

UNIwersYTET ŚLĄSKI

W KATOWICACH

Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych

Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego

mgr inż. Agnieszka Kielboń

*Mikrokalorymetryczne profile denaturacji surowicy krwi ludzkiej
poddanej działaniu promieniowania jonizującego*

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. prof. UŚ Anna Michnik

Promotor pomocniczy:

dr n. fiz. Kinga Polaczek – Grelik

Chorzów, 2022

SPIS TREŚCI

WYKAZ ZASTOSOWANYCH W PRACY SKRÓTÓW.....	6
STRESZCZENIE PRACY.....	7
ABSTRACT.....	9
I. CEL PRACY.....	11
II. WSTĘP TEORETYCZNY.....	12
II.1. Przedmiot badań – surowica krwi ludzkiej.....	12
II.2. Kalorymetryczne badania denaturacji termicznej białek osocza / surowicy krwi ludzkiej.....	14
II.2.1. Wprowadzenie.....	14
II.2.2. Ilościowa analiza krzywych DSC białek.....	15
II.2.3. Profile DSC surowicy krwi – interpretacja oraz możliwości ich wykorzystania w diagnostyce medycznej.....	22
II.2.4. Czynniki wpływające na uzyskiwany kształt krzywej DSC surowicy krwi ludzkiej.....	29
II.3. Złożoność działania promieniowania jonizującego na roztwory białek surowicy krwi ludzkiej.....	32
III. MATERIAŁ I METODYKA.....	38
III.1. Materiał badawczy – surowica krwi ludzkiej.....	38
III.2. Przygotowanie próbek.....	39
III.3. Proces ekspozycji in vitro próbek surowicy na promieniowanie jonizujące	39
III.3.1. Ekspozycja na promieniowanie neutronowe.....	39
III.3.2. Ekspozycja na promieniowanie X.....	41
III.4. Aparatura pomiarowa.....	43
III.4.1. Mikrokalorymetr VP-DSC.....	43
III.4.2. Spektrofotometr Jasco V530.....	45
III.5. Metodyka badań kalorymetrycznych.....	45

III.6. Metodyka badań spektrofotometrycznych.....	48
III.7. Tryb pomiarów.....	48
III.8. Statystyczna analiza otrzymanych wyników.....	49
IV. WYNIKI.....	50
IV.1. Odzwierciedlenie zmienności osobniczej proteomu surowicy krwi w profilach DSC wodnych i buforowych roztworów surowic.....	50
IV.2. Efekty bezpośrednie wpływu promieniowania jonizującego na profile DSC roztworów surowicy krwi ludzkiej.....	57
IV.2.1. Promieniowanie neutronowe.....	57
IV.2.2. Promieniowanie X.....	62
IV.2.2.1. Ekspozycja na dawki 5 Gy i 10 Gy.....	62
IV.2.2.1.1. Wodne roztwory surowicy krwi.....	62
IV.2.2.1.2. Buforowe roztwory surowicy krwi.....	63
IV.2.2.1.3. Wyniki pojedynczego eksperymentu ekspozycji wodnego roztworu surowicy krwi na dawki z zakresu 10 Gy – 120 Gy.....	65
IV.2.3. Posumowanie.....	66
IV.3. Efekty długofalowe wpływu promieniowania jonizującego na profile DSC roztworów surowicy krwi ludzkiej.....	67
IV.3.1. Proces starzenia się surowicy krwi ludzkiej w roztworach wodnych i buforowych.....	68
IV.3.2. Starzenie się próbek eksponowanych na promieniowanie neutronowe.....	70
IV.3.2.1. Roztwory wodne, dawka 5 Gy.....	70
IV.3.2.2. Starzenie się wodnego roztworu surowicy krwi jednorazowo eksponowanego na dawkę 13 Gy promieniowania neutronowego.....	79
IV.3.3. Starzenie się próbek eksponowanych na promieniowanie rentgenowskie.....	80
IV.3.3.1. Roztwory wodne surowicy, dawka 5 Gy i 10 Gy.....	80
IV.3.3.2. Wodny roztwór surowicy krwi, dawki z zakresu 10 Gy – 120 Gy.....	81
IV.3.3.3. Roztwory buforowe, dawki 5 Gy i 10 Gy.....	83

IV.3.4. Podsumowanie.....	89
V. DYSKUSJA.....	90
V.1. Wprowadzenie.....	90
V.2. Trudności w porównaniu efektów działania promieniowania X oraz neutronowego na roztwory surowicy krwi.....	91
V.3. Efekty bezpośrednie.....	92
V.4. Przyspieszone procesy starzenia roztworów surowicy krwi jako efekt długofalowy wpływu promieniowania jonizującego.....	93
V.5. Podsumowanie.....	100
VI. WNIOSKI.....	101
VII. LITERATURA.....	102
VIII. SPIS RYSUNKÓW.....	116
IX. SPIS TABEL.....	121

WYKAZ ZASTOSOWANYCH W PRACY SKRÓTÓW

AGEs – *eng. advanced glycation end-products*, produkty zaawansowanej glikacji,
AOPP – *eng. advanced oxidation protein products*, zaawansowane produkty utleniania białek,
BNCT – *eng. boron neutron capture therapy*, terapia borowo-neutronowa,
DSC – *eng. differential scanning calorimetry*, skaningowa kalorymetria różnicowa,
HBI – *eng. half body irradiation*, technika napromieniania całego ciała,
HHW – wartość szerokości połówkowej przejścia w połowie wysokości piksu, który je reprezentuje,
HSA – *eng. human serum albumin*, albumina surowicy krwi ludzkiej,
IgG, IgA, IgM – immunoglobuliny G, A, M,
JM – jednostka monitorowa,
LPE lub LET – *eng. linear energy transfer*, liniowy przekaz energii,
MLC – *eng. multileaf collimator*, kolimator wielolistkowy,
PBS – *eng. phosphate buffered saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna,
RBE – *eng. relative biological effectiveness*, względna skuteczność biologiczna, oznaczana też jako WSB,
ROS – *eng. reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu,
RS – radiochirurgia stereotaktyczna,
SBRT – *eng. stereotactic body radiation therapy*, radioterapia stereotaktyczna ciała,
TBI – *eng. total body irradiation*, technika napromieniania całego ciała,
UV-VIS – zakres promieniowania ultrafioletowego (UV) oraz widzialnego (VIS),
WBRT – *eng. whole brain radiotherapy*, radioterapia całego mózgu,
WSB – względna skuteczność biologiczna (*eng. relative biological effectiveness*).

STRESZCZENIE PRACY

Za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) monitorowano efekty bezpośrednie i długofalowe wpływu promieniowania jonizującego na roztwory surowicy krwi ludzkiej. Celem pracy była obserwacja efektów widocznych na profilach DSC badanych roztworów po ekspozycji *in vitro* na promieniowanie neutronowe lub rentgenowskie. Wykorzystano zakres dawek promieniowania rentgenowskiego od 10 Gy do 120 Gy oraz neutronowego od 5 Gy do 13 Gy.

Próbki surowicy uzyskano z krwi zdrowych ochotników i rozcieńczono 20-krotnie w odgazowanej wodzie redestylowanej lub buforze PBS. Pomiary wykonano za pomocą mikrokalorymetru VP-DSC (MicroCal). Każdą próbkę skanowano dwukrotnie w zakresie temperatur 20 – 100 °C z szybkością ogrzewania 1 °C na min. Wszystkie próbki surowicy mierzono co tydzień (do 3 tygodni) po ekspozycji, aby obserwować proces starzenia roztworów przechowywanych w warunkach chłodniczych. Ekspozycję *in vitro* przeprowadzono przy użyciu dwóch rodzajów promieniowania jonizującego – neutronów i promieni rentgenowskich. Jako źródło neutronów zastosowano radioizotop Californ-252, którego aktywność w czasie eksperymentu wynosiła około 65 do 58 Mbq (średnia energia neutronów 2,35 MeV). Promieniowanie rentgenowskie zostało dostarczone przez akcelerator liniowy wiązką o nominalnym potencjale przyspieszającym 6 MV i średniej energii wiązki 1.5 MeV, moc wiązki wynosiła 450 JM/min. Grupa kontrolna próbek zawsze pozostawała w takich samych warunkach jak grupa napromieniana (z wyjątkiem procesu napromieniania). Procedura ta pozwoliła na porównanie różnic pomiędzy procesem starzenia próbki kontrolnej i napromienianej.

