

УДК 614.876+547.962.3+543.426

СОСТОЯНИЕ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ АЛЬБУМИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ДИАПАЗОНЕ МАЛЫХ ДОЗ

Н.Д. Пузан*, И.А. Чешик*, В.Н. Беляковский**

*Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

**Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

В настоящее время облучение в малых дозах является растущей проблемой в современном обществе, поскольку многие люди потенциально подвергаются его воздействию. Безопасная доза этого типа излучения была определена в соответствии с рекомендациями НКДАР ООН, тем не менее влияние низких доз облучения на развитие заболеваний не изучалось, поэтому для уменьшения беспокойства общественности необходимы дальнейшие исследования в данной области.

Цель исследования – методами флуоресцентной спектроскопии изучить косвенное действие малых доз ионизирующего излучения на молекулу бычьего сывороточного альбумина.

Материал и методы. Исследование проводилось в двух направлениях: 1) облучение фосфатного буфера (рН = 7,3), используемого потом для приготовления раствора альбумина (предварительное облучение буфера); 2) облучение буферного раствора альбумина целиком. О наличии структурно-функциональных (конформационных) изменений в молекуле альбумина судили по изменению значений собственной ($\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$) и зондовой ($\lambda_{\text{возб}} = 320 \text{ нм}$) флуоресценции. Статистическая обработка полученных данных проводилась посредством программы «Statistica 7.0».

Результаты и их обсуждение. Методом собственной флуоресценции показано, что при предварительном облучении буфера, применяемого для приготовления раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), сразу после снятия раствора с Cs137-источника (0 мин) наблюдается статистически значимое снижение средних значений флуоресценции на 2,01% (при сравнении с интактным раствором), а при облучении раствора БСА целиком, сразу после снятия раствора с Cs137-источника, фиксируется статистически значимое увеличение средних значений флуоресценции на 3,32%. Методом зондовой флуоресценции установлено, что при предварительном облучении буфера, используемого далее для приготовления раствора БСА, сразу после снятия раствора с Cs137-источника (0 мин) устанавливается статистически значимое увеличение средних значений флуоресценции на 14,10% (при сравнении с интактным раствором), а при облучении раствора БСА целиком, сразу после снятия раствора с Cs137-источника, наблюдается статистически значимое уменьшение средних значений флуоресценции на 8,81%.

Заключение. Полученные данные позволяют говорить о наличии реакции со стороны БСА на косвенное действие малых доз ионизирующего излучения, молекула белка ведет себя по-разному при нахождении в предварительно облученном буфере и при облучении целиком буферного раствора альбумина.

Ключевые слова: малые дозы ионизирующего излучения, бычий сывороточный альбумин, собственная флуоресценция, зондовая флуоресценция.

THE STATE OF THE TERTIARY STRUCTURE OF ALBUMIN UNDER THE ACTION OF IONIZING RADIATION IN THE LOW DOSE RANGE

N.D. Puzan*, I.A. Cheshik*, V.N. Beliakovski**

*State Science Establishment "Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus"

**Education Establishment "Gomel State Medical University"

Currently, low-dose radiation is a growing problem in modern society, since many people are potentially exposed to it. The safe dose of this type of radiation was determined in accordance with the recommendations of the UNO SCEAR, however, the effect of low doses of radiation on the development of diseases has not been studied, therefore, further research in this area is needed to reduce public concern.

The research objective is to study the indirect effect of low doses of ionizing radiation on the bovine serum albumin molecule using fluorescence spectroscopy.

Materials and methods. The study was conducted in 2 directions: 1) irradiation of a phosphate buffer (pH = 7,3), which is then used to prepare an albumin solution (pre-irradiation of the buffer); 2) irradiation of the albumin buffer solution completely. The presence of structural and functional (conformational) changes in the albumin molecule was judged by changes in the values of intrinsic ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) and probe ($\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$) fluorescence. Statistical processing of the obtained data was carried out using "Statistica 7.0" program.

Findings and their discussion. Using the method of intrinsic fluorescence, it was shown that upon preliminary irradiation of the buffer used later to prepare a solution of bovine serum albumin (BSA), immediately after removing the solution from the Cs137-source (0 min), a statistically significant decrease in the average fluorescence values was observed by 2,01% (when compared with an intact solution), and upon irradiation of the entire BSA solution, immediately after removing the solution from the Cs137-source, there was a statistically significant increase in the average fluorescence values by 3,32%. By the method of probe fluorescence, it was found that upon preliminary irradiation of the buffer used later to prepare the BSA solution, immediately after removing the solution from the Cs137-source (0 min), a statistically significant increase in the average fluorescence values was observed by 14,10% (when compared with an intact solution), and upon irradiation of the entire BSA solution, immediately after removing the solution from the Cs137-source, there is a statistically significant decrease in the average fluorescence values by 8,81%.

