

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ КРОВИ

В.А. Жиденко, С.В. Гаташ, Г.П. Горбенко

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61077, г. Харьков**e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 1 октября 2002 г.

Методом тушения триптофановой флуоресценции акриламидом, Cs^+ , KJ исследованы структурные изменения белков крови альбумина и фибриногена при воздействии гамма-излучения в дозах 18 и 45 Гр и замораживания со скоростями $200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Установлено, что такие факторы воздействия влияют на структурную жесткость белков и окружение их хромофоров. Проведена и показана сравнительная характеристика влияния разных доз гамма-облучения и скоростей замораживания. Выявленная разнонаправленность эффектов в исследованных белках объясняется качественным различием их нативной структурной организации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, альбумин, структурные изменения, гамма-излучение; замораживание, скорость замораживания; тушения флуоресценции

Ранее было показано [1], что различные режимы замораживания приводят к изменениям спектральных свойств как собственных хромофоров белков, так и взаимодействующих с ними зондов. Были также зарегистрированы методом флуоресцентных зондов конформационные изменения белков при действии гамма-облучения в интервале доз от 18 до 45 Гр. [2] В настоящей работе исследовано влияние двух режимов замораживания и гамма-излучения, а также их сочетанного действия методом тушения триптофановой флуоресценции [3]. Нерешенные проблемы действия радиации на компоненты крови и ее криоконсервации обусловили выбор в качестве объектов исследования двух главных белков плазмы крови, альбумина и фибриногена, играющих важную полифункциональную роль в системе гемостаза [4,5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали водные растворы фибриногена и альбумина. Белки растворяли в 10мМ трис-НСl буфере (рН=7.4) до физиологической концентрации 2 мг/мл. Степень очистки фибриногена (0.94 %) определялась по количеству белка, осаждаемого тромбином. Использовались препараты фибриногена человека и тромбина полученные на Харьковской областной станции переливания крови. В качестве образцов альбумина в работе использовалась пятая фракция бычьего сывороточного альбумина (БСА) фирмы Диаэм (США) со степенью очистки (98%). Флуоресценцию триптофана ($\lambda_{\text{возб.}}=296\text{ нм}$ и 280 нм , $\lambda_{\text{флуор.}}\sim 337\text{ нм}$) регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi-F4010». Величины поглощения растворов тушителей на данных длинах волн регистрировались на спектрофотометре «Hitachi-3210». Растворы белков облучали на гамма-установке типа «Исследователь» (^{60}Co) в дозах 18 и 45 Гр при излучаемой мощности 380 Р/мин. Замораживание осуществляли путем погружения образцов в жидкий азот (скорость замораживания - $200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и выдерживанием образцов в парах азота (скорость - $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до точки кристаллизации с последующим быстрым охлаждением до температуры жидкого азота.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс динамического гашения триптофановой флуоресценции акриламида описывается уравнением Штерна-Фольмера [6]:

$$I_0/I = 1 + K_{SV} [Q], \quad (1)$$

где I_0 - интенсивность флуоресценции без тушителя; I - интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя, K_{SV} - константа Штерна-Фольмера, $[Q]$ - концентрация тушителя.

Полученные результаты измерения концентрационной зависимости тушения для акриламида, анализировались в координатах Штерна-Фольмера в соответствии с уравнением (1). Анализ зависимостей указывает на существование одного типа флуорофоров, одинаково доступных для акриламида. При гамма-облучения в дозе 18 Гр K_{SV} увеличивается на 7.5%, а увеличение дозы до 45 Гр вызывает аналогичное изменение, но уже на 171% (см. табл.1). Прямо противоположный эффект наблюдается в случае двух режимов замораживания растворов БСА, причем эффект более выражен в

случае медленного замораживания. При скорости замораживания 1 °С/мин K_{SV} уменьшается примерно на 80%, а при замораживании со скоростью 200 °С/мин - на 4%. Как видно из таблицы 1, аналогичная тенденция сохраняется и в случае, когда образцы первоначально подвергались облучению в дозе 45 Гр. но изменения константы K_{SV} значительно меньше. Диффузия акриламида во внутреннюю область белковой глобулы определяется двумя факторами: конформационными флуктуациями белка в наносекундном диапазоне и (или) локальными разворачиваниями белковой молекулы [7]. Очевидно наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что облучение повышает внутримолекулярную подвижность белка, причем эта величина зависит от дозы ионизирующего излучения. С другой стороны оба режима замораживания по-видимому приводят к перемещению триптофанилов в менее полярное и более жесткое окружение, которое менее доступно растворителю.