Bezpośredni wpływ promieniowania jonizującego na roztwory surowicy zaobserwowano na profilach DSC próbek poddanych działaniu promieniowania neutronowego o dawce 5 Gy, natomiast w przypadku promieni rentgenowskich dopiero przy dawkach promieniowania powyżej 30 Gy. Wydaje się, że obserwowane biochemiczne efekty działania promieniowania jonizującego wykazują duże podobieństwo do procesów starzeniowych. Podczas badań czasowych, zaobserwowano wyraźną tendencję do szybszego starzenia roztworów surowicy krwi ludzkiej w wyniku ich ekspozycji *in vitro* na promieniowanie jonizujące. Charakterystyczną cechą profili DSC zmienionych starzeniowo jest pojawienie się, przed przejściem endotermicznym, niskotemperaturowego przejścia egzotermicznego. Szybsze starzenie roztworów surowicy następuje niezależnie

od rodzaju zastosowanego promieniowania jonizującego, czy zastosowanego rozpuszczalnika. Użycie wyższych dawek promieniowania, zarówno neutronowego jak i rentgenowskiego, wzmacnia wielkość efektów obserwowanych za pomocą techniki kalorymetrycznej, a także spektrofotometrii UV-VIS.

Przeprowadzone badania pozwalają domniemywać, że promieniowanie jonizujące wpływa bezpośrednio i pośrednio na konformację białek zawartych w roztworach. Napromienienie roztworów surowicy wzmacnia procesy, wskutek których przebiegają modyfikacje struktury białek zawartych w roztworach, np. zmiany oksydacyjne, glikacyjne, czy ogólnie – wiązania ligandów. Niemożliwe jest jednak jednoznaczne zinterpretowanie wielkości bezpośredniego wpływu promieniowania neutronowego na surowice, ponieważ nie było możliwości odseparowania efektów związanych z długim przebywaniem próbek w temperaturze pokojowej podczas ekspozycji.

Uzyskane wyniki mogą się przyczynić do wyjaśniania mechanizmów stojących za skutecznością radioterapii, co w perspektywie rozwoju radioterapii personalizowanej może okazać się szczególnie ważne, nie tylko pod względem wyboru dawki frakcyjnej ale również typu zastosowanego promieniowania jonizującego.

Słowa kluczowe: skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), denaturacja białek, surowica krwi ludzkiej, promieniowanie X, promieniowanie neutronowe

ABSTRACT

The direct and long-term effects of ionizing radiation on human serum solutions were monitored by Differential Scanning Calorimetry (DSC). The aim of the study was to observe the effects visible on the DSC profiles of the serum solutions after *in vitro* exposure to neutron or X-ray radiation. The dose range of X-ray radiation from 10 Gy to 120 Gy and neutron radiation from 5 Gy to 13 Gy was used.

Serum samples were obtained from healthy volunteers and diluted 20-fold in degassed redistilled water or PBS buffer. Measurements were conducted by using a VP-DSC microcalorimeter (MicroCal). Each sample was scanned twice over a temperature range of 20 - 100 ° C with a heating rate of 1 ° C per min. All serum samples were measured every week (till 3 weeks) after exposition to observe aging process of solutions stored under refrigeration. The *in vitro* exposure process was carried out using two types of ionizing radiation - neutrons and X-rays. The radioisotope Californ-252 was used as the source of neutrons, and at the time of experiment the source activity was approximately 65 to 58 MBq (mean energy of neutrons 2.35 MeV). The X – rays were produced by linear accelerator working at the nominal potential accelerating of 6 MV and an average beam energy of 1.5 MeV, the dose rate was 450 JM / min. The control group of samples always remained under the same conditions as the irradiated group (except for the irradiation process). This procedure allowed the comparison of the differences between the control and irradiated sample aging process.

Direct influence of ionizing radiation on serum solutions was observed on DSC profiles of samples exposed to neutron radiation at a dose of 5 Gy, while in the case of X-rayonly at radiation doses above 30 Gy. It seems that, the observed biochemical effects of ionizing radiation are very similar to aging processes of protein solutions. A clear tendency of faster aging of human serum solutions was observed as a result of their *in vitro* exposure to ionizing radiation. A characteristic feature of the aging-altered DSC profiles was the presence of a low-temperature exothermic transition prior to the endothermic transition. The use of higher doses of radiation, both neutrons and X-rays, increases the magnitude of the effects observed with the calorimetric technique as well as with UV VIS spectrophotometry.

The conducted research allows to suppose that ionizing radiation influences directly and indirectly the conformation of proteins contained in solutions. Irradiation of serum solutions enhances the processes which lead to the modification of the structure of proteins

contained in the solutions, e.g. oxidative and glycation changes, or in general - ligand binding. However, it is impossible to unequivocally interpret the scale of the direct effect of neutron radiation on the sera. There was no a possibility to separate the effects related to the long stay of samples at room temperature during exposure.

The obtained results may contribute to explaining the mechanisms of radiotherapy effectiveness, which in the perspective of the development of personalized radiotherapy may become particularly important, not only in terms of the selection of the fractional dose, but also the type of ionizing radiation used.

Keywords: Differential Scanning Calorimetry (DSC), human blood serum, protein denaturation, X-rays, neutron radiation.

I. CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie wpływu promieniowania jonizującego na roztwory surowicy krwi ludzkiej przy użyciu metody skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Obserwowano różnice widoczne na profilach DSC badanych roztworów surowicy po ekspozycji *in vitro* na promieniowanie neutronowe lub rentgenowskie w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Monitorowano efekty bezpośrednie oraz długofalowe. Wykorzystano zakres dawek promieniowania od 5 Gy do 120 Gy:

- dla roztworów surowicy poddanych ekspozycji na promieniowanie neutronowe użyto dawek 5 Gy i 13 Gy (roztwory wodne surowicy),
- dla roztworów surowicy poddanych ekspozycji na promieniowanie rentgenowskie użyto dawek 5 Gy i 10 Gy (roztwory wodne i buforowe surowicy) oraz dawek 10 Gy, 30 Gy, 70 Gy, 120 Gy w ramach pojedynczego eksperymentu dla roztworów wodnych surowicy.

II. WSTĘP TEORETYCZNY

II.1. Przedmiot badań – surowica krwi ludzkiej

Dorosły człowiek średnio posiada ok. 5 litów krwi, gdzie ok. 55 % stanowi osocze, natomiast ok. 45 % elementy morfotyczne krwi. Osocze to porcja ludzkiej krwi złożona w ok. 93 - 91 % z wody, gdzie zaledwie ok. 7 % stanowią białka (średnio ok. 7.4 g/dL). Około jednego, dwóch procent stanowią inne komponenty 1) organiczne np. węglowodany (głównie glukoza), tłuszcze (w tym cholesterol), witaminy, hormony czy enzymy i 2) nieorganiczne takie jak np. jony sodu, potasu chloru itd. W osoczu występują również gazy takie jak tlen, dwutlenek węgla i azot. Surowica krwi to osocze pozbawione fibrynogenu oraz innych czynników krzepnięcia krwi. Ze względu na sposób pozyskiwania surowica będzie miała wyższe stężenie serotoniny niż osocze krwi [Rhoades et al. 2009, Khurana et al. 2013, Boron et al. 2016]. Ogromna różnorodność pod względem liczby i funkcji białek występujących w składzie osocza / surowicy krwi ludzkiej stanowi o złożoności badanej substancji. Razem ponad 3 tysiące poszczególnych białek może występować w jej składzie [Anderson et al. 2004, Garbett et al. 2008]. Przyjmuje się, że 99 % masy osocza stanowią 22 białka (wagowo). Najczęściej i najliczniej występujące proteiny stanowią 90 % masy osocza i są to: albuminy (4.8 g/dL), IgG, fibrynogen, transferyny, IgA, α_2 – makroglobuliny, α_1 – antytrypsyna, oraz mniej liczne dopełniacze C3, IgM i haptoglobina. Pozostałe 9 % masy osocza stanowi 12 białek, a trzy najliczniejsze to apolipoproteiny A1 i B oraz glikoproteiny [Chaires et al. 2007, Garbett et al. 2008, 2009, Rhoades et al. 2009, Boron et al. 2016]. Poszczególne białka zawarte w surowicy mogą być produkowane w różnych lokalizacjach w naszym organizmie, np. albuminy i globuliny są syntezowane przez komórki wątroby, natomiast gamma globuliny w tkance limfatycznej. Zakres możliwych funkcji jakie pełnią białka zawarte w osoczu / surowicy jest bardzo szeroki ponieważ mają swój wkład w regulowaniu ciśnienia osmotycznego krwi, utrzymaniu lepkości krwi czy jej krzepnięciu. Oprócz ogromnych możliwości transportowych (szczególnie albumin) białka te odgrywają też rolę w utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej organizmu, jego mechanizmach obronnych (szczególnie immunoglobuliny) oraz odżywianiu komórek tkankowych [Khurana et al. 2013].

