

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ДСК ВЛИЯНИЯ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ТЕРМОДЕНАТУРАЦИЮ ПЛАЦЕНТАРНОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА**А.В. Зинченко, О.А. Горобченко*, О.А. Нардид, О.Т. Николов****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23, Харьков 61015, Украина***Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*

Поступила в редакцию 20 марта 2013 года

Принята 30 апреля 2013 года

В работе исследовано методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) влияние различных доз гамма-облучения в диапазоне 60-10000 Гр на процесс денатурации плацентарного сывороточного альбумина человека. Проведена оценка комбинированного воздействия облучения и замораживания до температуры жидкого азота на сывороточный альбумин в растворе. Облучение образцов проводили при комнатной температуре на гамма-установке «Исследователь» источником Co^{60} при мощности экспозиционной дозы 120 Р/мин. В результате проведенного исследования было установлено, что гамма-облучение растворов плацентарного альбумина приводит к разрыхлению макромолекул, явно выраженному уже при дозе 1729 Гр, и последующему разрушению их структуры. Снижение кооперативных процессов при плавлении начинается при малых дозах облучения (60 Гр). Показано, что охлаждение растворов альбумина до температуры жидкого азота как до, так и после облучения вносит дополнительный вклад в деструктивные процессы, происходящие с макромолекулами альбумина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: плацентарный альбумин, гамма-облучение, дифференциальная сканирующая калориметрия, денатурация.

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДОМ ДСК ВПЛИВУ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ І ЗАМОРОЖУВАННЯ НА ТЕРМОДЕНАТУРАЦІЮ ПЛАЦЕНТАРНОГО СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ**О.В. Зинченко, О.О. Горобченко*, О.А. Нардид, О.Т. Николов****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна***Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*

В роботі досліджено методом диференційної скануючої калориметрії (ДСК) вплив різних доз гамма-опромінення у діапазоні 60-10000 Гр на процес денатурації плацентарного сироваткового альбуміну людини. Проведена оцінка комбінованого впливу опромінення і заморожування до температури рідкого азоту на сироватковий альбумін у розчині. Опромінення зразків проводили при кімнатній температурі на гамма-установці «Исследователь» джерелом Co^{60} при потужності експозиційної дози 120 Р/хв. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що гамма-опромінення розчинів плацентарного альбуміну призводить до розрихлення макромолекул, явно вираженого вже при дозі 1729 Гр, і наступному руйнуванню їх структури. Зниження кооперативних процесів при плавленні починається при малих дозах опромінення (60 Гр). Показано, що охолодження розчинів альбуміну до температури рідкого азоту як до, так і після опромінення вносить додатковий вклад в деструктивні процеси, що відбуваються з макромолекулами альбуміну.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: плацентарний альбумін, гамма-опромінення, диференційна скануюча калориметрія, денатурація.

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF GAMMA-IRRADIATION AND FREEZING ON THE THERMODENATURATION OF PLACENTAL HUMAN SERUM ALBUMIN BY THE METHOD OF DSC**A.V. Zinchenko, O.A. Gorobchenko*, O.A. Nardid, O.T. Nikolov***

*Institute of problem of cryobiology and cryomedicine, NAS of Ukraine,
Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkov 61015, Ukraine*

**V.N. Karazin Kharkov National University, 4, Svobody Sq., Kharkov 61022, Ukraine*

In the paper the influence of various doses of gamma-irradiation (60-10000 Gy) on the process of the denaturation of placental human serum albumin was investigated by the method of differential scanning calorimetry (DSC). The combined affect of radiation and freezing down to the temperature of liquid nitrogen on serum albumin in solution was carried out. The samples was irradiated at room temperature on gamma-apparatus «Issledovatel» by Co^{60} gamma-quanta on power of the exhibition dose of 120 R/min. In the result of the study it was found that gamma-irradiation of placental albumin led to the loosening of macromolecules obviously evinced already at the dose of 1729 Gy and subsequent destruction of their structure. The lowering of cooperative processes at melting begins at low doses of radiation (60 Gy). It was showed that the cooling of albumin solutions down to the temperature of liquid nitrogen both before and after irradiation introduces the additional contribution to destructive processes taking place with albumin macromolecules.