Таблица 1. Тушение флуоресценции триптофана в растворах альбумина.

Воздейст вие	Акриламид		KJ				Cs ⁻			
	K_{SV}	ΔK_{SV} , %	K_{SV}	ΔK_{SV} , %	f	Δf	K_{SV}	ΔK_{SV} , %	f	Δf
О, 18 Гр	4.76	↑ 7,5	17,89	↓ 70,1	0,42	↓ 0,01	0,797	↑ 86,6	1	↓ 0,001
О, 45 Гр	6,93	↑ 171	1,87	↓ 88	0,999	↑ 0,53	-	-	-	-
Зб	16,57	↓ 4,17	4,71	↓ 9,77	-	-	-	-	-	-
Зм	2,8	↓ 79,9	14,71	↓ 17,08	0,263	↓ 0,127	-	-	-	-
О-Зб	14,84	↓ 14,7	1,71	↓ 90	1	↑ 0,39	-	-	-	-
О-Зм	7,99	↓ 23,5	6,12	↑ 21,2	0,62	↑ 0,225	-	-	-	-

Примечание. В таблицах 1, 2 используются следующие обозначения: **Зб** - замораживание со скоростью 200 С/мин, **Зм** - замораживание со скоростью 1 С/мин, **О-Зб** - гамма-облучение в дозе 45 Гр, с последующим замораживанием со скоростью 200 С/мин, **О-Зм** - гамма-облучение в дозе 45 Гр, с последующим замораживанием со скоростью 1 С/мин. ↓ - уменьшение величины, ↑ - увеличение.

Согласно с данными литературы [8] молекула БСА имеет 2 остатка триптофана, относящихся к типам II и III, т. е. поверхностным, но различающихся по свойствам их микроокружения. Для расчета констант, характеризующих процесс тушения флуоресценции иодидом, использовали модифицированную форму уравнения Штерна-Фольмера [3]:

$$I_0/(I_0 - I) = (f K_{SV} [Q])^{-1} + f^{-1}, \quad (2)$$

где f-доля начальной флуоресценции, доступная тушению.

Как видно из таблицы 1, гамма-облучение приводит к уменьшению K_{SV} с ростом дозы облучения. Быстрое и медленное замораживание вызывают однонаправленные изменения K_{SV} , однако эффект более выражен при замораживании со скоростью 1 °С/мин. Очевидно, что ионизирующее излучение, а также обе скорости замораживания изменяют распределение заряженных групп в окружении белковых хромофоров. Возможно эти воздействия приводят к увеличению локальных отрицательных зарядов в окружении триптофанилов, либо к изменению распределения заряженных групп в их окружении [8]. И лишь в случае сочетанного воздействия облучения и медленного режима замораживания, наверное, денатурационные изменения структуры белка приводят к обратному эффекту. Относительно параметра f можно отметить только его разнонаправленное изменение в зависимости от воздействующего фактора.

Полученные значения констант Штерна-Фольмера в случае тушения триптофановой флуоресценции ионами Cs⁺ для дозы 18 Гр свидетельствуют об уменьшении структурной жесткости белковых молекул. Видно, что K_{SV} увеличивается, а его изменение (ΔK_{SV}) примерно такое же как для иодида. Этот факт подтверждает увеличение отрицательного локального заряда.