Proteom osocza/surowicy od dawna szeroko wykorzystywany jest w diagnostyce medycznej. W odróżnieniu od genomu, który jest jednakowy dla całego organizmu i w przybliżeniu niezmienny w czasie, proteom jest tworem dynamicznym. Jego skład

zmienia się w czasie, w zależności od fazy rozwoju danego rodzaju komórek, w których zbiór białek ulega ekspresji, czynników środowiskowych, a także różnego typu interakcji. Dodatkowo, białka są modyfikowane poprzez wiązanie kowalencyjne grup modyfikujących, co wpływa znacząco na ich konformację i aktywność biologiczną. Białka mogą podlegać szerokiej gamie procesów takich jak m.in. oksydacja, glikacja, glikozylacja, karbonylacja, metylacja, hydroksylacja, fosforylacja czy prenylacja. Do jednych z najczęściej i najdłużej badanych, występujących modyfikacji białek można zaliczyć wszelkiego rodzaju zmiany oksydacyjne. Tlen jako cząsteczka występująca w organizmie człowieka ma szerokie funkcje: od pozytywnych t.j. uczestniczenie w procesach ułatwiania potrzebnych komórkom do wytwarzania energii, do negatywnych t.j. uszkodzanie komórek na skutek działania pod postacią anionorodnika ponadtlenkowego [Beckman et al. 1998, McCord et al. 2000]. Pod wpływem oksydacji białek może dochodzić, np. do modyfikacji aminokwasów aromatycznych lub nawet uszkodzeń wiązań peptydowych, co może w efekcie prowadzić do fragmentacji łańcucha polipeptydowego [Dale et al. 1952, Jayson et al. 1954, Garrison et al. 1962, 1987, Aeschelbach et al. 1976, Davies et al. 2004, 2016]. Glikacja to proces przyłączenia cząsteczek cukrów do związków posiadających wolną grupę aminową, jakimi są np. białka. Efektem glikacji jest powstawanie różnorodnych związków, od oksydantów, neoalergenów, przez produkty zaawansowanej glikacji (tzw. AGEs – *eng. advanced glycation end-products*) do substancji toksycznych. Jako proces występujący w organizmie naturalnie, glikacja prowadzi do modyfikacji białek zarówno strukturalnej, jak tworzenie wiązań poprzecznych między łańcuchami aminokwasowymi, oraz funkcjonalnych poprzez zmianę chemicznych właściwości białka. Glikacja zapoczątkowuje również serię przemian Maillarda, które w rezultacie mogą doprowadzić do denaturacji białek [Hadley et al. 2001, Frolov et al. 2010, Bodiga et al. 2013, Bohlooli et al. 2014, Thornalley et al. 2014 Kraj et al. 2018]. Fosforylacja białka, tzn. przyłączenie do białka reszty fosforanowej, może powodować bezpośrednio oprócz zmiany konformacji znaczną zmianę jego funkcji. Zmiany oksydacyjne czy glikacyjne powodują znaczny spadek intensywności obserwowanych pasm fluorescencji, co zostało udokumentowane w doniesieniach naukowych z ostatnich lat [Chudzik et al. 2016, Maciążek-Jurczyk et al. 2021, 2020, Szkudlarek et al. 2020]. Fosforylacja białek istotnych dla organizmu może prowadzić, lub być następstwem szeregu poważanych chorób, do których można zaliczyć choroby nowotworowe. Fosforylacja jest procesem odwracalnym, więc może służyć jako przełącznik aktywności białka w zależności czy do białka jest przyłączona reszta fosforanowa czy nie. Kontrolą procesu fosforylacji zajmują się dwie klasy enzymów – kinazy

białkowe oraz fosfatazy [Hunter et al. 1995, Delom et al. 2006]. Białka zdenaturowane, nieprawidłowo sfałdowane lub rozpoznawane jako obce są kierowane do całkowitej degradacji w proteasomie przez naznaczenie ich na drodze poliubikwitynacji. Ubikwitynacja może pełnić również funkcje regulujące aktywność białka [Hershko et al. 1998, Soetens et al. 2002].

Badanie ilościowe składu białkowego surowicy/osocza krwi czy innych płynów fizjologicznych dostarczyć więc może istotnych informacji o faktycznym stanie zdrowia osoby badanej. Dodatkowo, badania naukowe prowadzone różnymi technikami zmierzają do pokazania, że proteom tych płynów traktowany całościowo także może być wykorzystany w diagnostyce medycznej. Przykładem metody badawczej reprezentującej takie podejście jest różnicowa kalorymetria skaningowa.

II.2. Kalorymetryczne badania denaturacji termicznej białek osocza / surowicy krwi ludzkiej

II.2.1. Wprowadzenie

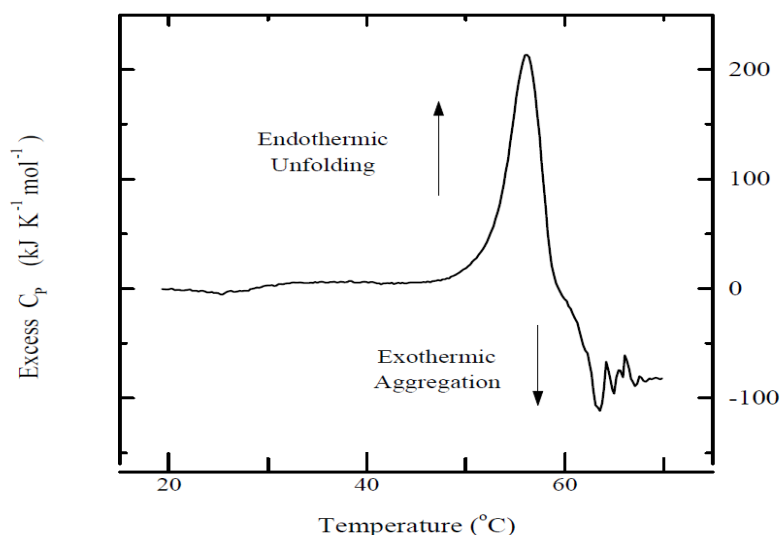
Biochemiczne badania kalorymetryczne związków organicznych prowadzi się od lat 30 ubiegłego wieku, chociaż pierwsze aparaty do pomiarów termicznych powstawały już w XVIII wieku. Intensywny rozwój badań biopolimerów nastąpił dzięki skonstruowaniu wysokoczułych, adiabatycznych kalorymetrów skaningowych. Przegląd literatury tematu wskazuje, że badania białek zawartych w ludzkiej krwi z wykorzystaniem techniki skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) realizuje się od lat 70 ubiegłego wieku, natomiast osocza krwi ludzkiej i surowicy krwi ludzkiej od lat 90 ubiegłego wieku [Monaselidze et al. 1997, Garbett et al. 2006, 2008, 2009, 2013, 2014, 2015, 2016, Michnik et al. 2009, 2013, 2016, 2019, Fish et al. 2010, Todinova et al. 2011, Zapf et al. 2011, Ferencz et al. 2011; Wiśniewski et al. 2011, Fekecs et al. 2012, Todinova et al. 2012, Moezzi et al. 2013, 2014, Rai et al. 2013, Krumova et al. 2013, 2017, Barcelo et al. 2015, Danailova et al. 2017, Farkas et al. 2018].

Zastosowanie DSC w badaniach białek umożliwia bezpośrednio wyznaczenie parametrów termodynamicznych określających ich trwałość termiczną: temperatury denaturacji, entalpii, a na tej podstawie entropii oraz energii swobodnej Gibbsa (entalpii swobodnej) przemian konformacyjnych. Uzyskane dane pozwalają na wykreślenie zależności zmian energii swobodnej Gibbsa procesu rozwijania białka od temperatury, która nosi nazwę „krzywej stabilności białka”. Większość badań kalorymetrycznych przemian konformacyjnych zachodzących w roztworach biomolekuł następuje w warunkach liniowego

wzrostu temperatury. Ich przebieg uwarunkowany jest jednak szeregiem czynników środowiskowych i eksperymentalnych. Temu zagadnieniu poświęcono wiele opublikowanych prac i artykułów naukowych [Dill et al. 1990, Cooper et al. 1997, Hung et al. 1998, Staniforth et al. 1998, Tsai et al. 1998, Wang et al. 1999, Wang et al. 1999, Royer et al. 2002, 2005, Smeller et al. 2002, Balny et al. 2002, Boonyaratanakornkit et al. 2002, Reza et al. 2002, Gryzunov et al. 2003, Stadler et al. 2004].