Conclusions. The data obtained suggest the presence of a reaction on the part of BSA to the indirect effect of small doses of ionizing radiation, and the protein molecule behaves differently when it is in a pre-irradiated buffer and when the entire buffer solution of albumin is irradiated.

Key words: low doses of ionizing radiation, bovine serum albumin, intrinsic fluorescence, probe fluorescence.

Изучение биологических эффектов малых доз ионизирующего излучения (ИИ) является одной из центральных проблем современной радиобиологии, требующей привлечения все новых подходов для ее решения [1].

До сих пор мало известно о последствиях низкого уровня воздействия радиации и более глубокое знание механизмов действия малых доз ИИ поможет лучше оценить риски, пересмотреть стандарты радиационной защиты и возможные достижения в области терапии [2].

Люди ежедневно подвергаются воздействию низких доз ИИ, в том числе медицинскому диагностическому облучению, профессиональному воздействию и естественному излучению различными способами. Биологические эффекты этого низкодозового ИИ сильно отличаются от эффектов высокодозового ИИ. В то время как использование линейной беспороговой модели хорошо зарекомендовало себя во всем мире в правилах радиационной безопасности за последние несколько десятилетий, научное сообщество продолжает обсуждать целесообразность ее применения. Поэтому многие международные организации отмечают, что весьма актуально получение новых данных о воздействии ИИ в низких дозах на молекулярном и клеточном уровнях, а также на животных и человека [3].

Известно, что ИИ повреждает жизненно важные внутриклеточные биомолекулы, что приводит к множественным повреждениям клеток и тканей. Такие повреждения могут быть вызваны прямой ионизацией биомолекул (прямое действие ИИ), но почти в 70% случаев за счет радиолиза внутриклеточной воды с образованием активных форм кислорода (АФК) и свободных радикалов (косвенное действие ИИ) [4].

В настоящее время в мире накоплен огромный материал по изучению альбумина, и число работ, посвященных данному белку, растет, что объясняется активным использованием указанного белка в медицине и теми научными вопросами, которые возникают в связи с этим [5]. А изучение поведения белка в водных растворах имеет существенное значение не только для биомедицинских наук, а также смежных технологий [6].

Цель работы – исследование косвенного действия малых доз ИИ на структурно-функциональное состояние бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Материал и методы. С целью изучения радиационно-индуцируемых изменений сывороточного альбумина при облучении малыми дозами ИИ использовались следующие реактивы: БСА при концентрации 0,6 мг/мл; фосфатный буфер (pH = 7,3); зонд 1-анилино-8-нафталинсульфонат (АНС) при концентрации 0,4 мг/мл; спектрометрический источник гамма-излучения на основе радионуклида Cs¹³⁷ закрытого типа в форме диска из металлического сплава диаметром 25 мм (активность по паспорту на 2020 год – 260 Бк (доверительные границы суммарной погрешности результата измерения активности при вероятности 0,95 – 7%); период полураспада – 30,17 ± 0,16 лет; дата выпуска – 15 июля 2002 года; мощность дозы 0,17 мкЗв/ч (погрешность 15%) согласно дозиметру-радиометру МКС-АТ 6130).

Косвенное действие ИИ на молекулу БСА изучалось 2 способами: 1-й способ – предварительное облучение буфера (Cs¹³⁷-источником ИИ на протяжении 15 часов), который в последующем использовался для приготовления буферного раствора БСА. 2-й способ – облучение целиком буферного раствора БСА (Cs¹³⁷-источником ИИ на протяжении 15 часов). Таким образом, были проанализированы следующие растворы:

- 1 раствор (интактный) – буферный раствор БСА (кратность проведения исследования = 3);
- 2 раствор (предварительное облучение) – облученный растворитель (фосфатный буфер), используемый потом для приготовления буферного раствора БСА (кратность проведения исследования = 3);
- 3 раствор (облученный раствор целиком) – облученный фосфатный буферный раствор БСА (кратность проведения исследования = 3).