KEY WORDS: placental albumin, gamma-irradiation, differential scanning calorimetry, denaturation.

Изучению влияния гамма-облучения на структурные и физико-химические свойства белков, как в твердом состоянии, так и в водной среде посвящено множество работ. Интерес к исследованиям подобного рода обусловлен, прежде всего, широким применением ионизирующих излучений в радиационной медицине, а также для стерилизации биологических продуктов, получаемых из крови [1], и пищевых продуктов [2, 3]. Рядом авторов [2-9] показана различная степень влияния гамма-облучения на изменения в белках. В частности, наблюдаются модификация аминокислот, разрушение пептидных и водородных связей, дисульфидных мостиков и ряд других изменений, влияющих на структуру белков и их физико-химические свойства. Замораживание препаратов, содержащих белки, до температуры жидкого азота (-196 °C) широко применяется в технологиях их хранения в течение длительного периода времени. Установлено влияние низких температур на размер агрегатов белков в сыворотке крови, а также условия замораживания, позволяющие предотвратить агрегирование [10].

Известно, что метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) нашел широкое применение для исследования тепловых процессов, происходящих в биологических системах разного уровня организации после воздействия различных физико-химических факторов, в том числе и облучения. В частности, этот метод успешно используется для изучения тепловой денатурации белков [11-14], ДНК [15] и других макромолекул.

Целью данной работы являлось выявление особенностей конформационной и структурной стабильности альбумина из сыворотки плацентарной крови человека под действием различных доз гамма-облучения и охлаждения до температуры жидкого азота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран медицинский препарат «Раствор альбумина плацентарного 10%», получаемого из сыворотки плацентарной крови человека (производство – Укрмедбиопрот Украины, Киевское предприятие по производству бакпрепаратов «Биофарма»). Исходный препарат альбумина разбавляли Na-фосфатным буфером (рН 7,4) до конечной концентрации белка 8 мг/мл. Гамма-облучение растворов плацентарного альбумина проводили при комнатной температуре на гамма-установке «Исследователь» (СССР) источником Co^{60} при мощности экспозиционной дозы 120 Р/мин. Поглощенную дозу контролировали при помощи метода ферросульфатной дозиметрии [16]. Облучение осуществляли при комнатной температуре окружающей среды. Поглощенные дозы облучения составляли 60-10000

Гр. Замораживание до -196°C осуществляли путем погружения пластиковых ампул с образцами в жидкий азот. Оттаивание проводили на водяной бане при 37°C .

ДСК измерения выполняли в температурном диапазоне от 30 до 90°C со скоростью нагрева 1 град/мин, используя дифференциальный адиабатический сканирующий калориметр ДАСМ-4 (СКББП АН СССР, Пущино). Началом отсчета времени являлась температура 0°C . Погрешность измерения температуры $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. В ячейку-свидетель помещали Na-фосфатный буфер. На основе полученных термограмм облученных образцов вычислены температуры и энтальпии плавления альбумина. Для описания профилей эндотермических эффектов были определены температуры полуширины $\Delta T_{1/2}$. Погрешность измерения полуширины интервала перехода вычислялась по результатам 2-3 измерений. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США). Данные в таблицах для ΔH и $\Delta T_{1/2}$ приведены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе проведено исследование дозовой зависимости процесса денатурации альбумина из сыворотки плацентарной крови человека. С этой целью использовали как малые (от 60 до 475 Гр), так и относительно высокие (1729 - 10000 Гр) дозы гамма-облучения. Вычисленные значения температур, энтальпий плавления и полуширины необлученного (контрольного) и облученных различными дозами образцов альбумина приведены в таблице 1. Суммарная энтальпия (содержащая непосредственно энтальпию эффекта денатурации и возможный предденатурационный эффект) была вычислена из термограммы в широком температурном диапазоне, начиная с точки, в которой регистрируется начало подъема кривой ДСК.