II.2.2. Ilościowa analiza krzywych DSC białek

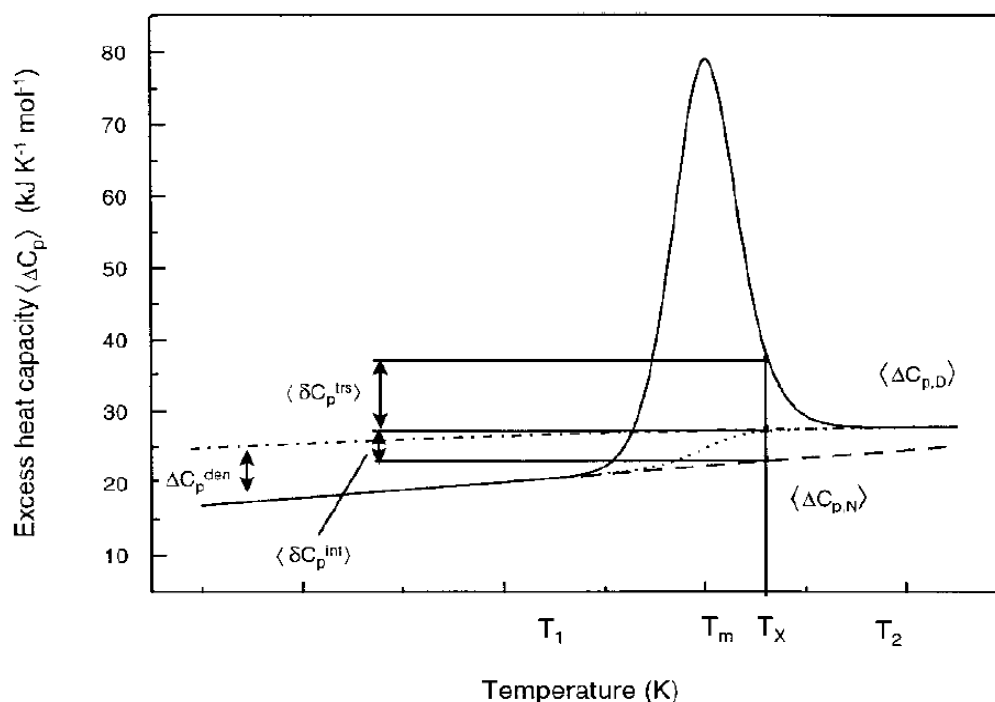
Z wykorzystaniem techniki skaningowej kalorymetrii różnicowej DSC można śledzić proces termicznej denaturacji białek odzwierciedlony przejściem endotermicznym (Rys. II.1). Proces ten, szczególnie w przypadku małych białek globularnych, może być w dużym stopniu odwracalny. Dość często jednak zaraz po termicznym rozfałdowaniu polipeptydowych łańcuchów białka następuje ich agregacja, co objawia się wkładem egzotermicznym w końcowym zakresie temperaturowym przejścia endotermicznego lub uwidacznia się za nim w postaci wyraźnego przejścia egzotermicznego, jak pokazano na Rys. II.1. Nawet wtedy, kiedy agregacja nie jest wyraźnie obecna, termiczne rozfałdowanie białka rzadko jest procesem całkowicie odwracalnym ze względu na inne zmiany chemiczne prowadzące do nieprawidłowo pofałdowanych form.



Rysunek II.1. Przykład profilu DSC przedstawiającego endotermiczny proces denaturacji termicznej wybranego białka oraz przejście egzotermiczne w zakresie wysokotemperaturowym [Cooper 2001].

Analiza krzywej DSC uzyskanej dla procesu odwracalnego dostarcza jego pełnego opisu termodynamicznego poprzez możliwość bezpośredniego wyznaczania parametrów

termodynamicznych takich jak: temperatura przejścia T_m , zmiana pojemności cieplnej ΔC_p , entalpia kalorymetryczna ΔH_{kal} , (następnie wyliczenie zmiany entropii ΔS) oraz daje wgląd w proces rozkładowania i siły zaangażowane w konformacyjną stabilność makromolekuły białka (Rys. II.2).



Rysunek II.2. Graficzne przedstawienie wyznaczenia wybranych parametrów termodynamicznych, gdzie ΔC_p^{den} - zmiana pojemności cieplnej towarzyszącej denaturacji białka, $\langle C_{p,D}(T) \rangle$ - cząstkowa molowa pojemność cieplna białka zdenaturowanego ($\langle C_{p,D}(T) \rangle$), $\langle C_{p,N}(T) \rangle$ - cząstkowa molowa pojemność cieplna białka natywnego ($\langle C_{p,N}(T) \rangle$), $\langle \delta C_p^{int} \rangle$ - wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna ($\langle \delta C_p^{wn} \rangle$), $\langle \delta C_p^{trs} \rangle$ - nadmiarowa pojemność cieplna przejścia ($\langle \delta C_p^n \rangle$) [Jelesarov et al. 1999].

Temperaturę T_m wyznacza się wprost z krzywej DSC białka jako temperaturę, przy której występuje maksimum przejścia endotermicznego, a więc maksymalna wartość $\langle \Delta C_p \rangle$. Dla poszczególnego białka można temperaturę T_m nazwać temperaturą denaturacji tego białka T_d . Istnieją jeszcze dwie temperatury charakteryzujące proces denaturacji termicznej danego białka i są to $T_{1/2}$ oraz T_G . Temperatura, przy której podczas denaturacji termicznej połowa molekuł białka jest w stanie natywnym, a połowa w rozkładanym nazywamy temperaturą $T_{1/2}$. Gdy zmiana molowej energii Gibbsa (ΔG) przejścia dla danej temperatury jest równa zero, jest to temperatura T_G . Ścisłej, krzywa stabilności białka przecina oś temperatury w dwóch punktach odpowiadających temperaturom tzw. zimnej i gorącej denaturacji.

Wielkość zmiany pojemności cieplnej towarzyszącej denaturacji termicznej ΔC_p^{den} można zapisać uwzględniając cząstkową molową pojemność cieplną białka natywnego $\langle C_{p_N} \rangle$ oraz zdenaturowanego $\langle C_{p_D} \rangle$ za pomocą wzoru:

$$\Delta C_p^{\text{den}} = \langle C_{p_D}(T) \rangle - \langle C_{p_N}(T) \rangle \quad (1)$$

gdzie,

ΔC_p^{den} – zmiana pojemności cieplnej towarzyszącej denaturacji białka,

$\langle C_{p_D}(T) \rangle$ – cząstkowa molowa pojemność cieplna białka zdenaturowanego,

$\langle C_{p_N}(T) \rangle$ – cząstkowa molowa pojemność cieplna białka natywnego.

Białko natywne ma mniejszą pojemność cieplną niż zdenaturowane. Wysoka pojemność cieplna białka zdenaturowanego jest spowodowana głównie hydratacją grup niepolarnych, co ma miejsce po zniszczeniu konformacji przestrzennej białka w wyniku procesu termicznej denaturacji. Uzyskana wartość ΔC_p^{den} jest zazwyczaj dodatnia i zawiera się w przedziale od 0,3 do 0,7 JK⁻¹g⁻¹ dla białek globularnych [Jelesarov et al. 1999].

Biorąc pod uwagę ogólny wzór na nadmiarową cząstkową pojemność cieplną

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle C_p \rangle - \langle C_{p_N} \rangle \quad (2)$$

można uwzględnić dwie składowe:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \langle \delta C_p^{\text{wn}} \rangle + \langle \delta C_p^{\text{n}} \rangle \quad (3)$$

gdzie,

$\langle \delta C_p^{\text{wn}} \rangle$ – wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna,

$\langle \delta C_p^{\text{n}} \rangle$ – nadmiarowa pojemność cieplna przejścia.

Zazwyczaj $\langle C_p^{\text{n}} \rangle$ jest dużo większa niż wartość $\langle C_p^{\text{wn}} \rangle$. Nadmiarowa pojemność cieplna przejścia $\langle C_p^{\text{n}} \rangle$ jest związana z przechodzeniem białka podczas denaturacji termicznej pomiędzy stanami o różnej entalpii. Wewnętrzna pojemność cieplna $\langle C_p^{\text{wn}} \rangle$ wiąże się z ilością wszystkich stanów będących podczas przejścia białka ze stanu natywnego do zdenaturowanego.

Pole pod funkcją nadmiarowej pojemności cieplnej przejścia (δC_p^{n}) odpowiada nadmiarowej entalpii termicznej denaturacji ΔH_{den} , którą można wyrazić wzorem:

$$\Delta H_{\text{den}} = \int_{T_1}^{T_2} \langle \delta C_p^{\text{n}} \rangle dT \quad (4)$$

gdzie,

T_1 , T_2 – temperatury, w których większość molekuł znajduje się odpowiednio w stanach początkowym i końcowym.

Tak wyznaczoną wartość entalpii można nazwać entalpią kalorymetryczną przejścia ΔH_{kal} . Wartość ta reprezentuje prawdziwą zmianę entalpii dla przejścia i może być wyznaczona eksperymentalnie jako pole pod pikiem. Wartość ΔH_{kal} może być, pod szczególnymi warunkami, równa entalpii van't Hoffa ΔH_{vH} , którą wyznacza się w oparciu o założony model procesu. Równość wartości ΔH_{kal} oraz ΔH_{vH} zachodzi w przypadku kooperatywnego przejścia dwustanowego.

