

УДК 577.346:543.556

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Н.Т. Дуркало*, О.А. Горобченко, О.Т. Николов, С.В. Гаташ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская 23, 61015, Харьков
Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61077, Харьков

Поступила в редакцию 28 декабря 2005г.

Приводятся результаты измерения диэлектрических свойств растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА) в воде в интервале концентраций 5–100 мг/мл, γ -облученных дозами 15 и 30 Гр. Измерения действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей комплексной диэлектрической проницаемости проводились методом СВЧ-диэлектрметрии на частоте 9,2 ГГц. Установлено, что степень гидратации нативного БСА составляет 0,2–0,25г/г. При облучении растворов БСА дозами 15 и 30 Гр концентрационная зависимость диэлектрической проницаемости ϵ' имеет сложный характер. В интервале концентраций до 20 мг/мл величина ϵ' облученных образцов меньше контроля, что свидетельствует об увеличении количества связанной белком воды. При концентрации больше 20 мг/мл величина ϵ' возрастает и превышает контроль примерно на одну единицу ϵ' при облучении дозой 15 Гр и 0,5 единицы ϵ' при дозе 30 Гр, что может быть связано с уплотнением структуры белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: БСА, ионизирующее излучение, диэлектрическая проницаемость, степень гидратации, СВЧ-диэлектрметрия.

В последние годы ионизирующее излучение (ИИ) широко используется в различных областях медицины и биологии. Широкое распространение получило использование рентгеновского и электронного излучений в лечебной практике и радиобиологии [1]. При этом возникают задачи выяснения биологических последствий действия ИИ на биообъекты. В связи с этим вопрос о механизмах действий ионизирующих излучений на основные биохимические компоненты живых систем – белки, нуклеиновые кислоты, липиды – является одним из главных в радиационной биологии и медицине и продолжает оставаться актуальным.

Развитие первичных физических процессов и радиационно-химических реакций, приводящих к нарушению структуры и функции белков, определяет во многом радиационную стойкость крови. Исследование таких нарушений становится особенно актуальным в связи с использованием ИИ в современной медицине для лечения целого ряда онкогенных заболеваний, а также для вирусной инактивации продуктов, получаемых из донорской крови [2–4]. В связи с этим исследование влияния γ -облучения на структуру сывороточного альбумина (СА), на долю которого приходится более 50 % общего содержания белка в сыворотке, представляет значительный интерес. СА играет ключевую роль в процессах транспорта физиологических метаболитов и лекарственных веществ, а также регуляции их уровня в крови. Изучению структуры этого белка и влияния различных физических факторов на изменение структурной подвижности молекулы СА посвящено много работ [5–7]. Однако состояние гидратного окружения белка при облучении остается невыясненным, хотя во многих работах указано, что изменение конформации белка под действием физических факторов приводит к изменению функциональной активности белка.

Такие исследования позволяют проводить метод СВЧ-диэлектрметрии в области дисперсии молекул воды, что дает возможность получить информацию о молекулярных взаимодействиях и о механизме молекулярных процессов, протекающих в биообъектах.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В данной работе использовали кристаллический препарат бычьего сывороточного альбумина (БСА) фирмы "Диа-М" производства США. Раствор БСА концентрации 100 мг/мл готовили путем растворения кристаллического альбумина в дистиллированной воде. Для получения растворов СА более низких концентраций исходный раствор разбавляли дистиллированной водой.

Растворы БСА концентраций 5–100 мг/мл облучали дозами 15 и 30 Гр источником ^{60}Co на установке типа «Исследователь». Мощность экспозиционной дозы составляла 380 Р/мин.

Измерения действительной части (ϵ') и мнимой части (ϵ'') комплексной диэлектрической проницаемости растворов альбумина проводились на СВЧ-диэлектрметре резонаторного типа на

частоте 9,2 ГГц при постоянной температуре 20°C [8]. Погрешность определения ϵ' не превышала 0,2 %, ϵ'' - 0,5%.