О наличии структурно-функциональных (конформационных) изменений в молекуле альбумина судили по значениям собственной и зондовой флуоресценции. Регистрация спектров интенсивности проводилась сразу после снятия анализируемого раствора с Cs¹³⁷-источника по истечении 15 часов облучения (0 минут (мин)), далее через 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 150 мин, 180 мин, 210 мин и 240 мин.

Анализ собственной и зондовой флуоресценции выполнялся на спектрофлуориметре CM 2203 Solar (Республика Беларусь) при стабильной температуре (+23°C) в кюветном отделении прибора. Условия регистрации собственной флуоресценции: длина волны возбуждения 280 нм, диапазон регистрации 300–400 нм, спектральная ширина щели возбуждения и флуоресценции 3 нм. Условия регистрации зондовой флуоресценции: длина волны возбуждения 320 нм, диапазон регистрации 400–600 нм, спектральная ширина щели возбуждения и флуоресценции 3 нм.

Статистическая обработка полученных данных проводилась посредством программы «Statistica 7.0». Вначале осуществлялась проверка гипотезы о соответствии распределения количественных показателей закону нормального распределения с использованием W-теста Шапиро – Уилка ($n < 50$). Результаты проверки показали, что для всех анализируемых растворов характерно нормальное распределение, поэтому статистическая значимость оценивалась с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm Sd$). Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. В качестве исследования косвенного действия малых доз ИИ на молекулу БСА был выбран флуоресцентный метод, так как флуоресцентная спектроскопия остатков триптофана в белках широко используется в качестве внутреннего индикатора конформации белка, его динамики и межмолекулярного взаимодействия. Известно, что динамическое (спектрально-кинетическое) поведение молекул триптофана очень чувствительно к состоянию окружающей их среды. Флуоресценция индольного хромофора также очень чувствительна к состоянию окружающей его среды и, как следствие, служит индикатором даже незначительных изменений в этой среде. Местоположение максимума флуоресценции триптофана в белковом спектре, определяемого релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора, уже давно используется в качестве индикатора внутримолекулярной динамики белка [7].

Полученные в ходе эксперимента данные представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Средние значения собственной флуоресценции в максимуме флуоресценции, отн. ед.

Время после облучения	1-й раствор (интактный)	2-й раствор (предварительное облучение)	3-й раствор (облученный раствор целиком)
	$M \pm Sd$	$M \pm Sd$	$M \pm Sd$
0 мин	83,56 ± 0,28	81,88 ± 0,52 *	86,34 ± 0,08 *
30 мин	82,30 ± 0,25 +	69,10 ± 0,67 **	83,21 ± 0,47 **
60 мин	81,37 ± 0,09 +	66,58 ± 0,20 **	81,69 ± 0,09 **
90 мин	80,43 ± 0,53 +	65,61 ± 0,15 **	80,25 ± 0,20 +
120 мин	79,96 ± 0,32 +	64,53 ± 0,35 **	80,21 ± 0,01 +
150 мин	80,25 ± 0,17 +	63,90 ± 0,26 **	80,08 ± 0,12 +
180 мин	79,99 ± 0,57 +	63,76 ± 0,08 **	79,65 ± 0,24 +
210 мин	79,86 ± 0,35 +	63,32 ± 0,51 **	80,00 ± 0,02 +
240 мин	79,80 ± 0,36 +	62,51 ± 0,08 **	80,16 ± 0,03 +

Примечание. * при сравнении с 1-м раствором (интактный); + при сравнении с 0 мин.

Средние значения зондовой флуоресценции в максимуме флуоресценции, отн. ед.

Время после облучения	1-й раствор (интактный)	2-й раствор (предварительное облучение)	3-й раствор (облученный раствор целиком)
	M ± Sd	M ± Sd	M ± Sd
0 мин	58,92 ± 0,15	67,23 ± 0,67 *	53,73 ± 0,24 *
30 мин	58,11 ± 0,14 +	64,41 ± 0,38 *+	50,77 ± 0,13 *+
60 мин	57,90 ± 0,24 +	62,93 ± 0,21 *+	49,30 ± 0,42 *+
90 мин	57,59 ± 0,10 +	61,99 ± 0,28 *+	48,36 ± 0,20 *+
120 мин	57,45 ± 0,10 +	61,11 ± 0,13 *+	47,91 ± 0,01 *+
150 мин	57,59 ± 0,13 +	60,76 ± 0,07 *+	48,27 ± 0,20 *+
180 мин	57,47 ± 0,26 +	60,25 ± 0,25 *+	48,19 ± 0,04 *+
210 мин	57,45 ± 0,29 +	60,38 ± 0,25 *+	47,38 ± 0,04 *+
240 мин	57,67 ± 0,12 +	60,58 ± 0,09 *+	47,46 ± 0,12 *+

Примечание. * при сравнении с 1-м раствором (интактный); + при сравнении с 0 мин.

