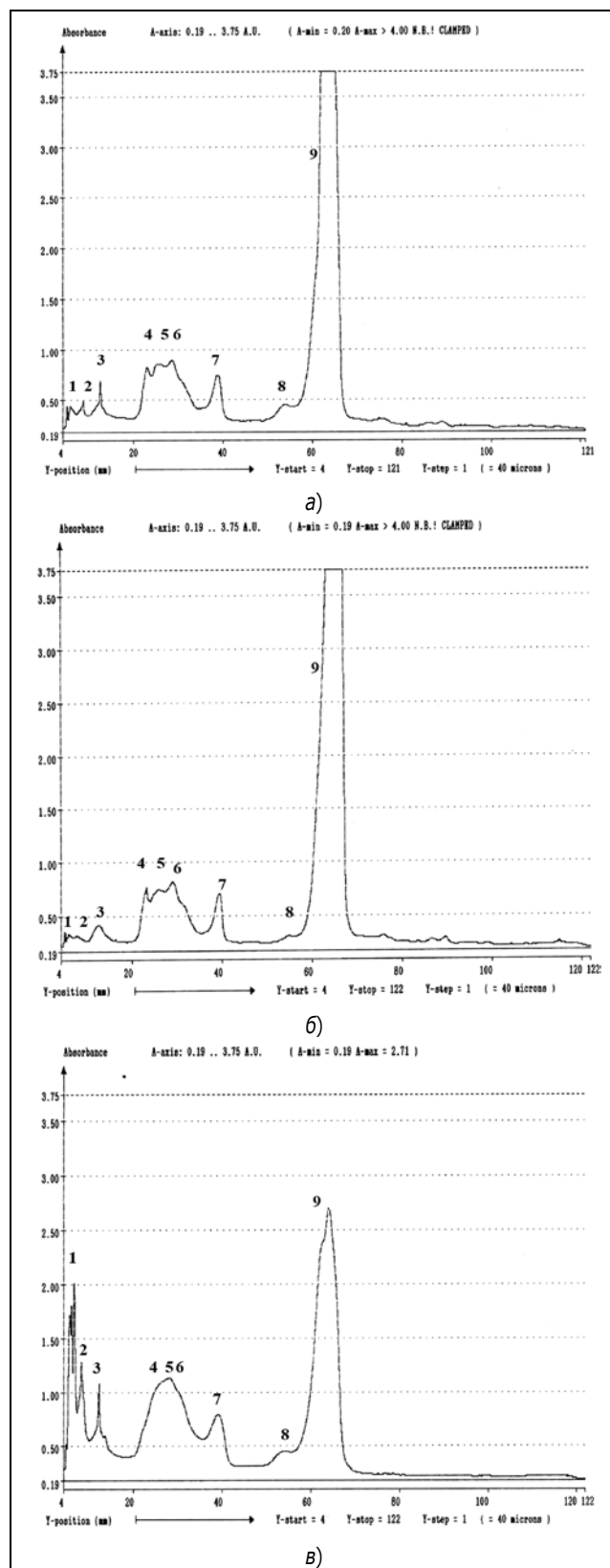


Рис. 1. Денситограммы треков гелевой пластины: а – БСА, инкубированный в течение 2 недель в свежеприготовленном КР; б – контрольный препарат БСА; в – БСА, инкубированный в КР, использованном для хранения биологического материала

При изучении влияния различных концентраций формальдегида и глицеринового альдегида, добавляемых в КР при инкубации белка, на ЭФ-спектре препаратов БСА выявлены изменения величины M_r нативного БСА.

На рис. 2 представлена электрофореграмма препаратов БСА, инкубированных в КР, содержащем от 0,001 до 0,1% формальдегида. Добавление в КР формальдегида в конечной концентрации 0,1% (трек 8) приводило к формированию плотного, плохо растворимого даже в лизис-буфере осадка, вследствие чего белок представлен на гелевой дорожке в следовых количествах.

Снижение концентрации формальдегида в инкубационной пробе в 2 раза (до 0,05%) позволяло выявить ряд размытых белковых полос и гетерогенный по молекулярной массе высокомолекулярный материал, заполняющий верхнюю часть пластины (трек 7).

При концентрации формальдегида 0,01% (трек 6) отмечалось слияние полос 9–8, 7–6 фракций, 4–3, а также их размытость. При этом для всех фракций 6–8 треков было характерно изменение величины R_f . Характер расположения белковых фракций этого образца соответствовал препарату БСА, для модификации которого использовался КР после хранения консервированных биологических образцов (трек 3). На всех дорожках не определялись низкомолекулярные фракции, расположенные ниже основной фракции альбумина.

