

Влияние γ -облучения на термоиндуцированные конформационные переходы и гидратацию фибриногена

О. А. Горобченко, О. Т. Николов, С. В. Гаташ

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина
Пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина

olga_bio_f@yahoo.com

Исследовано влияние γ -облучения на конформационные изменения фибриногена человека в водном растворе методом СВЧ-диэлектротрии на частоте $\sim 9,2$ ГГц. Измерены действительная и мнимая части комплексной диэлектрической проницаемости нативных и облученных дозами 20, 60 и 100 Гр растворов фибриногена в интервале температур 2—70 °С. Обнаружены конформационные переходы фибриногена при 25, 33 и 63 °С. Установлено, что воздействие γ -облучения приводит к увеличению степени гидратации белка и разупорядочению структуры объемной воды в растворе в области плавления термолабильных участков фибриногена.

Ключевые слова: фибриноген, γ -облучение, конформационные переходы, гидратация.

Введение. Фибриноген является многофункциональным белком плазмы крови, участвующим в процессах коагуляции, фибринолиза, воспаления, ангиогенеза, заживления ран и атерогенеза [1, 2]. Многофункциональность фибриногена обусловлена его мультидоменной структурой и многочисленными связывающими участками, обеспечивающими взаимодействие фибриногена с другими белками и клеточными структурами [2]. Важную роль в функциональной активности фибриногена играет его способность легко менять свою конформацию благодаря наличию большого числа подвижных участков [3]. Сложность строения фибриногена является основной причиной его недостаточной изученности, в том числе и при воздействии на белок ионизирующего излучения (ИИ).

Так, в работах [4, 5] отмечены структурные изменения фибриногена при действии γ -облучения на его водные растворы, но характер этих измене-

ний и состояние гидратного окружения белка выяснены недостаточно. В связи с этим исследование конформации и гидратации фибриногена имеет большое значение, так как его функциональная активность во многом определяется высокой гидратированностью [6]. Подобные исследования становятся особенно актуальными в связи с использованием ИИ в современной медицине.

В настоящей работе приведены результаты исследования влияния γ -облучения на температурозависимые конформационные переходы и гидратацию фибриногена в водном растворе методом СВЧ-диэлектротрии.

Материалы и методы. В работе использовали лиофилизированный фибриноген производства Харьковской областной станции переливания крови. Белок растворяли в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 7,3. Концентрация фибриногена в растворе составляла 8—10 мг/мл. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 280$ нм. Коэффициент экстинкции фибриногена

$E_{280}^{1\%}$ принимали равным 15,06 [7]. Образцы облучали дозами 20, 60 и 100 Гр источником ^{60}Co на установке типа «Исследователь» (СССР). Мощность экспозиционной дозы составляла 380 Р/мин.

Действительную ϵ' и мнимую ϵ'' части комплексной диэлектрической проницаемости образцов измеряли в интервале температур 2—70 °С методом СВЧ-диэлектротрии с использованием цилиндрического H_{01n} -резонатора на частоте ~9,2 ГГц [8, 9], который позволяет идентифицировать даже незначительные структурные изменения биокомпонент по изменению соотношения между свободной и связанной водой. Температуру измеряли медно-константановой термопарой с точностью $\pm 0,1$ °С. Значения ϵ' и ϵ'' рассчитывали по градуировочным кривым, полученным для веществ с известными значениями ϵ' и ϵ'' [10]. В величину ϵ'' была внесена поправка в связи с присутствием в растворе неорганических ионов. Для этого измеряли низкочастотную проводимость σ в интервале температур 2—70 °С.

Время диэлектрической релаксации молекул воды рассчитывали из уравнений Дебая, используя измененные значения ϵ' и ϵ'' . Степень гидратации фибриногена $\omega = \Gamma_{\text{воды}}/\Gamma_{\text{белка}}$ определяли по методу [11].

Результаты и обсуждение. Полученные зависимости ϵ' и ϵ'' от температуры нативных и облученных растворов фибриногена характеризуются немонотонными изменениями диэлектрических параметров. Такое поведение характерно для процессов, при которых происходит попеременное изменение соотношения между свободной и связанной водой в растворе.