Nadmiarową entropię denaturacji można wyznaczyć za pomocą poniższego wzoru:

$$\Delta S_{den} = \int_{T_1}^{T_2} \langle \delta C_p^{nadm} \rangle d \ln T \quad (5)$$

Parametrem termodynamicznym określającym stopień spontaniczności procesu denaturacji termicznej jest energia swobodna Gibbsa, nazywana również entalpią swobodną. Jest to parametr wyrażający pracę wymaganą do zniszczenia natywnej konformacji białka. Jeśli ΔG jest równa zero to układ znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej albo układ ten nie ulega zmianom. W przypadku braku dopływu energii swobodnej z zewnątrz układu reakcja może zajść spontanicznie gdy $\Delta G < 0$, a wymaga dostarczenia energii jeśli $\Delta G > 0$. Równanie Gibbsa-Helmholtza pozwala określić szybkość zmian stanów konformacyjnych zachodzących pod wpływem ogrzewania białek na podstawie różnicy entalpii pomiędzy stanami konformacyjnymi (natywnym i rozfałdowanym). Równanie to bierze pod uwagę, czy rozfałdowanie makromolekuł zachodzi z istnieniem stanów pośrednich, termodynamicznie stabilnych podczas ogrzewania. Jeśli tak, to istnieją tzw. i-te stany pośrednie, których wartości ΔH_i oraz ΔG_i uwzględnia wzór (6). W przypadku przejścia dwustanowego występują tylko dwa stany: początkowo stan natywny i na koniec reakcji stan rozfałdowany.

$$\left(\frac{\partial}{\partial T} \left(\frac{\Delta G_i}{T} \right) \right)_p = - \frac{\Delta H_i}{T^2} \quad (6)$$

gdzie,

ΔH_i – entalpia i-tego stanu,

ΔG_i – energia swobodna Gibbsa dla i-tego stanu, którą można wyrazić za pomocą wzoru:

$$\Delta G_i = \Delta H_i - T \Delta S_i \quad (7)$$

gdzie,

ΔS_i – zmiana entropii i-tego stanu.

Konsekwencją temperaturowych zmian pojemności cieplnej w procesie rozwijania białka jest temperaturowa zależność entalpii i entropii kalorymetrycznej. Jeśli znana jest zmiana pojemności cieplnej procesu oraz zmiana entalpii i entropii w temperaturze referencyjnej, np. w temperaturze przejścia, to korzystając z równań Kirchoff'a możliwe jest wyznaczenie zmiany entalpii/entropii w dowolnej temperaturze.

Model dwustanowy

Najwcześniejsze zastosowania DSC w badaniach białek odnosiły się do termicznie indukowanych, kooperatywnych przemian małych białek globularnych [Privalov et al. 1986]. Takie przemiany konformacyjne mogą być rozważane jako proces dwustanowy, co upraszcza interpretację ponieważ entalpia kalorymetryczna ΔH_{kal} będzie odpowiadać entalpii van't Hoffa ΔH_{vH} [Milardi et al. 1996, Privalov et al. 1979]. Jeśli spełnione jest założenie, że nie występują stany pośrednie, przejście białka ze stanu natywnego w rozfałdowany i odwrotnie (proces odwracalny) można przedstawić za pomocą schematu:



gdzie,

N – stan, w którym białka znajdują się w formie natywnej,

U – stan, w którym białka znajdują się w formie rozfałdowanej.

Stała równowagi K takiego układu będzie wyrażona jako:

$$K = [U] / [N] , \quad (9)$$

gdzie,

[U] – stężenie białka w stanie rozfałdowanym,

[N] – stężenie białka w stanie natywnym [Potekhin et al. 1998].

Przy przejściu ze stanu N do U w warunkach równowagi:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[U]}{[N]} = -RT \ln K , \quad (10)$$

Temperaturową zmienność stałej równowagi z entalpią reakcji wiąże równanie van't Hoffa:

$$\frac{\partial \ln ([U] / [N])}{\partial T} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad (11)$$

gdzie,

R – stała gazowa.

Jeśli użyto poprawnej wartości stężenia białka przy normalizacji krzywej DSC oraz wykonano poprawną korekcję linii bazowej, a entalpie kalorymetryczna i van't Hoffa różnią się, to założony model rozfałdowania białka może być zły. Jeśli np. w procesie rozfałdowania występują etapy pośrednie, wówczas przejście termiczne jest szersze i $\Delta H_{vH} < \Delta H_{kal}$. Alternatywnie, jeśli białko rozfałdowuje się kooperatywnie jako np. dimer (lub wyższy oligomer), to przejście będzie ostrzejsze i $\Delta H_{vH} > \Delta H_{kal}$. Przy takiej interpretacji należy jednak zachować ostrożność, ponieważ jeszcze inne czynniki mogą modyfikować kształt przejścia. Jednym z takich ważnych czynników jest np. nieodwracalna, zwykle egzotermiczna agregacja termicznie rozfałdowanych cząsteczek białka, która zaburza przejście prowadząc do nieprawidłowego oszacowania zarówno entalpii kalorymetrycznej jak i van't Hoffa [Cooper et al. 2000].

W modelu dwustanowym nadmiarowa pojemność cieplna może być wyrażona za pomocą wzoru:

$$\langle \Delta C_p \rangle = \frac{\Delta H^2}{RT^2} \frac{K}{(K+1)^2}. \quad (12)$$

Model dwustanowy dobrze opisuje odwracalną denaturację termiczną małych białek w ujęciu przejścia z formy natywnej (N) bezpośrednio do formy zdenaturowanej (U) bez uwzględnienia występowania stanów pośrednich czy procesów egzotermicznych [Hallerbach et al. 1998, Arroyo-Reyna et al. 2004].

Model Lumryego - Eyringa

W praktyce, dla wielu białek, szczególnie tych bardziej złożonych, proces denaturacji termicznej nie może być uznany za dwustanowy i wymaga nieco innego podejścia [Mateo et al. 1988, Privalov et al. 1982, 2007]. Uwzględnić należy też czy nie zachodzą procesy egzotermiczne takie jak agregacja białek powodujące też, że $\Delta H_{vH} > \Delta H_{kal}$ [Sanchez Ruiz et al. 1988, Galisteo et al. 1991]. Jeśli przejście termiczne jest nieodwracalne i zależne od szybkości skanowania, to można założyć, że termiczna denaturacja białka przebiega według schematu, w którym forma natywna białka przechodzi w nieodwracalnie zdenaturowaną zgodnie z reakcją kinetyczną charakteryzowaną stałą szybkości reakcji pierwszego rzędu.

Model Lumryego - Eyringa zawiera połączenie przejścia typu równowagowego z nieodwracalnym procesem kinetycznym. Można go zapisać w następujące sposoby:



gdzie,

N – forma natywna białka,

U – forma rozfałdowana białka,

I – forma nieodwracalnie zdenaturowana,

$K = k_1/k_2$ – stała równowagowa pomiędzy stanem natywnym i rozfałdowanym,

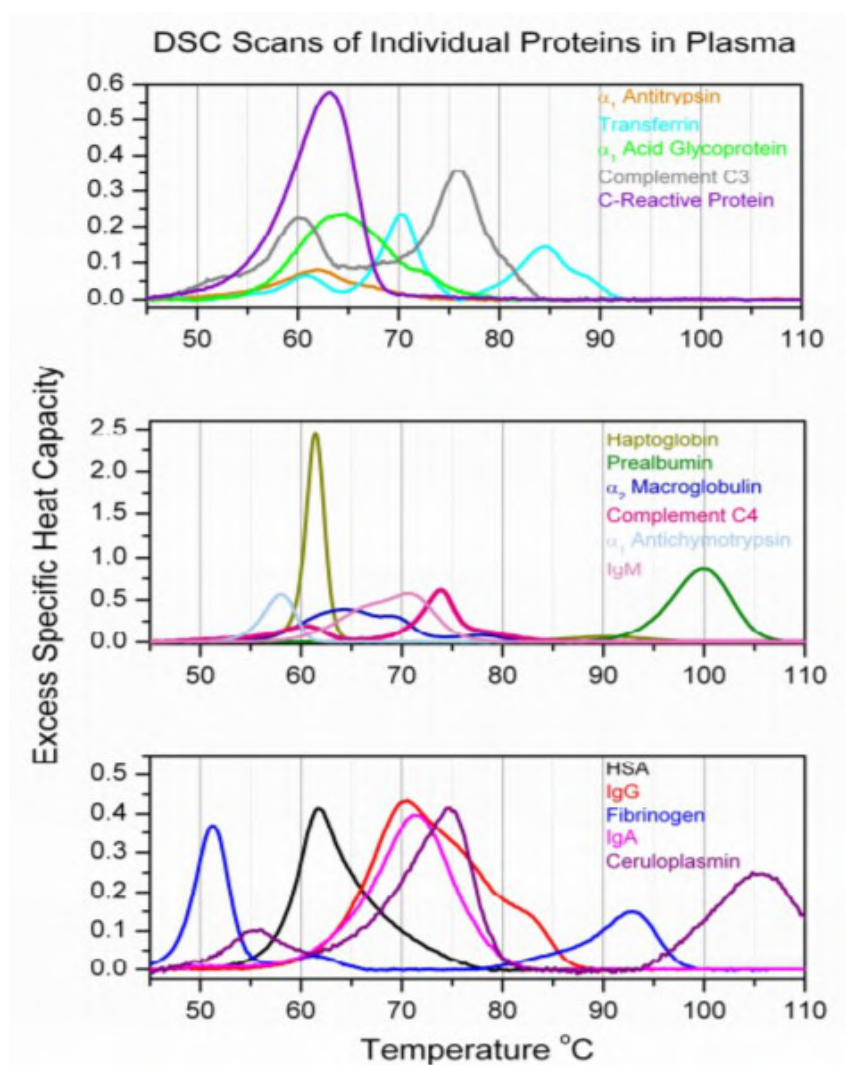
k lub k_3 – stała szybkości procesu nieodwracalnego.