На 5-й дорожке представлен препарат БСА, обработанный КР, содержащим 0,001% формальдегида. Характер распределения белковых полос соответствовал треку 2 на котором представлен БСА, обработанный свежеприготовленным КР. В обоих случаях, по сравнению с контрольным образцом БСА (трек 4), отмечалось только усиление фракции 8. Изменения величины R_f не происходило, низкомолекулярные фракции сохранялись.

На рис. 3 представлены электрофореграммы препаратов БСА, обработанных КР, содержащим различные концентрации глицеринового альдегида (смесь D- и L-изомеров).

При концентрации альдегида 0,1 и 0,05% выявлялись размытые полосы, соответствующие основным фракциям исходного препарата (треки 7, 8), а также усиление окраски в верхней части гелевой пластины. Следует отметить, что обработка 0,1%-ным раствором снижала растворимость БСА, однако плотного осадка не образовывалось и возможность получения хроматограммы сохранялась.

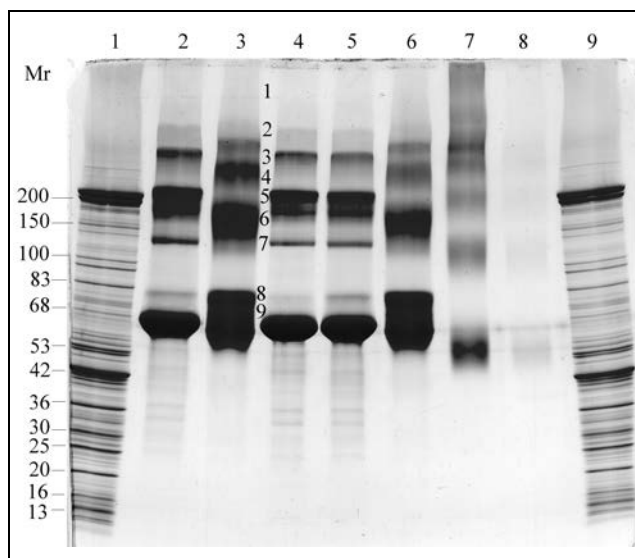


Рис. 2. Электрофоретические спектры БСА при инкубации в течение 2 недель при 37 °С в КР с различной концентрацией формальдегида: 1, 9 – ЛМСК; 2 – БСА после инкубации в свежеприготовленном КР; 3 – БСА после инкубации в КР, который находился в контакте с биоматериалом; 4 – нативный БСА; 5 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,001% формальдегида; 6 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,01% формальдегида; 7 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,05% формальдегида; 8 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,1% формальдегида

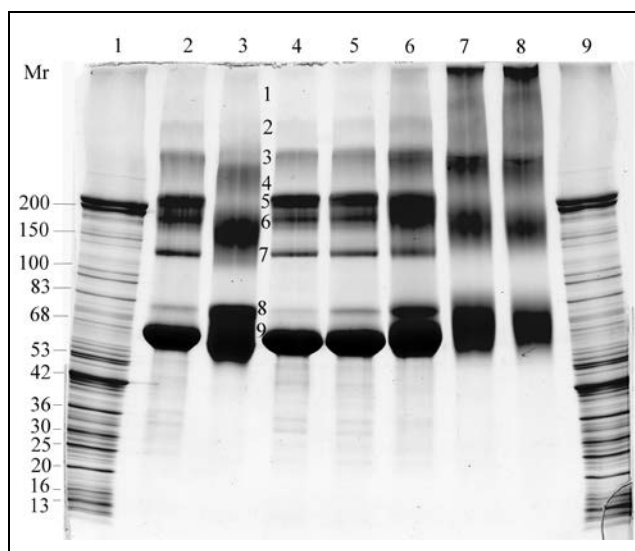


Рис. 3. Изменение электрофоретических спектров БСА при инкубации в течение 2 недель при 37 °С в КР с различной концентрацией глицеринового альдегида: 1, 9 – ЛМСК; 2 – БСА после инкубации в свежеприготовленном КР; 3 – БСА после инкубации в КР, который находился в контакте с биоматериалом; 4 – нативный БСА; 5 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,001% глицеринового альдегида; 6 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,01% глицеринового альдегида; 7 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,05% глицеринового альдегида; 8 – БСА после инкубации в КР, содержащем 0,1% глицеринового альдегида

При концентрации глицеринового альдегида 0,01% (трек 6) размытость полос снижается, фракция 8 определялась более чётко, визуализировались низкомолекулярные фракции. Добавление глицеринового альдегида в КР в концентрации 0,001% практически не изменяло электрофореграмму по сравнению со свежеприготовленным раствором (треки 2, 5).