Вычисление степени гидратации белка проводилось по методике, описанной в работе [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование диэлектрических параметров растворов БСА в дистиллированной воде в интервале концентраций 5-100 мг/мл показало, что с ростом концентрации белка диэлектрическая проницаемость ϵ' (рис. 1 и 2 а) и диэлектрические потери ϵ'' (рис. 2 б) уменьшаются линейно. По нашим

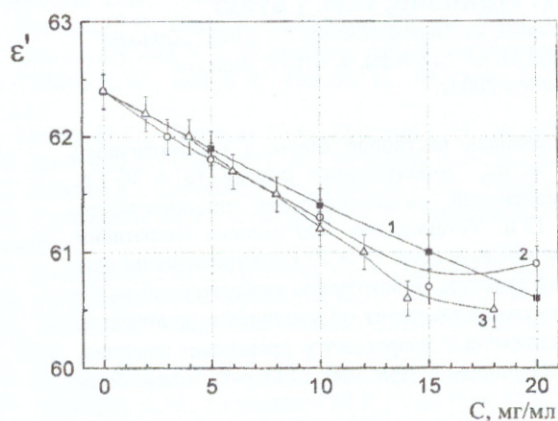


Рис. 1. Зависимости диэлектрической проницаемости ϵ' от концентрации нативного (1) и γ -облученных дозами 15 Гр (2) и 30 Гр (3) растворов БСА в дистиллированной воде.

данным при всех концентрациях степень гидратации БСА составляет 0,2–0,25 г/г, что согласуется с результатами, полученными другими методами [10], где авторы приводят значение 0,2 г/г для сывороточного альбумина человека (САЧ) при концентрации белка 48 мг/мл. Линейный характер зависимости диэлектрических параметров ϵ' и ϵ'' от концентрации БСА при 20°C свидетельствует о том, что диэлектрические свойства объемной воды во всех растворах не отличаются от диэлектрических свойств чистой воды. В этом случае значения эффективной диэлектрической проницаемости растворов определяются только соотношением их компонент. При растворении белка часть воды связывается и формирует гидратную оболочку макромолекулы. Следует ожидать, что количество связанной воды будет увеличиваться пропорционально концентрации белка и в целом при любой концентрации степень гидратации будет одинаковой. Таким образом, объемная доля гидратированного БСА в зависимости от концентрации белка должна быть линейной функцией, что и было получено в работе [11] в интервале концентраций до 80 мг/мл. Теоретические расчеты степени гидратации БСА по количеству молекул воды, присоединенных к заряженным группам белка, дают значение гидратации 0,23 г/г [12]. Экспериментально определенные методом диэлектрических измерений значения степени гидратации БСА составляют 0,1–0,18 г/г для жестко связанной воды и 0,18–0,42 г/г для не жестко связанной [12]. Таким образом, полученные нами величины гидратации включают всю жестко связанную воду и небольшое количество менее прочно связанной воды.

При облучении растворов БСА дозами 15 и 30 Гр концентрационная зависимость диэлектрической проницаемости ϵ' становится нелинейной и имеет сложный характер. Так, в интервале концентраций примерно до 20 мг/мл величина ϵ' облученных образцов меньше контроля (рис. 1), что свидетельствует об увеличении количества связанной белком воды. При дальнейшем увеличении концентрации величина ϵ' начинает возрастать и в интервале 20-100 мг/мл превышает контроль примерно на одну единицу ϵ' при 15 Гр и на 0,5 при 30 Гр (рис. 2 а). В этом же интервале концентраций наблюдается увеличение диэлектрических потерь в облученных дозой 15 Гр растворах БСА (рис. 2 б) и уменьшение гидратации макромолекул БСА до 0,1 г/г.

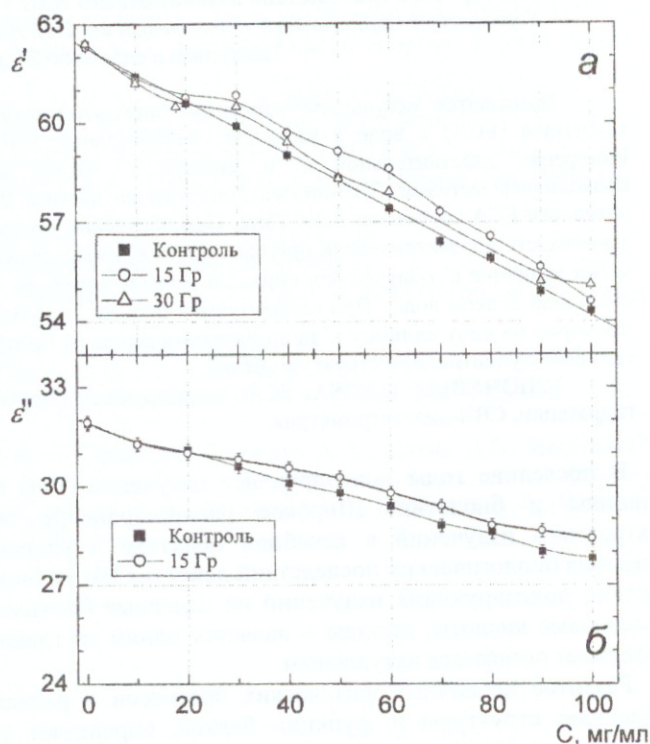


Рис. 2. Зависимости диэлектрической проницаемости ϵ' (а) и диэлектрических потерь ϵ'' (б) от концентрации нативного и γ -облученных дозами 15 и 30 Гр растворов БСА в дистиллированной воде.