На рис. 1 представлены зависимости времени диэлектрической релаксации молекул воды в растворах фибриногена от температуры в координатах Аррениуса. Кривые разбиваются на два участка. Первый из них линейный и охватывает интервал температур до 40 °С. В этой области энергия активации дипольной релаксации воды остается постоянной и составляет около 22 кДж/моль. При более высоких температурах зависимость становится неаррениусовой. На этом участке время релаксации τ молекул воды в белковых растворах меньше такового, характерного для чистой воды, а величина τ в облученных образцах меньше τ контроля. Это свидетельствует о разупорядочивании объемной воды и изменении ее структурного состояния в растворах фибриногена, что может быть

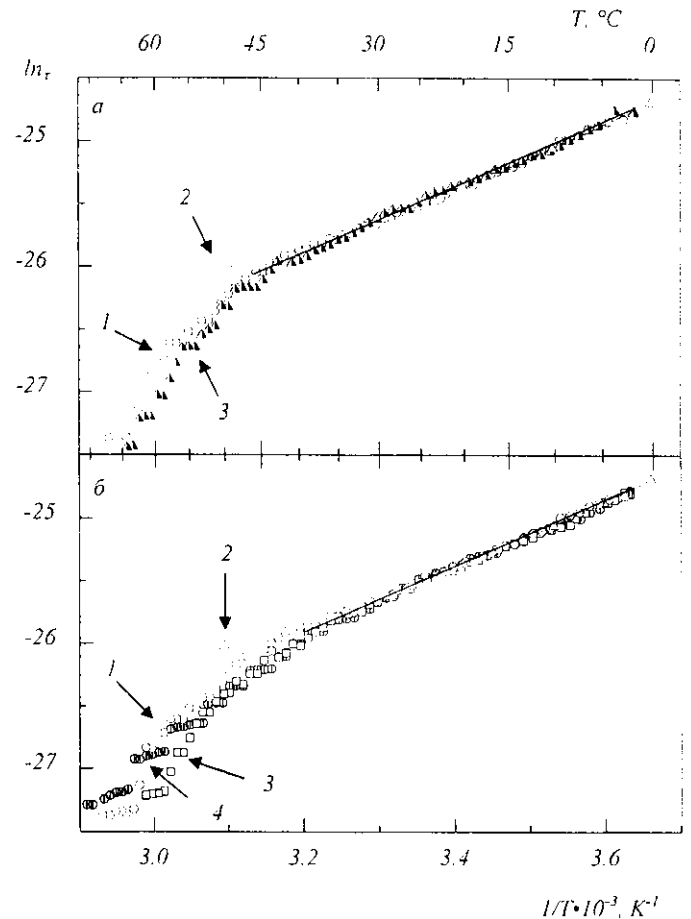


Рис. 1. Аррениусовы зависимости времени диэлектрической релаксации молекул воды в γ -облученных растворах фибриногена (а: 1 — контроль; 2 — вода; 3 — 20 Гр; б: 1 — контроль; 2 — вода; 3 — 60 Гр; 4 — 100 Гр)

следствием разрушения сетки водородных связей, образуемых молекулами воды в чистом растворителе, макромолекулами белка. К еще большему разупорядочиванию структуры воды приводит облучение растворов белка. Таким образом, очевидно, что изменение структурного состояния фибриногена оказывает влияние и на растворитель.

Рассмотрим, каким образом изменяется степень гидратации фибриногена с ростом температуры. Значения степени гидратации белка представлены на рис. 2. С увеличением температуры гидратация фибриногена в целом уменьшается, что согласуется с данными калориметрических исследований [12]. Однако эти изменения немонотонны. Для нативного белка они отличаются наличием нескольких участков с повышенной гидратацией при температурах 10, 25, 33 °С, в интервале 45—