Однако сравнение этого образца с белком, находившимся в контакте с КР, использованным при сохранении биологических тканей (трек 3), позволило выявить некоторые различия. У всех образцов, обработанных КР с глицериновым альдегидом, отсутствовали изменения величины R_f (треки 5–8), характерные для растворов, содержащих формальдегид. Выявленные различия позволяют предполагать наличие в растворах, использованных при хранении биологического материала, формальдегида в концентрациях на уровне сотых долей процента. На рис. 4 представлены электрофореграммы препаратов БСА, инкубированного в КР, содержащих различные концентрации формальдегида и глицеринового альдегида.

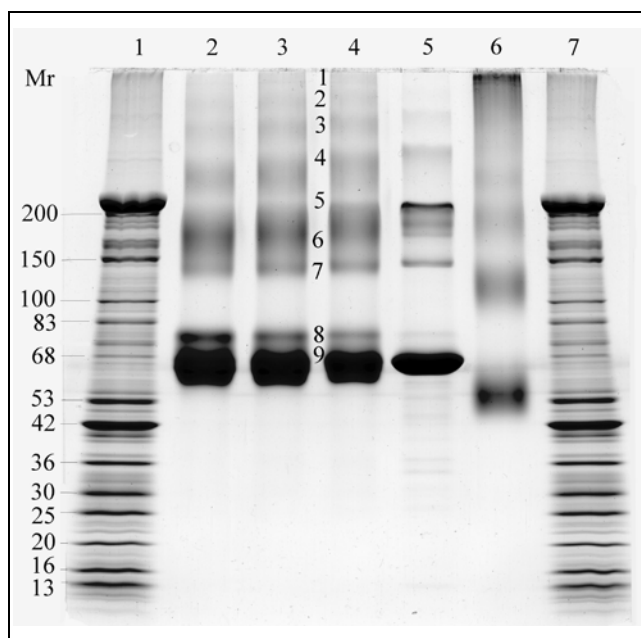


Рис. 4. Изменение электрофоретических спектров БСА при инкубации в течение 2 недель 37 °С в БР с суммарной концентрацией формальдегида и глицеринового альдегида 0,01%: 1, 7 – ЛМСК; 2 - БСА после инкубации в КР, содержавшем, формальдегид:глицериновый альдегид в соотношении 3:1; 3 - БСА после инкубации в КР, содержавшем формальдегид:глицериновый альдегид в соотношении 1:1; 4 - БСА после инкубации в КР, содержавшем формальдегид:глицериновый альдегид в соотношении 1:3; 5 - нативный БСА; 6 - БСА после инкубации в КР, который находился в контакте с биологическими тканями в течение длительного периода

Установлено, что с увеличением концентрации формальдегида в КР (треки 2, 3, 4) изменялась величина R_f белковых фракций и усиливалось слияние фракций 8–9, 3–6.

Изменение величины R_f для образцов, содержащих наибольшее количество формальдегида, по-видимому, связано с его способностью к образованию внутримолекулярных сшивок, тогда как увеличение M_r свидетельствует об образовании межмолекулярных сшивок.

При длительном хранении биоматериала в КР, содержащих глицерин, возможно образование глицеринового альдегида. Однако при изучении ЭФ-спектров БСА, инкубированных с такими КР, не удалось зарегистрировать характерных изменений. Этот факт не позволяет рассматривать примесные концентрации глицеринового альдегида в качестве дополнительного фактора фиксации белков.

Таким образом разработанная авторами методика на основе анализа изменения электрофоретического спектра белка позволяет выявлять в КР вещества, обладающие сшивающим эффектом в отношении белковых молекул.

ВЫВОДЫ

1. Инкубация БСА в КР, который находился в контакте с биологическим материалом, приводит к появлению высокомолекулярных фракций, свидетельствующих об образовании меж- и внутримолекулярных сшивок.
2. Характер модификации препаратов БСА, выявляемый при электрофоретическом исследовании, позволяет идентифицировать КР, содержащие более 0,01% формальдегида или глицеринового альдегида. Характер изменения спектров, вызываемый альдегидами, различен.
3. Снижение концентрации альдегидов в КР до $\leq 0,001\%$ не позволяет выявить изменений в ЭФ спектрах белковых препаратов.
4. Проанализированные КР, находившиеся в контакте с биоматериалом, вызывали изменения ЭФ-спектров БСА, аналогичные растворам, содержащим 0,01% формальдегида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Реброва Г.А., Василевский В.К., Ребров Л.Б., Со Сан Хо, Осипова Л.А., Быков В.А. Различные варианты химической модификации коллагена при консервации, длительном хранении и воздействии факторов старения биополимеров // Биомедицинская радиоэлектроника. 2008. №1–2. С. 35–43.