Таблица 1

№	Доза гамма-облучения, Гр	Температура плавления t , $^{\circ}\text{C}$	Энтальпия плавления ΔH , Дж/г	Полуширина $\Delta T_{1/2}$, $^{\circ}\text{C}$
1	0	78,1	$17,4 \pm 0,8$	$6,6 \pm 0,2$
2	60	76,6	$16,7 \pm 0,6$	$7,1 \pm 0,2$
3	100	76,7	$17,8 \pm 0,7$	$7,9 \pm 0,2$
4	150	76,0	$17,8 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,2$
5	475	77,5	$17,8 \pm 0,7$	$8,2 \pm 0,2$
6	1729	76,8	$15,8 \pm 0,6$	$12,4 \pm 0,3$
7	10000	75,1	$9,8 \pm 0,4$	$18,6 \pm 0,3$

На рис. 1 приведены примеры профилей эндотермических эффектов для контрольного образца и некоторых облученных образцов. На основании анализа полуширины пиков плавления и анализа их формы (полуширина и симметрия) можно судить о степени кооперативности процесса денатурации. Из экспериментальных данных, представленных на рис. 1 и в таблице 1, следует, что пик плавления контрольного (необлученного) образца имеет самое низкое значение полуширины и симметричную форму. Эти факты свидетельствуют о максимальной степени кооперативности денатурационного перехода (кооперативного плавления белка) в ряду исследуемых образцов. С ростом дозы гамма-излучения водных растворов альбумина эндотермический пик плавления уширяется (рис. 2, таблица 1), что указывает на снижение кооперативности процесса плавления.

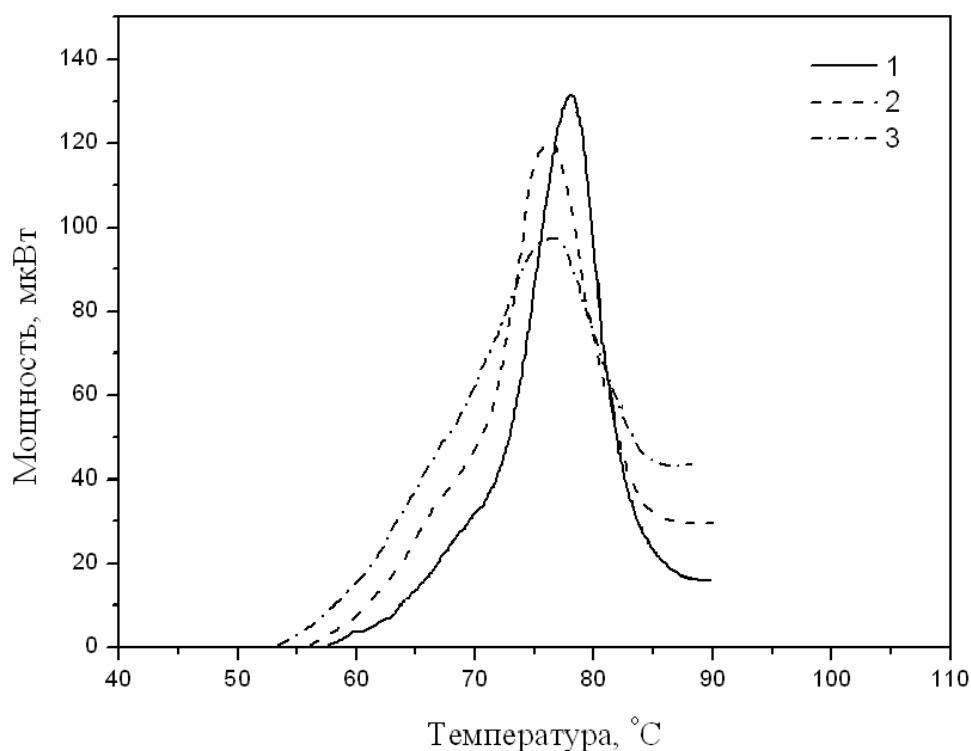


Рис. 1. ДСК термограммы плацентарного альбумина, зарегистрированные при следующих условиях: 1 – контрольный образец; 2 – доза облучения 150 Гр; 3 – доза облучения 1729 Гр.