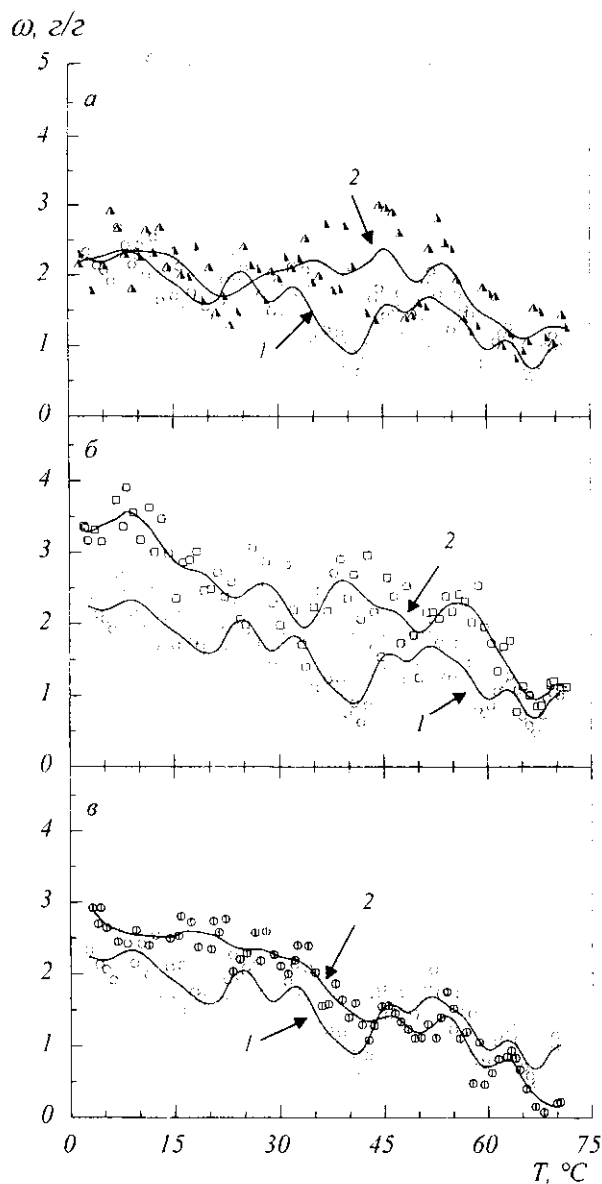


Рис. 2. Зависимости степени гидратации γ -облученного фибриногена в растворе от температуры (а: 1 — контроль; 2 — 20 Гр; б: 1 — контроль; 2 — 60 Гр; в: 1 — контроль; 2 — 100 Гр)

55 °С и при 63 °С. Это можно объяснить тем, что при этих температурах конформация фибриногена изменяется. Такое большое число конформаций характерно для фибриногена, поскольку белок очень подвижен [3] и имеет в растворе несколько форм [6]. Кроме того, в макромолекуле фибриногена насчитывается не менее 12 кооперативных участков, денатурирующих независимо [2]. Для фибриногена известны денатурационный переход I (около 49 °С) и обратимый конформационный переход II (11—16 °С) [13]. Эти переходы обусловле-

ны структурными изменениями термолабильных участков D- и E-доменов [2] и ими можно объяснить наблюдаемые изменения гидратации при 10 и 45—55 °С. Вероятно, что повышение степени гидратации белка при 25, 33 и 63 °С также вызвано конформационными изменениями фибриногена. В целом вся кривая может быть разделена на три участка с повышенной гидратацией фибриногена: 2—20, 20—40 и 40—68 °С. Первые два участка характерны для обратимых конформационных изменений, третий охватывает первый диапазон плавления 45—60 °С.

Рассмотрим температурозависимые изменения гидратации фибриногена, происходящие в облученных растворах белка. Для облученных дозой 20 Гр образцов (рис. 2, а) на участке до 20 °С степень гидратации практически совпадает с контролем. Максимумы при 25 и 33 °С несколько смещаются в область более высоких температур. Наибольшие отличия по сравнению с нативным белком наблюдаются на предденатурационном участке и при температурах плавления. Здесь гидратация облученного белка выше контроля. Очевидно, индуцированные радиацией изменения влияют, прежде всего, на термолабильные участки белка. Для дозы 60 Гр (рис. 2, б) имеет место повышение степени гидратации во всем исследованном интервале температур, области конформационных изменений смещаются. Вероятно, происходит нарушение структуры всей макромолекулы белка. С повышением дозы до 100 Гр (рис. 2, в) кривая гидратации все более сглаживается, отражая изменения структуры фибриногена, затрагивающие независимый характер конформационных переходов отдельных фрагментов макромолекулы.

Таким образом, следует отметить, что при дозах облучения 20, 60 и 100 Гр происходит общее увеличение степени гидратации белка. Гидратация может повышаться за счет освобождения дополнительных участков связывания для молекул воды при разрушении структуры белка. Количество связанной воды также может повышаться при сшивании макромолекул белка друг с другом. Последнее подтверждает тот факт, что с дозой облучения линейно увеличиваются вязкость растворов фибриногена и содержание фракции агрегированного белка [4]. Эти фракции при небольших дозах состоят из α C-доменов, которые наиболее подвержены ИИ и отщепляются в первую очередь. Однако α C-домены расположены в основном на поверхности коопе-

ративных участков периферических доменов и контактируют с ними посредством гидрофобных участков [14]. При их отщеплении под действием радиации на поверхности молекулы открываются гидрофобные участки, при взаимодействии с водой которых разупорядочивается ее структура, что и может приводить к уменьшению τ в облученных растворах фибриногена.