Размещение максимума спектра флуоресценции фибриногена в коротковолновой области свидетельствует о более гидрофобном окружении триптофановых остатков в молекуле, т. е. основной вклад вносят триптофанилы [9], находящиеся в неполярных жестких участках недоступных воде (40%), и триптофанилы, находящиеся в поверхностных складках макромолекулы и имеющие ограниченный контакт с водой (60%) (формы I и II, согласно модели трех дискретных состояний триптофанового хромофора в белке [8, 10]).

Таблица 2. Тушение флуоресценции триптофана в растворах фибриногена.

Воздействие	Акриламид		KJ			
	K_{SV}	$\Delta K_{SV}, \%$	K_{SV}	$\Delta K_{SV}, \%$	f	Δf
О, 45 Гр	4,06	↓22,8	1,314	↓15,22	1	↑0,09
Зб	4,62	↓17,94	4,66	↑413	0,35	↓0,65
Зм	6,34	↓15	0,27	↓87,7	0,999	↑0,57
О-Зб	4,41	↓21,7	10,73	↑108	0,18	↓0,82
О-Зм	6,2	↓16,3	0,52	↓76	0,999	↓0,25

Из полученных расчетных данных (табл.2.) видно, что K_{SV} для акриламида уменьшается независимо от воздействующего фактора, что указывает на небольшое возрастание структурной жесткости белка, скорее всего связанное с нарушением сложной нативной доменной структуры фибриногена [5]. Тушение ионами J показывает уменьшение K_{SV} при дозе в 45 Гр и более значительное изменение ΔK_{SV} в сочетании с медленным замораживанием. Интересно, что быстрый режим замораживания вызывает обратный эффект. Он изменяет электростатическую ситуацию в окружении хромофоров в сторону уменьшения либо отрицательного суммарного заряда молекулы, либо локального отрицательного заряда в окружении триптофанилов (скорее всего это тип II) [10].

Одной из возможных причин возрастания параметра f может быть увеличение количества поверхностных флуорофоров (за счет перехода из типа I в тип II), либо возрастание их квантового выхода вследствие ограничения подвижности белковых групп, находящихся в их окружении [8].

ВЫВОДЫ

Гамма-облучение приводит к увеличению внутримолекулярной подвижности молекулы альбумина, которая зависит от дозы. Обратный эффект наблюдается при двух режимах замораживания и их сочетании с облучением - триптофанилы перемещаются в менее полярное и более жесткое окружение, а его локальный отрицательный заряд увеличивается.

Для фибриногена все исследованные воздействия вызывают однонаправленные структурные изменения, приводящие к увеличению структурной жесткости молекулы. Однако в режиме быстрого замораживания наблюдается уменьшение отрицательного заряда в окружении триптофанилов.

Разная направленность эффектов в исследованных белках при одних и тех же воздействиях скорее всего можно связать с принадлежностью их к разным структурным классам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е. К., Ромоданова Э. А., Дюбко Т. С., Гаташ С. В., Гаврик В. А. // Проблемы криобиологии. 1998. № 3. С. 18-21.
2. Ромоданова Э. А., Андреева Е. К., Гаташ С. В., Дюбко Т. С. // Вісн. Харк. Ун-ту. 1998. № 422. Біофізичний вісн. Вип. 2. С. 105-108.
3. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. Киев: Наук. думка, 1988.
4. Д. А. Соркина, И. Н. Залевская. Структурно-функциональные свойства белков. К. Выща пк., 1989. 216с.
5. Медведь Л. В. // Украинский биохимический журнал. 1985. Т.57, № 5. С. 36-49.
6. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986.
7. Eptiuk M., Chiron C. // Anal. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 199.
8. Бурштейн Э.А. Люминесценция белковых хромофоров: Модельные исследования // Итоги науки и техники. ВИНТИ. М.- Сер. Биофизика. -1976.-Т.6.-214С.
9. Зима В.Л., Демченко А.П., Варелцкая Т.В. Ультрафиолетовая флуоресценция фибриногена. Влияние факторов среды// Укр.биохим.ж. 1972 . Т.44. № 10. С. 10 -15.
10. Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белка: Природа и применение // Итоги науки и техники. ВИНТИ. М.- Сер. Биофизика. -1977.- Т. 7.- 190 с.