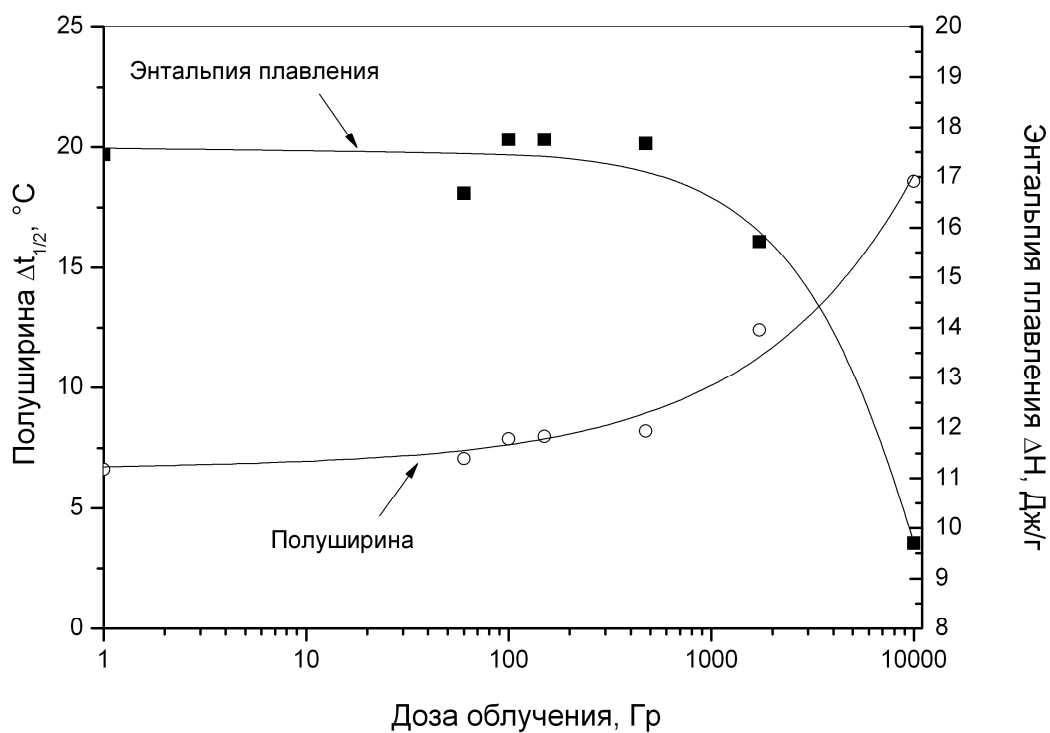


Рис. 2. Зависимость значений энтальпии и полуширины пиков плавления альбумина от дозы гамма-облучения.

Облучение водных растворов альбумина малыми дозами гамма-излучения влияет на конформационную стабильность молекул. При этом значения энтальпии меняются незначительно, а температуры плавления несколько снижаются, что наблюдается также и при УФ-облучении САЧ [17]. Кооперативность процесса денатурации плацентарного САЧ начинает снижаться даже при таких малых дозах облучения как 60 Гр. Такие нарушения конформации могут приводить к изменению гидратации макромолекул после облучения, что проявляется в наблюдаемых на термограммах отличиях в ΔC_p контрольного и облученных образцов. Данное предположение подтверждается нашими предыдущими работами по исследованию влияния γ -облучения на сывороточный альбумин быка (САБ) методом спиновых зондов и СВЧ-диэлектротрии [18, 19]. Было обнаружено, что с увеличением дозы облучения гидратация САБ увеличивается в интервале доз 10-100 Гр. Это может быть следствием разрыхления поверхности макромолекул, о чем свидетельствует увеличение подвижности и эффективное растормаживание радикала, находящегося на поверхности САБ, при дозе облучения 100 Гр.