Model Lumryego – Eyringa zakłada więc możliwość zajścia procesu nieodwracalnej denaturacji termicznej białka, co nie było brane pod uwagę w modelu dwustanowym. Zależnie od wzajemnej relacji pomiędzy k_1 , k_2 i k_3 model reprezentuje różne przypadki procesu denaturacji białka. Jeśli $k_3 \ll k_2$, to białko może ulec odwracalnemu procesowi denaturacji i przejść ze stanu natywnego (N) do stanu rozfałdowanego (U). W innym przypadku, gdy $k_3 \gg k_2$, białko może ulec nieodwracalnej denaturacji i przejść ze stanu natywnego (N) w nieodwracalnie zdenaturowany (I) z szybkością określoną przez stałą szybkości k_3 . Dzieje się tak przy procesach autolizy, agregacji lub po zajściu zamiany chemicznej reszt aminokwasowych [Klibanov et al. 1987, Ahern et al. 1987]. Nie ma wtedy możliwości zastosowania termodynamicznej analizy równowagowej ale można wyznaczyć entalpię procesu rozfałdowania białka ΔH_U [Sanchez-Ruiz et al. 1988, 1992, Creveld et al. 2001].

W literaturze spotyka się mnogie zastosowania i wersje modelu Lumryego – Eyringa ponieważ model ten jest dość ogólny, choć uwzględnia najważniejsze aspekty termodynamiczne oraz wkłady kinetyczne. Niewątpliwie największą zaletą modelu L-E jest duża możliwość modyfikacji i dopasowania do specyfiki badanych białek lub nawet złożonych kompleksów takich jak białko – ligand [Sanchez-Ruiz et al. 1988, 1992, Milardi et al. 1994, 1996, Kurganov et al. 1997, Lyubarev et al. 1998 et al. 1998, Lyubarev et al. 1998, 2000, Krupakar et al. 1999, Fessas et al. 2001].

II.2.3. Profile DSC surowicy krwi – interpretacja oraz możliwości ich wykorzystania w diagnostyce medycznej

Wynikiem pomiaru kalorymetrycznego roztworu osocza / surowicy jest profil DSC (nazywany też krzywą DSC), który pokazuje złożone przejście endotermiczne odzwierciedlające proces denaturacji termicznej białek zawartych w badanym roztworze. Wykonane pomiary dla roztworów różnych frakcji białek osocza/surowicy pozwoliły zauważyć, że nawet przy identycznych warunkach eksperymentalnych przejścia endotermiczne dla tych białek często bywają złożone, o zróżnicowanym kształcie i różniących się zakresach denaturacji, co ilustruje Rysunek II.3 zaczerpnięty z pracy Garbett et al. [Garbett et al. 2009].



Rysunek II.3. Zestawienie profili DSC uzyskanych dla poszczególnych białek w roztworach buforowych (PBS)[Suplement Garbett et al. 2009].

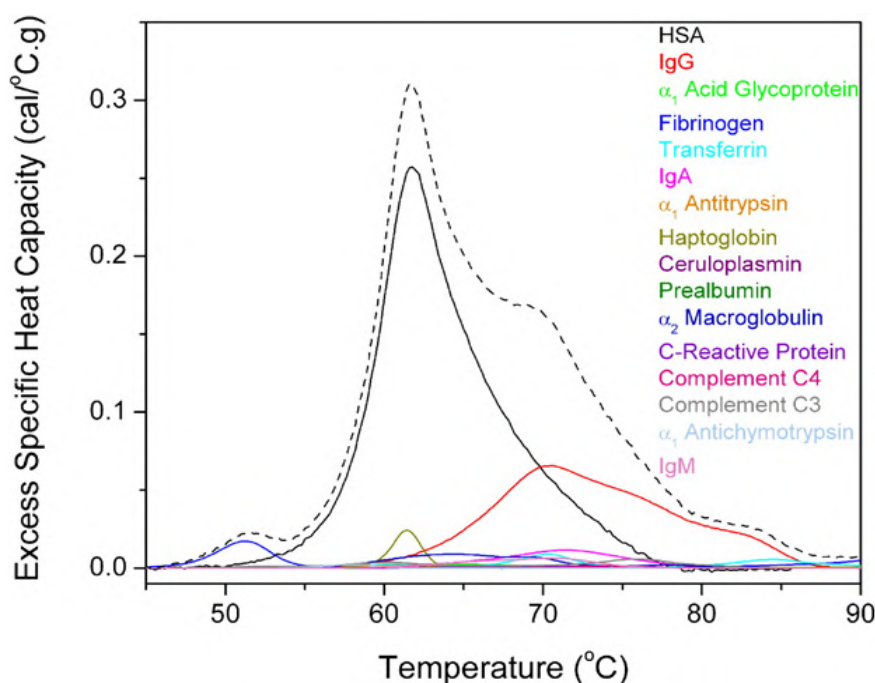
Można zatem wnioskować, że krzywe DSC roztworów poszczególnych białek różnią się: 1) zakresem przejścia endotermicznego – poszczególne proteiny mogą denaturować w nieco innym zakresie temperaturowym, 2) kształtem przejścia endotermicznego – przejście może być proste z widocznym na krzywej DSC jednym maksimum lub złożone z kilkoma rozróżnialnymi maksimumami lokalnymi, 3) temperaturą denaturacji, 4) kooperatywnością przejścia, tzn. większą lub mniejszą „wysmukłością” obserwowanego pików.

Skład białek zawartych w badanej próbce biologicznej determinuje kształt uzyskiwanego profilu DSC. Proteom płynów fizjologicznych zmienia się w czasie i zależy od czynników środowiskowych. Zatem wszystkie czynniki, jakie będą wpływać na stan zdrowia pacjenta / ochotnika przed oddaniem krwi mogą decydować o składzie i ilości białek zawartych w danej porcji surowicy / osocza. Spektrum takich czynników jest bardzo szerokie: począwszy od ogólnego stanu zdrowia osoby oddającej krew (dieta, infekcje, choroby), poprzez stan kondycji fizycznej (uprawianie sportu, przebyte wysiłki przed oddaniem krwi) czy nawet suplementację lub przebyte zabiegi (np. kriostymulacji) [Todinova et al. 2011, 2012, 2018, Krumova et al. 2015, Michnik et al. 2018, 2020, Duch et al. 2019, 2020].

Należy podkreślić, że każdy z wyżej wymienionych czynników, w różnym stopniu, wpływa na otrzymywany skład białek w próbce surowicy / osocza danej osoby. Przy zapewnieniu takich samych warunków eksperymentalnych, dla osób zdrowych, z tej samej grupy etnicznej, w podobnym wieku, prowadzących zbliżony tryb życia, profile DSC roztworów surowicy / osocza krwi są bardzo zbliżone. Dlatego ważny jest umiejętny wybór grupy kontrolnej, dzięki któremu, badania kalorymetryczne pozwalają na ocenę profili DSC surowic / osocza osób chorych w porównaniu do zdrowych, osób uprawiających wyczynowo sport w porównaniu z mało aktywnymi fizycznie. Dają one także możliwość śledzenia zaawansowania danej choroby czy skuteczności zastosowanej terapii [Garbett et al. 2008, 2009, Michnik et al. 2010, 2018, Chagovetz et al. 2011, Todinova et al. 2011, 2012, 2018, Mehdi et al. 2012, Fekacs et al. 2012, Barcelo et al. 2015, Krumova et al. 2015, Kikalishvili et al. 2015, Kędra-Królik et al. 2017, Velazquez-Campoy et al. 2018, Tenchov et al. 2019, Wiegand et al. 2019, Antonova et al. 2020, Dande et al. 2020].