Методом собственной флуоресценции продемонстрировано, что при предварительном облучении буфера, используемого потом для приготовления раствора БСА, сразу после снятия раствора с Cs¹³⁷-источника (0 мин) наблюдается статистически значимое снижение средних значений флуоресценции на 2,01% (при сравнении с интактным раствором), а уже через 30 мин после облучения средние значения статистически значимо уменьшаются на 16,04%. К окончанию эксперимента (через 240 мин) уменьшение значений достигло 21,67%. Однако при облучении раствора БСА целиком, сразу после снятия раствора с Cs¹³⁷-источника, фиксируется статистически значимое увеличение средних значений флуоресценции на 3,32%, а через 60 мин только на 0,39%. К окончанию эксперимента (через 240 мин) увеличение было на 0,45%.

Методом зондовой флуоресценции установлено, что при предварительном облучении буфера, используемого потом для приготовления раствора БСА, сразу после снятия раствора с Cs¹³⁷-источника (0 мин) устанавливается статистически значимое увеличение средних значений флуоресценции на 14,10% (при сравнении с интактным раствором), а через 240 мин – на 5,04%. При облучении раствора БСА целиком, сразу после снятия раствора с Cs¹³⁷-источника, наблюдается статистически значимое уменьшение средних значений флуоресценции на 8,81%, а через 120 мин уже на 16,61%. К окончанию эксперимента (через 240 мин) уменьшение было на 17,71%.

Таким образом, при косвенном действии малых доз ИИ происходят конформационные изменения (статистически значимые изменения средних значений интенсивности флуоресценции) в молекуле альбумина, как при предварительном облучении буферного раствора, применяемого далее для приготовления альбумина, так и при облучении буферного раствора альбумина целиком. Однако количественные изменения интенсивности флуоресценции, как собственной, так и зондовой, отличаются при разных режимах облучения альбумина.

Со временем наблюдается статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции альбумина – через 240 мин после облучения (при сравнении с 0 мин после облучения):

- методом собственной флуоресценции обнаружено, что средние значения интактного раствора изменились на 4,50%, предварительно облученного – на 23,66%, а облученного раствора целиком – на 7,16%;
- методом зондовой флуоресценции продемонстрировано, что средние значения интактного раствора изменились на 2,12%, предварительно облученного – на 9,89%, а облученного раствора целиком – на 11,67%.

Известно, что функциональная активность белков в значительной степени зависит от их конформационной динамики – способности претерпевать конформационные перестройки, необходимые для выполнения их специфических функций. Общеизвестно, что быстрые стохастические структурные флуктуации в пико- или наносекундном масштабе времени между различными подсостояниями белковых молекул играют решающую роль в функционально значимых конформационных изменениях. Было высказано предположение, что белки характеризуются обширным набором этих конформационных состояний, отражающих сложность их энергетических характеристик [7].

Одновременно на динамические характеристики белка влияют тип и количество окружающих молекул растворителя (в первую очередь воды). Эти молекулы создают локальный поверхностный слой, который может действовать как пластификатор или, наоборот, как стабилизатор конформационных переходов, тем самым усиливая или препятствуя переходам между этих конформационных состояний соответственно [7].

Bin M. с коллегами подтвердили [8], что свойства воды в гидратационном слое белка влияют на его функцию и стабильность. Уровень гидратации (h), определяемый как отношение массы воды к массе белка ($h = m \text{ воды} / m \text{ белка}$), часто используется для количественной оценки гидратации системы. Для белков с уровнем гидратации ниже $h = 0,2$ биологическая активность снижается, в то время как для белков с уровнем гидратации между $h = 0,2$ и $h = 0,5$ активность повышается, а функциональность восстанавливается.