Увеличение дозы облучения до 1729 Гр и выше приводит к понижению энтальпии плавления белка, что указывает на явно выраженное разрыхление молекул альбумина (рис. 2, табл. 1). Особенно это выражено для образца, облученного дозой 10 кГр. При этой дозе облучения происходит, скорее всего, значительное разрушение структуры молекул альбумина вследствие процессов фрагментации полипептидных цепей белка, образования сшивок и агрегации [20, 1].

Наблюдаемые нами отличия в ΔC_p необлученного и облученных образцов плацентарного САЧ (рис. 1) аналогичны отличиям в ΔC_p нативного и предварительно нагретых до 60-100 °С образцов бычьего сывороточного альбумина (БСА) [21]. Снижение процента обратимости денатурационного процесса с увеличением температуры предварительного нагрева объясняется автором этой работы агрегацией развернутых макромолекул белка при высоких температурах. По данным ДСК конформационные изменения и агрегация САЧ происходят и при УФ-облучении белка ($\lambda=254$ нм) [17]. Полученные нами результаты согласуются и с данными других методов исследования влияния γ -облучения на сывороточный альбумин [22]. Так, при дозах облучения 1 и 5 кГр методом светорассеяния было обнаружено снижение молекулярной массы БСА; методом УФ-спектроскопии были зафиксированы разрывы ковалентных связей, образование агрегатов и разрушение упорядоченной структуры полипептидных цепей; методом ИК-спектроскопии – образование β -листов [22].

В работе предпринята попытка оценить вклад в теплофизические параметры процесса охлаждения водных растворов плацентарного альбумина до температуры жидкого азота. С этой целью водный раствор плацентарного альбумина концентрации 8 мг/мл подвергали предварительному охлаждению до температуры -196°С и последующему облучению после отогрева до комнатной температуры дозой 1729 Гр. Теплофизические параметры данного образца сравнивали с таковыми для образца, который предварительно облучали дозой 1729 Гр, затем охлаждали до -196°С и нагревали до комнатной температуры. Термограммы, зарегистрированные для этих образцов, приведены на рис. 3. Расчетные данные теплофизических параметров, полуширины теплового эффекта и экспериментальные условия приведены в таблице 2.

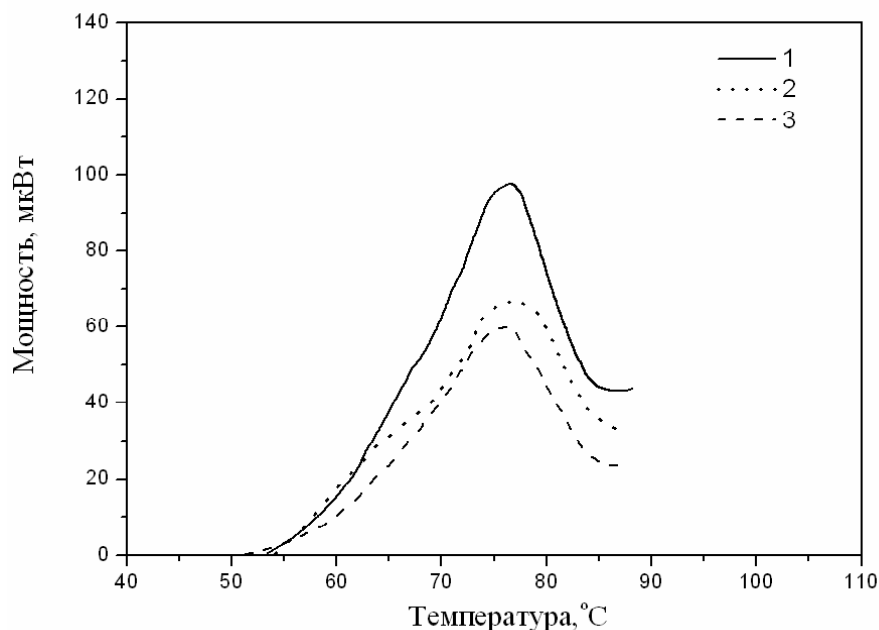


Рис. 3. ДСК термограммы плацентарного альбумина концентрации 8 мг/мл: 1 – доза облучения 1729 Гр; 2 – термограмму регистрировали после охлаждения до -196°C , нагрева до комнатной температуры и последующего облучения дозой 1729 Гр; 3 – термограмму регистрировали после гамма-облучения образца дозой 1729 Гр, охлаждения до температуры жидкого азота и нагрева до комнатной температуры.