O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, S. V. Gatash

Influence of γ -irradiation on thermal conformation transitions and hydration of fibrinogen

Summary

The influence of γ -irradiation on conformation changes of the human fibrinogen in aqueous solution by the microwave dielectric method on the frequency $\sim 9,2$ GHz have been studied. The real ϵ' and imaginary ϵ'' parts of the complex dielectric permittivity of the native and irradiated with doses 20, 60 and 100 Gy fibrinogen solutions at the temperature range 2–70 °C were measured. The conformation transitions of fibrinogen were found out at 25, 33 and 63 °C. It have been determined that the effect of γ -irradiation results in the structure disordering of volume water in solution in the region of melting of the thermolabile domains of fibrinogen.

Key words: fibrinogen, γ -irradiation, conformation transitions, hydration.

O. O. Горобченко, O. T. Ніколов, С. В. Гаташ

Вплив γ -опромінення і температури на термоіндуковані конформаційні зміни та гідратацію фібриногену

Резюме

Вивчено вплив γ -опромінення на конформаційні зміни фібриногену людини у водному розчині методом НВЧ-діелектрометрії на частоті $\sim 9,2$ ГГц. Отримано значення дійсної і уявної частин комплексної діелектричної проникності нативних і опромінених дозами 20, 60 і 100 Гр розчинів фібриногену в інтервалі температур 2–70 °C. Виявлено конформаційні переходи фібриногену при 25, 33 і 63 °C. Встановлено, що дія γ -опромінення призводить до розупорядкування структури об'ємної води у розчині в області плавлення термолабільних ділянок фібриногену.

Ключові слова: фібриноген, γ -опромінення, конформаційні переходи, гідратація.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doolittle R. F., Everse S. J., Spraggon G. Human fibrinogen: anticipation a 3-dimensional structure // *FASEB J.*—1996.—10.—P. 1464—1470.

2. Medved L., Litvinovich S., Ugarava T., Matsuka Yu., Ingham K. Domain structure and functional activity of the recombinant human fibrinogen γ -module (γ 148-411) // *Biochemistry.*—1997.—36.—P. 4685—4693.
3. Brown J. H., Volkmann N., Jun G., Henschen-Edman A. H., Cohen C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen // *Biochemistry.*—2000.—97.—P. 85—90.
4. Kopec M., Gorska A., Dudek-Wojciehowska G., Szatallo Z. Gamma radiolysis of fibrinogen // *Nucleonika.*—1987.—32.—P. 29—47.
5. Ромоданова Э. А., Андреева Е. К., Гаташ С. В., Дюбка Т. С. Изменение спектральных свойств фибриногена при действии γ -излучения // *Біофіз. вісн.*—1998.—№ 2.—С. 105—108.
6. Taatjes D. J., Quinn A. S., Jenny R. J., Hale P., Bovill E. G., McDonagh J. Tertiary structure of the hepatic cell protein fibrinogen in fluid revealed by atomic force microscopy // *Cell Biol. Int.*—1997.—11.—P. 715—726.
7. Медведь Л. В., Тихтопуло Е. И., Привалов П. Л., Варецкая Г. В. Микрокалориметрические исследования температурных переходов в фибриногене и его протеолитических фрагментах // *Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 4.—С. 835—842.
8. Ніколов О. Т., Жилякова Т. А. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями // *Журн. физ. химии.*—1991.—65, № 5.—С. 1417—1420.
9. Gatash S. V. Very high-frequency dielectrometer for the study of dynamical processes in disperse water systems // *Радиофизика и электроника.*—1999.—4, № 1.—С. 129—132.
10. Шахпаронов М. И., Ахатов Я. Ю. Диэлектрические свойства и молекулярное строение растворов вода—ацетон // *Журн. структур. химии.*—1965.—6, № 1.—С. 21—26.
11. 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.
12. Кяйваряйнен А. И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции.—Л.: Наука, 1980.—272 с.
13. Зима В. Л., Медведь Л. В., Варецкая Т. В., Коваль В. Г. Флуоресцентные исследования температурных переходов в фибриногене и его протеолитических фрагментах // *Докл. АН УССР. Сер Б.*—1979.—№ 5.—С. 378—381.
14. Зима В. Л., Луговской Э. В., Медведь Л. В., Гоголинская Т. К., Привалов П. Л. Структурная организация и локализация фибриногена по данным микрокалориметрии и спектрофлуориметрии // *Докл. АН СССР.*—1981.—256, № 2.—С. 480—482.

УДК 577.346:543.556

Надійшла до редакції 31.05.04