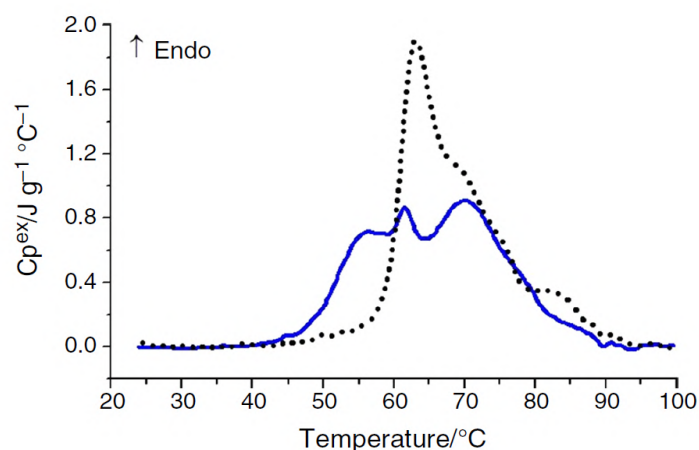
Wyjątkowość proteomu jest podstawą, która w rezultacie determinuje zmienność osobniczą obserwowanych profili DSC surowicy / osocza krwi ludzkiej. Chociaż różnią się one osobniczo to ich ogólny kształt nosi wyraźne cechy wspólne. Przy ustalonych warunkach eksperymentalnych, obserwowane przejście jest w dobrym przybliżeniu sumą wkładów, w odpowiednich proporcjach, od procesów denaturacji termicznej protein

znajdujących się w badanym roztworze (Rys. II.4). O kształcie profilu DSC decydują w największym stopniu białka występujące w surowicy / osoczu w największych ilościach oraz te, których profile DSC wyróżniają się w danych warunkach doświadczalnych w sposób charakterystyczny, jak np. haptoglobiny.



Rysunek II.4. Profil DSC roztworu buforowego osocza krwi ludzkiej (linia przerywana, kolor czarny) oraz profile DSC poszczególnych białek wchodzących w skład ludzkiego osocza (linia ciągła, różne kolory)[Garbett et al. 2009].

Rysunek II.4 prezentuje krzywą DSC buforowego roztworu osocza krwi ludzkiej [Garbett et al. 2009], natomiast na Rysunku II.5 porównano krzywe DSC wodnego oraz buforowego roztworu surowicy krwi [Michnik et al. 2021A]. Uzyskiwane profile DSC surowicy i osocza są w dużym stopniu podobne – krzywe DSC surowicy krwi ludzkiej różnią się od profili dla osocza głównie brakiem wkładu od fibrynogenu do obserwowanego przejścia endotermicznego. Należy pamiętać, że poszczególne frakcje białek badane w innym rozpuszczalniku mogą dać krzywą DSC o nieco innym kształcie. Rysunek II 3. przedstawia zestawienie uśrednionych profili DSC roztworów wodnych oraz buforowych surowic pozyskanych od tych samych kilkunastu osób zdrowych w podobnym przedziale wiekowym [Michnik et al. 2021A]. Różnią się one kształtem, ilością widocznych maksimów lokalnych oraz szerokością połówkową przejścia endotermicznego co zostanie bliżej opisane w Rozdziale IV.1.



Rysunek II.5. Zestawienie uśrednionych krzywych DSC roztworu wodnego (linia ciągła, niebieska) oraz buforowego (linia kropkowana, czarna) surowicy krwi ludzkiej [Michnik et al. 2021A].

Ważną różnicą, z potencjałem jej praktycznego wykorzystania, jest wyraźnie widoczne w przypadku wodnych roztworów surowicy maksimum lokalne pochodzący od haptoglobiny (przy około 62 °C). Zarówno w wodnych jak i buforowych roztworach haptoglobiny przejście endotermiczne jest smukłe i ma bardzo małą szerokość połówkową (HHW), co świadczy o jego dużej kooperatywności [Rys. II.1 i Rys. 3 w Michnik et al. 2021A]. Stosunkowo duża intensywność i „ostrość” przejścia sprawia, że nawet niewielka ilość haptoglobiny w surowicy krwi zdrowego człowieka może znacząco wpływać na jej profil DSC [Michnik et al. 2021A]. Jednakże, na przejściu endotermicznym obserwowanym dla surowic w buforze PBS, pik od tego białka nakłada się na przejścia innych, obficie występujących w surowicy białek i nie może być zidentyfikowany bez wykonania dekonwolucji przejścia. W przypadkach, gdy na profilach DSC roztworów wodnych surowicy widoczne maksimum przy około 62 °C ma dużą intensywność, można wnioskować o znacznie podwyższonym poziomie haptoglobiny, która jest białkiem ostrej fazy, należącym do frakcji α_2 globulin. Taki kształt uzyskanego profilu DSC może sugerować obecność silnej infekcji, stanu zapalnego lub przebytego urazu u osoby, która oddała krew do badania. Profil DSC surowicy dostarcza wówczas cennej informacji diagnostycznej.

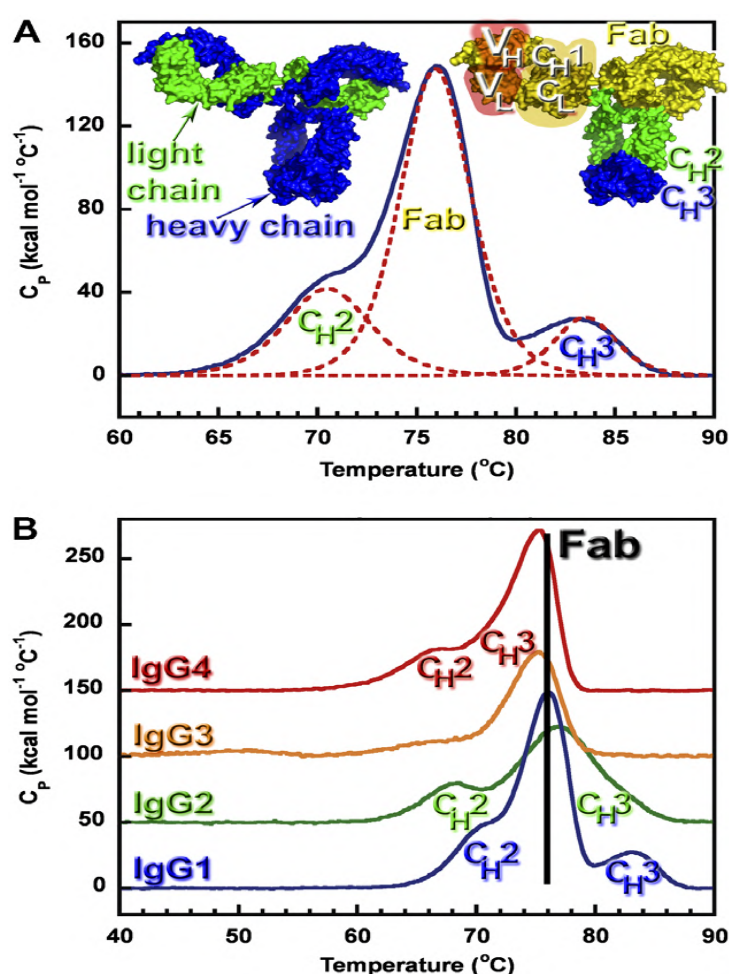
Kolejnym charakterystycznym białkiem, które należy brać pod uwagę analizując kształt profili DSC w roztworach wodnych i buforowych jest transferyna. Profil DSC roztworu buforowego transferyny posiada trzy dobrze widoczne maksima lokalne. Trzecie maksimum lokalne ujawnia się przy temperaturze ok. 83 °C (Rys. II.3),

co może tłumaczyć tak dobrze widoczny wkład od procesu denaturacji transferyny na buforowych profilach DSC surowic. W roztworze wodnym na profilu DSC transferyny uwidaczniają się tylko dwa maksima lokalne – brak jest maksimum lokalnego lub uwidacznia się tylko ramię przy temperaturze ok. 83 °C [Michnik et al. 2021A]. W rezultacie badane roztwory wodne surowic rzadziej mają na krzywych DSC dobrze widoczne maksimum przy temperaturze ok. 83 °C. Czasami można je jednak zaobserwować, ponieważ jego źródłem może być także denaturacja domeny CH3 immunoglobuliny G (IgG).

Całkowity poziom białek w surowicy to 60-80 g/L, gdzie wkład od albuminy wynosi 35-50 g/L, a od immunoglobulin 12 – 18 g/L. Albumina jako białko, które w surowicy występuje w największej ilości będzie w dużym stopniu wpływać na uzyskiwany kształt krzywej DSC surowicy. W osoczu albumina stanowi ok. 60 % masy wszystkich białek w nim zawartych. Jedną z cech albuminy jest łatwość przyłączania do niej mniejszych molekuł co powoduje, iż jest ona białkiem świetnie transportującym różnorodne ligandy [Peters et al. 1997]. Wcześniejsze badania pokazały, że wiązanie ligandów zmienia profil DSC albuminy [Shrake et al. 1988, Yamasaki et al. 1992, Michnik et al. 2007, Bohlooli et al. 2014, Ajmal et al. 2017, Guglielmell et al. 2018, Gorobets et al. 2019, Gan et al. 2021]. Stwierdzono także, że profil DSC nieligandowanej albuminy w roztworze buforowym (pH 7.2) i wodnym znacznie się różni [Michnik et al. 2010]. W roztworze buforowym na krzywych DSC albuminy jest widoczne wysmukłe przejście endotermiczne o małej szerokości połówkowej (HHW), natomiast w roztworze wodnym otrzymujemy szerokie przejście. Termiczna denaturacja nieligandowanej albuminy jest więc procesem bardziej kooperatywnym w roztworze buforowym niż wodnym. W przypadku albuminy z przyłączonymi kwasami tłuszczowymi, w obydwu zastosowanych rozpuszczalnikach otrzymuje się podobne profile DSC [Michnik et al. 2010]. Na parametry przejścia reprezentującego termiczną denaturację albuminy w określonych warunkach fizykochemicznych wpływają także jej modyfikacje oksydacyjne. Doniesienia Bruschi et al. wskazują na wzrost termicznej stabilności albuminy po utlenieniu [Bruschi et al. 2013].