Таблица 2

Замораживание до -196°C	Доза гамма-облучения, Гр	Температура плавления t , $^{\circ}\text{C}$	Энтальпия плавления ΔH , Дж/г.	Полуширина $\Delta T_{1/2}$, $^{\circ}\text{C}$
-	1729	76,8	$15,2 \pm 0,8$	$12,4 \pm 0,2$
до облучения	1729	76,9	$11,85 \pm 0,6$	$14,9 \pm 0,3$
после облучения	1729	75,9	$9,95 \pm 0,4$	$12,8 \pm 0,2$

Из представленных данных следует, что процесс охлаждения водных растворов плацентарного альбумина до температуры жидкого азота вносит дополнительный вклад в изменение конформационной стабильности белков. Однако более значительный вклад в разрушение структуры молекул альбумина оказывает режим, при котором образцы сначала подвергались облучению, а затем низкотемпературному воздействию. На это указывает уменьшение величины энтальпии и снижение температуры пика плавления при данном режиме. Уменьшение значения полуширины пика в последнем случае обусловлено, вероятнее всего, разрушением структуры молекул альбумина, а не снижением кооперативности процесса плавления.

ВЫВОДЫ

Гамма-облучение растворов плацентарного альбумина приводит к разрыхлению макромолекул, наблюдаемому при дозе 1729 Гр. Снижение кооперативных процессов при плавлении начинается при малых дозах облучения (60 Гр). Охлаждение растворов альбумина до температуры жидкого азота как до, так и после облучения вносит дополнительный вклад в разрушение структуры белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. United States Patent 6,635,222. Method of sterilizing products / Kent; Randell S. (Thousand Oaks, Ca) – Appl. No: 985606; Issued: Oct. 21, 2003; Filed: Nov. 5, 2001.
2. Delincee H. Protein aggregation in foods models: effect of γ -irradiation and lipid oxidation / H. Delincee, P. Pushpa // *Journal of Food Processing and Preservation*. – 1981. – V. 5. – P. 145–159.
3. The effect of irradiation on technological properties and protein solubility of broiler chicken meat / J. Zabielski, J. Kijowski, W. Fiszer, J. Niewiarowicz // *Sci. Food Agric.* – 1984. – V. 35. – P. 662–670.
4. Nisizawa M. Radiation induced sol-gel transition of protein: effect of radiation on amino-acid composition and viscosity / M. J. Nisizawa // *Appl. Polym. Sci.* – 1988. – V. 36. – P. 979–981.
5. Bernofsky C. Biochemistry of myoglobin. VI. The effect of low dosage gamma irradiation on beef myoglobin / C. Bernofsky, J. B. Fox Jr, B. S. Schweigert // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – V. 80. – P. 9–21.
6. Ambe K. S. Radiation damage to cytochrome C and hemoglobin / K. S. Ambe, U. S. Kumta, A. I. Tappel // *Radiat. Res.* – 1961. – V. 15. – P. 709–719.
7. Brown W. D. γ -irradiation of purified myoglobins. 1. Effect on physicochemical properties / W. D. Brown, J.-H. Argiroudi Akoyunoglou // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1964. – V. 107. – P. 239–245.
8. Puchała M. γ -irradiation of aquas solutions of human hemoglobin in atmospheres of air and argon / M. Puchała, Z. Szveda-Lewandowska, W. Leyko // *Radiat. Res.* – 1979. – V. 78. – P. 379–389.
9. Witburn K. D. Interaction of radiation-generated radicals with myoglobin in aquas solutions - II. / K. D. Witburn, M. Z. Hoffman *Radiat. Phys. Chem.* – 1984. – V. 23. – P. 271–278.