Влияние ионизирующего излучения на структуру ...

Таким образом, представленные в настоящей работе данные аналогичны результатам исследования структурно-функциональных свойств САБ после вакуумного ультрафиолетового облучения [13]. Авторы установили, что при облучении дозами, не превышающими 72 кДж/моль, происходят конформационные перестройки в молекулах белка, а при больших дозах образуются ассоциаты белковых макромолекул. В нашем случае при γ -облучении происходят два процесса – разрыхление поверхности макромолекулы, которое может приводить к конформационным перестройкам, и агрегация САБ. Эти изменения, вероятно, происходят последовательно и существенно зависят от двух факторов – концентрации и дозы облучения. Чем больше концентрация белка в растворе, тем при меньшей дозе облучения начинается агрегация и наоборот.

Разнонаправленный характер изменения величины ϵ' облученных дозой 15 Гр растворов БСА при концентрациях до 20 мг/мл и после 20 мг/мл, видимо, связан с влиянием межмолекулярных взаимодействий на процесс радиационного поражения белка. В литературе неоднократно отмечалось, что влияние γ -облучения на конформацию белков особенно зависит от такого фактора, как концентрация [14]. Считается, например, что значительно снизить повреждающий эффект радиации можно путем разбавления биопродукта до облучения [15]. При низких концентрациях межмолекулярные взаимодействия незначительны и на свойства облученных растворов, по-видимому, влияют исключительно радиационно-индуцированные изменения структуры БСА. Даже незначительные изменения структуры белка могут привести к изменению свойств ближайшего окружения макромолекулы, что и отразится на диэлектрических свойствах раствора в целом. Разрыхление поверхности белка под действием радиации можно объяснить разрывом полипептидных цепей и их фрагментацией [14]. Участки полипептидных цепей, находящиеся на поверхности макромолекулы, являются наиболее доступными для продуктов радиолитической воды и, следовательно, подвергаются их действию в первую очередь. Происходит реакция α -углеродных радикалов с кислородом с образованием пероксидрадикалов, которые разрывают на фрагменты полипептидную цепь при α -углероде. Результатом разрыва ковалентных связей может быть появление в растворе свободных аминокислот и полипептидов, продуктов деградации белка с небольшим молекулярным весом, однако эти процессы являются специфичными по отношению к каждому отдельному белку [14, 16, 17]. Для БСА, например, не характерно образование мелких фракций [17]. Однако даже незначительные изменения первичной структуры белка, вызванные гидроксидными и супероксиданионрадикалами, образующимися при радиолитическом разрыве, могут привести к нарушению вторичной и третичной структуры. В настоящее время твердо установлено, что любые локальные микрохимические изменения белковой макромолекулы способны приводить к существенным конформационным и конфигурационным перестройкам биополимера [18]. Нарушения нативной конформации белка под действием γ -облучения даже при небольших дозах могут приводить к потере его функциональной активности [14].

Второй тип радиационноиндуцированных изменений структурного состояния белков – это образование сшивок и агрегация макромолекул, которые часто имеют место при облучении водных растворов белков [19]. При высоких концентрациях белка благодаря межмолекулярным взаимодействиям повышается вероятность образования сшивок между макромолекулами. После облучения ковалентные сшивки образуются также между свободными аминокислотами и белками и между пептидами и белками [14]. В растворе появляются олигомеры и агрегаты с большим молекулярным весом, образующие при электрофорезе полосы выше основной линии [14]. Следствием этих процессов является общее уменьшение количества связанной воды в растворе. По-видимому, увеличение ϵ' облученных образцов по сравнению с контролем при концентрациях выше 20 мг/мл (рис.2) следует объяснять уменьшением степени гидратации БСА в результате агрегации. Вероятно, в этом случае процесс агрегации доминирует над процессом радиационно-индуцированных изменений структуры БСА.

Таким образом, в нашем случае можно предположить, что при γ -облучении растворов БСА имеют место два процесса – разрыхление поверхности макромолекулы, которое может приводить к конформационным перестройкам, и агрегация БСА. Эти изменения, вероятно, происходят последовательно и существенно зависят от двух факторов – концентрации и дозы облучения. Чем больше концентрация белка в растворе, тем при меньшей дозе облучения начинается агрегация и наоборот.