Заключение. Полученные данные позволяют говорить о наличии реакции со стороны БСА на косвенное действие малых доз ионизирующего излучения, молекула белка ведет себя по-разному при нахождении в предварительно облученном буфере и при облучении целиком буферного раствора альбумина:

– при предварительном облучении буфера, используемого потом для приготовления раствора БСА, сразу после снятия раствора с Cs^{137} -источника, фиксируется статистически значимое снижение средних значений собственной флуоресценции на 2,01% (при сравнении с интактным раствором), а при облучении раствора БСА целиком, сразу после снятия раствора с Cs^{137} -источника, наблюдается статистически значимое увеличение средних значений собственной флуоресценции на 3,32%;

– при предварительном облучении буфера, применяемого далее для приготовления раствора БСА, сразу после снятия раствора с Cs^{137} -источника устанавливается статистически значимое увеличение средних значений зондовой флуоресценции на 14,10% (при сравнении с интактным раствором), а при облучении раствора БСА целиком, сразу после снятия раствора с Cs^{137} -источника, наблюдается статистически значимое уменьшение средних значений зондовой флуоресценции на 8,81%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Раскоша, О.В. Цитогенетические эффекты хронического воздействия ионизирующего излучения в малых дозах / О.В. Раскоша, Л.А. Башлыкова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2017. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26580> (дата обращения: 20.12.2024).
2. Gueguen, Y. Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms / Y. Gueguen, A. Bontemps, T.G. Ebrahimiyan // *Cellular a. Molecular Life Sciences*. – 2019. – Vol. 76, № 7. – P. 1255–1273.
3. Preventative and therapeutic effects of low-dose ionizing radiation on the allergic response of rat basophilic leukemia cells / H.M. Joo [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834612/pdf/41598_2019_Article_52399.pdf (date of access: 25.12.2024).
4. Пузан, Н.Д. Молекулярные механизмы действия ионизирующего излучения. Влияние облучения на белок (обзор литературы) / Н.Д. Пузан, И.А. Чешик // *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности*. – 2023. – № 1(29). – С. 14–26.
5. Сывороточный альбумин: свойства, функции и их оценка при критических состояниях / Ю.А. Грызунов [и др.] // *Анестезия и реаниматология*. – 2004. – № 6. – С. 68–74.
6. Michnik, A. Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin / A. Michnik, K. Michalik, Z. Drzazga // *J. of Photochemistry a. Photobiology. B: Biology*. – 2008. – Vol. 90, № 3. – P. 170–178.
7. Temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime in aqueous glycerol and trehalose solutions / V. Gorokhov [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – Vol. 82, № 11. – P. 1269–1275.
8. Wide-angle X-ray scattering and molecular dynamics simulations of supercooled protein hydration water / M. Bin [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2021. – Vol. 23, № 34. – P. 18308–18313.

REFERENCES

1. Raskosha O.V., Bashlykova L.A. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Contemporary Problems of Science and Education], 2017, 4. [Accessed 20.12.2024]. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26580> (In Russ.).
2. Guéguen Y., Bontemps A., Ebrahimiyan T. Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. *Cellular a. Molecular Life Sciences*. 2019; 76(7):1255–1273. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2987-5>.
3. Joo H., Hong E., Cho S.-J., Nam S., Kim J. Preventative and therapeutic effects of low-dose ionizing radiation on the allergic response of rat basophilic leukemia cells. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):16079. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52399-9>.
4. Puzan N.D., Cheshik I.A. *Mediko-biologicheskie problemy zhiznedejatelnosti* [Medical and Biological Issues of Vital Activity], 2023, 1(29), pp. 14–26.
5. Gryzunov Y.A. *Anestesiya i reanimatologiya* [Anesthesiology and Resuscitation], 2004, 6, pp. 68–74.
6. Michnik A., Michalik K., Drzazga Z. Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin. *J. of Photochemistry a. Photobiology. B: Biology*. 2008; 90(3):170–178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.12.007>.
7. Gorokhov V., Knox P., Korvatovskiy B., Seifullina N., Goryachev S., Paschenko V. Temperature dependence of tryptophan fluorescence lifetime in aqueous glycerol and trehalose solutions. *Biochemistry (Moscow)*. 2017; 82(11):1269–1275. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297917110049>.
8. Bin M., Yousif R., Berkowicz S., Das S., Schlesinger D., Perakis F. Wide-angle X-ray scattering and molecular dynamics simulations of supercooled protein hydration water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021; 23(34):18308–18313. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1cp02126e/>.

Поступила в редакцию 24.01.2025

Адрес для корреспонденции: e-mail: lulushechka.na@gmail.com – Пузан Н.Д.