10. Состояние белков сыворотки кордовой крови после замораживания / Э. О. Нардид, Е. Д. Розанова, Л. В. Цымбал [и др.] // *Биофизика*. – 2009. – Т. 54, Вып. 5. – С. 881–886. /Sostojanje belkov syvorotki kordovoj krvi posle zamorazhivaniya / Je. O. Nardid, E. D. Rozanova, L. V. Cymbal [i dr.] // *Biofizika*. – 2009. – Т. 54, Vyp. 5. – С. 881–886./
11. Ma C. Y. Studies on thermal denaturation of oat globulin by differential scanning calorimetry / C. Y. Ma, V.R. Harwalkar // *J. Food Sci.* – 1988. – V. 53. – P. 531–534.
12. Liu T. X. Thermal denaturation and heat induced gelation properties of γ -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters / T. X. Liu, P. Relkin // *Thermochim. Acta.* – 1994. – V. 243. – P. 387–403.
13. Relkin P. Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation / P. Relkin // *Thermochim. Acta.* – 1994. – V. 243. – P. 371–386.
14. Зинченко А. В. Сравнительное микрокалориметрическое плавление гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия / А. В. Зинченко, А. С. Соловьева // *Проблемы криобиологии*. – 2000. – № 1. – С. 32–35. /Zinchenko A. V. Sravnitel'noe mikrokalorimetricheskoe plavlenie gemoglobina iz donorskoj i kordovoj krvi do i posle nizkotemperaturnogo vozdejstvija / A. V. Zinchenko, A. S. Solov'eva // *Problemy kriobiologii*. – 2000. – № 1. – С. 32–35./
15. Переход ДНК в компактное состояние при связывании с ионами меди в растворах криопротекторов / Е. В. Хакл, С. В. Корнилова, А. В. Зинченко [и др.] // *Проблемы криобиологии*. – 1998. – № 3. – С. 67–69. /Perehod DNK v kompaktnoe sostojanie pri svyazyvanii s ionami medi v rastvorah krioprotektorov / E. V. Hakl, S. V. Kornilova, A. V. Zinchenko [i dr.] // *Problemy kriobiologii*. – 1998. – № 3. – С. 67–69./
16. Хенли Э. Радиационная химия / Э. Хенли, Э. Джонсон. – М.: Атомиздат, 1974. – 415 с. /Henli Je. Radiacionnaja himija / Je. Henli, Je. Dzhonson. – M.: Atomizdat, 1974. – 415 s./
17. Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin / A. Michnik, K. Michalik, Z. Drzazga // *Journal of Photochemistry and Photohiology B: Biology*. – 2008. – V. 90. – P. 170–178.
18. Исследование влияния γ -облучения на структуру бычьего сывороточного альбумина методом спиновых меток / О. А. Горобченко, О. Т. Николов, О. А. Нардид // *Прикладная радиоэлектроника*. – 2004. – Т. 2, № 1. – С. 84–87. /Issledovanie vlijaniya γ -obluchenija na strukturu bych'ego syvorotochnogo al'bumina metodom spinovyh metok / O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, O. A. Nardid // *Prikladnaja radiojelektronika*. – 2004. – Т. 2, № 1. – С. 84–87./
19. Conformation transitions of blood proteins under influence of physical factors on microwave dielectric method / O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, S. V. Gatash // *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. – 2006. – V. 102. – P. 18–24.
20. Moon S. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of egg white proteins / S. Moon, K. B. Song // *Food. Sci. Biotechnol.* – 2000. – V. 9. – P. 239–242.
21. Michnik A. Thermal stability of bovine serum albumin DSC study / A. Michnik // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2003. – V. 71. – P. 509–519.
22. Gaber M. H. Effect of γ -Irradiation on the Molecular Properties of Bovine Serum Albumin / M. H. Gaber // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2005. – V. 100, №. 2. – P. 203–206.