ВЫВОДЫ

1. С увеличением концентрации от 5 до 100 мг/мл диэлектрические параметры растворов БСА в дистиллированной воде уменьшаются линейно. При этом степень гидратации макромолекул БСА остается постоянной и составляет 0,2 г/г.
2. При облучении растворов БСА дозами 15 и 30 Гр концентрационная зависимость диэлектрической проницаемости ϵ' имеет сложный характер. В интервале концентраций до 20

мг/мл величина ϵ' облученных образцов меньше контроля, что свидетельствует об увеличении количества связанной белком воды. При концентрации больше 20 мг/мл величина ϵ' возрастает и превышает контроль примерно на одну единицу ϵ' при облучении дозой 15 Гр и на 0,5 при 30 Гр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпакова А.П., Леднев Ю.А., Булычева Т.И., Сахибов Я.Д., Медведский А.Г. Воздействие γ -облучения в возрастающих дозах на пролиферативную способность остаточных донорских лимфоцитов компонентов крови, оцениваемую в реакции MLC // Проб. гематологии и переливания крови – 2005. – вып.1. – с.39 – 41.
2. Miekka S.I., Busby T. F., Reid B., et al. New methods for inactivation of lipid-enveloped and nonenveloped viruses // Haemophilia. – 1998. – V. 4, №4. – P. 402 – 408.
3. Miekka S.I., Forng R.-Y., Rohwer R.G. et all. Inactivation of viral and prion pathogens by γ -irradiation under conditions that maintain the integrity of human albumin // Vox Sanguinis. – 2003. – V. 84, №1. – P. 36 – 44.
4. Переслегин И.А., Саркисян Ю.Х. Клиническая радиология. – М.: Медицина, – 1973. – 456 с.
5. Нямаа Д., Бат-эрдэнэ О., Бурштейн Э.А. Влияние среды на функциональные и структурные свойства сывороточных альбуминов. II. Влияние температуры на N-форму сывороточного альбумина человека // Мол. биол. – 1984. – Т. 18, вып. 4. – с. 972 – 978.
6. Соркина Д.А. Функциональные свойства сывороточного альбумина. // Вопр. мед. химии – 1988. – Т. 34, вып. 2. – с.68 – 75.
7. Соркина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. – К.: Высшая школа, 1990, – 495 с.
8. Николов О.Т., Жиликова Т.А Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями // Журнал физической химии. – 1991. – Т.65, №5. – С. 1417 – 1420.
9. Buchanan T.J., Haggis J.H., Hasted J.B., Robinson B.J. The dielectric estimation of protein hydration // Proc. Roy. Soc. – 1952. – A 213. – P. 379-391.
10. Rupley J.A., Carreri G. Protein hydration and function // Adv. Protein Chem. – 1991. – V. 41. – P. 137 – 172.
11. Suzuki M., Shigematsu J., Kodama T. Hydration Study of Proteins in Solution by Microwave Dielectric Analysys // J. Phys. Chem. – 1996. – V. 100. – P. 7279-7282.
12. Buchanan T.J., Haggis J.H., Hasted J.B., Robinson B.J. The dielectric estimation of protein hydration // Proc. Roy. Soc. – 1952. – A 213. – P. 379-391.
13. Пантявин А.А., Артюхов В.Г., Вашанов Г.А. Модификация физико-химических свойств молекул сывороточного альбумина, индуцированная вакуумным ультрафиолетовым излучением // Вестник ВГУ. Серия химия, биология. – 2000. – С. 122-125.
14. Moon S., Song K.B. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of egg white proteins // Food Sci. Biotechnol. – 2000. – V. 9, №4. – P. 239-242.
15. Пат. 663522 США. Method of sterilizing products: Пат. 663522 / Kent; Randall S. (США), Clearant, Inc. – № 985606, Опублик. 21.10.03. – [US Patent 6635222](#)
16. Жоли М. Физическая химия денатурации белков. – М.: Мир, 1968. – 364 с.
17. Бовей Ф. Действие ионизирующих излучений на природные и синтетические полимеры. – М., Изд-во иностр. лит., 1959. – 295 с.
18. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. – М.: Наука, 1977. – 336 с.
19. Hay M., Zakrzewski K. Molecular aggregation and serological specificity of human serum albumin irradiated in solution // Radiat Res. – 1968. – V. 34. – P. 396-410.