2. Реброва Г.А., Василевский В.К., Со Сан Хо, Ребров Л.Б., Осипова Л.А., Быков В.А. Влияние консервирующего раствора на коллаген кожи в зависимости от его структурной организации // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2009. № 1. С. 52–60.
3. Рахманкулов Д.Л., Кимсанов Б.Х., Чанышев Р.Р. Физические и химические свойства глицерина. М.: Химия. 2005. 200 с.
4. Ребров Л.Б., Реброва Г.А., Василевский В.К., Быков В.А., Осипова Л.А. Химическая модификация структуры коллагена кожи при длительном хранении в консервирующем растворе // Биомедицинская радиоэлектроника. 2008. № 8–9. С. 20–27.
5. Пикалюк В.С., Мороз Г.А., Кутя С.А. Методическое пособие по изготовлению анатомических препаратов. Симферополь. 2004. 76 с.
6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: МЦНМО. 2002. 248 с.
7. Giometti C.S., Anderson N.G., Tollaksen S.L., Edwards J.J., Anderson N.L. Analytical techniques for cell fractions: XXVII. Use of heart proteins as reference standards in two-dimensional electrophoresis // Analytical biochemistry. 1980. V. 102. P. 47–58.

Поступила после доработки 28 октября 2019 г.

TEST-SYSTEM FOR ESTIMATION OF THE CROSSLINKING EFFECT OF PRESERVATIVE SOLUTIONS

© Authors, 2019

V.V. Krasnov

Dr.Sc. (Biol.), Deputy Head of Scientific Research of the Scientific Research Center, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: v.v.krasnov@mail.ru

T.V. Volodina

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: tvvolodina@mail.ru

V.A. Dubinskaya

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

Purpose of the Study – to develop the technique for evaluation of the crosslinking effect of storage solutions based on analyzing changes in protein electrophoretic spectra and recording the forming intermolecular crosslinks. **Material and Methods.** The crosslinking effect was evaluated with freshly prepared Melnikov-Razvedenkov storage solution containing glycerin and potassium acetate, and the similar storage solution in which the biological material containing human bone, cartilage and muscle tissues was preserved for a long time. Electrophoresis of bovine serum albumin (treated with storage solutions) was made according to Lammle technique in polyacrylamide gel plates with 5-20% acrylamide concentration. Protein lysate of rat's heart muscle was used as marker proteins for the purpose of determining relative molecular weight. **Results.** The technique developed by the authors on the basis of analyzing changes in protein electrophoretic spectrum allows to reveal the substances in storage solutions which have a crosslinking effect on protein molecules. The change in the relative molecular weight of bovine serum albumin makes it possible to record the presence of formaldehyde and glycerin aldehydes in solutions at the level of the hundredths of a percent. Incubation of bovine serum albumin in the storage solution being in contact with biological material leads to appearing high-molecular-weight fractions evidencing of the formation of inter- and intramolecular crosslinks.

Key words: storage solution, bovine serum albumin, formaldehyde, glycerin aldehyde, electrophoresis in polyacrylamide gel.

For citation: Krasnov V.V., Volodina T.V., Dubinskaya V.A. Test-system for estimation of the crosslinking effect of preservative solutions. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(11):38–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-06>

REFERENCES

1. Rebrova G.A., Vasilevskij V.K., Rebrov L.B., So San Ho, Osipova L.A., Bykov V.A. Razlichnye varianty himicheskoj modifikacii kollagena pri konservacii, dlitel'nom hranenii i vozdeystvii faktorov starenija biopolimerov // Biomedicinskaya radioelektronika. 2008. №1-2. S. 35-43.
2. Rebrova G.A., Vasilevskij V.K., So San Ho, Rebrov L.B., Osipova L.A., Bykov V.A. Vliyanie konserviruyushchego rastvora na kollagen kozhi v zavisimosti ot ego strukturnoj organizacii // Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmacevticheskoi himii. 2009. № 1. S. 52-60.
3. Rahmankulov D.L., Kimsanov B.H., Chanyshev R.R. Fizicheskie i himicheskie svoystva glicerina. M.: Himiya. 2005. 200 s.
4. Rebrov L.B., Rebrova G.A., Vasilevskij V.K., Bykov V.A., Osipova L.A. Himicheskaya modifikaciya struktury kollagena kozhi pri dlitel'nom hranenii v konserviruyushchem rastvore // Biomedicinskaya radioelektronika. 2008. № 8-9. S. 20-27.
5. Pikalyuk V.S., Moroz G.A., Kutya S.A. Metodicheskoe posobie po izgotovleniyu anatomiceskikh preparatov. Simferopol'. 2004. 76 s.
6. Osterman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinovyyh kislot. M.: MCNMO. 2002. 248 s.
7. Giometti C.S., Anderson N.G., Tollaksen S.L., Edwards J.J., Anderson N.L. Analytical techniques for cell fractions: XXVII. Use of heart proteins as reference standards in two-dimensional electrophoresis // Analytical biochemistry. 1980. V. 102. P. 47-58.