W przypadku profili DSC γ globulin w roztworach buforowych powyżej temperatury ok. 71 °C widoczne jest bardzo zaawansowane przejście egzotermiczne, co może wskazywać na skłonność do agregacji tej frakcji białek w zadanych warunkach fizykochemicznych [Michnik et al. 2010]. Rozpatrując złożoność przebiegu procesu denaturacji termicznej γ globulin należy pamiętać, że w ich skład wchodzi głównie immunoglobuliny. Immunoglobuliny to grupa białek o podobnej budowie podstawowej struktury, ale przejawiająca ogromną

zmiennosc sekwencji aminokwasowych w zmiennych domenach. Dzieki tej charakterystycznej cesze immunoglobuliny moga wiadc do siebie poszczególne antygeny, co wspomaga kompleksow ochronę organizmu czlowieka. Podstawowy schemat budowy czasteczki immunoglobuliny jako hetero-tetrameru zlozonego z dwuch lancuchow ciezkich oraz dwuch lekkich jest widoczny na Rysunku II.6 A. Rysunek ten przedstawia proces denaturacji termicznej immunoglobuliny IgG1. Garber et al. pokazali, w ktorych przedzialach temperaturowych widoczne sa na profilu DSC wkłady od procesow denaturacji poszczegolnych domen czasteczki IgG1: CH2, Fab (miejsce wiazace antygen) oraz CH3 [Garber et al. 2007].



Rysunek II.6: Rysunek A przedstawia profil DSC IgG1 z wyszczególnionymi wkładami procesów denaturacji domen pokazane za pomocą dekonwolucji uzyskanej krzywej DSC. Rysunek B przedstawia zestawienie krzywych DSC wykonanych dla roztworów 4 podklas immunoglobulin G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) [Garber et al. 2007].

Rysunek II.6 B ukazuje krzywe DSC dotyczące procesów denaturacji termicznej czterech podklas immunoglobulin IgG. Należy zaważyć, że choć podklasy IgG

różnią poszczególne białka zaledwie jedną domeną to uzyskane krzywe DSC różnią się dla poszczególnych podklas. Przejście endotermiczne dla IgG posiada od 1 (IgG3) do 2/3 maksimumów lokalnych (IgG1 i IgG2). Maksimum przejścia dla poszczególnych podklas występuje przy innych temperaturach. Cząsteczki IgG3 są bardziej odporne termicznie niż pozostałe podklasy immunoglobulin G [Garber et al. 2007].

II.2.4. Czynniki wpływające na uzyskiwany kształt krzywej DSC surowicy krwi ludzkiej

Kształt uzyskiwanej krzywej DSC osocza / surowicy krwi ludzkiej zależy od szeregu czynników zarówno biologicznych, jak i środowiskowych czy eksperymentalnych. Ustandaryzowanie procedur prowadzenia eksperymentu z użyciem próbek biologicznych pozwala na ograniczenie wpływu czynników środowiskowych oraz eksperymentalnych. Odpowiedni dobór procedur oraz zrozumienie jak może przebiegać proces denaturacji poszczególnych białek, biorąc po uwagę oddziaływanie pomiędzy poszczególnymi białkami, białkami i rozpuszczalnikiem, białkami i ligandami jest bardzo ważne. Lepsze poznanie wpływu wybranych czynników na profile DSC pozwala na trafniejszą interpretację złożonego profilu DSC roztworu surowicy krwi ludzkiej.

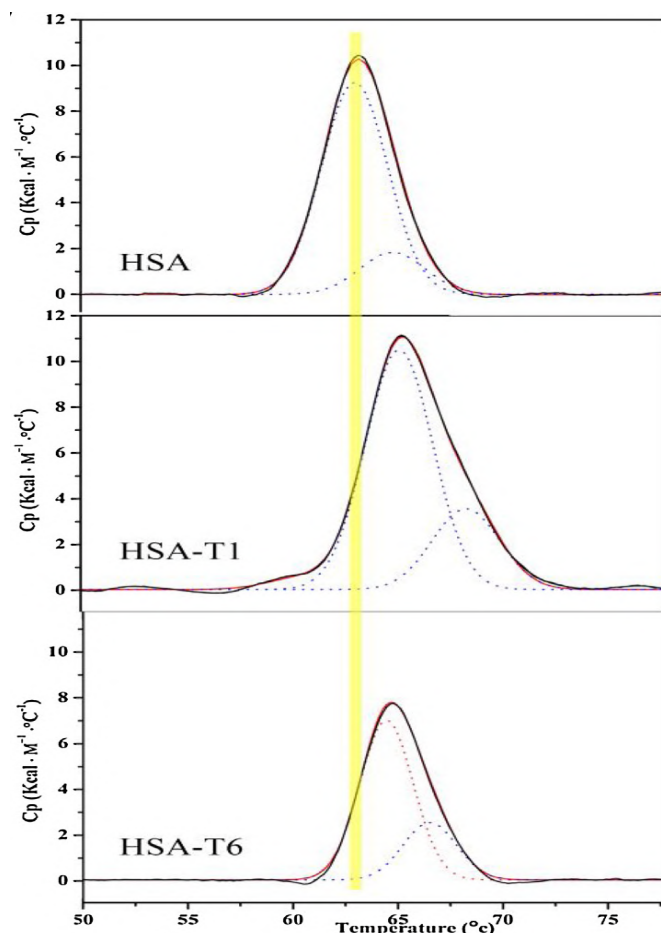
Profil termicznej denaturacji surowicy krwi silnie zależy od rodzaju rozpuszczalnika, jego składu oraz pH czy stężenia uzyskiwanego roztworu, a także od warunków prowadzenia eksperymentu (np. rodzaj zastosowanej aparatury pomiarowej, szybkość skanowania). Wynika to z podobnych zależności stwierdzonych na podstawie pokaźnego materiału doświadczalnego zebranego dla roztworów białek. Zmiana temperatury, ciśnienia, stężenia, pH czy siły jonowej roztworu może wpływać na konformację zawartych w nim białek, co znajduje odzwierciedlenie w przebiegu procesu ich rozfałdowania.

Wiele doniesień literaturowych na przestrzeni ostatnich 40 lat na temat badań termicznej stabilności białek (ludzkich, roślinnych, enzymatycznych, pochodzenia bakteryjnego) metodą DSC potwierdza, że te same białka w różnych roztworach (charakteryzujących się innym pH, siłą jonową, składem) mogą ulegać denaturacji w odmienny sposób, co ujawnia się w kształcie rejestrowanych profili DSC [Cho et al. 1982, Schoppe et al. 1997, Creagh et al. 1998, Garnier et al. 2002, Michnik et al. 2005, Bychkova et al. 2022].

Badania oddziaływań białek z innymi białkami nabierają coraz większego znaczenia w kontekście badań zarówno biologicznych jak i medycznych [Gregory et al. 1995, Golemis et al. 2005, Waksman et al. 2006, Nussinov et al. 2009, Cai et al. 2012]. Białka mają ogromną

zdolność do interakcji nie tylko ze sobą nawzajem, ale również z wieloma innymi molekułami niezależnie od ich rozmiaru. Dodatkowo łączą się one z innymi molekułami w ściśle określony sposób, ze względu na swoją budowę chemiczną oraz specyficzną zorientowaną przestrzennie strukturę. Choć dzielić interakcje białek można na oddziaływania stałe i przejściowe to nawet kompleksy przejściowe mogą dalej łączyć się z innymi związkami, np. z molekułami rozpuszczalnika. Proces denaturacji danego białka może ulegać modyfikacji w obecności innego. Badając mieszaniny najliczniej występujących w surowicy / osoczu białek zaobserwowano, że zarówno albuminy jak i α , β globuliny hamują agregację γ globulin w roztworach buforowych. Natomiast w obecności γ globulin, stwierdzono zmniejszoną stabilność oraz zwiększoną podatność na agregację albuminy w roztworach wodnych [Michnik et al. 2010]. Znaczenie interakcji białek z białkami oraz białek z molekułami rozpuszczalnika stanowi zagadnienie biologicznie fundamentalne.

Wiązania ligandów mogą znacząco wpływać zarówno na strukturę jak i właściwości fizykochemiczne białek [Musante et al. 2006, Michnik et al. 2006, 2009, Garidel et al. 2009, Bohlooli et al. 2014, Minami et al. 2014, Pírňau et al. 2018, Maciążek-Jurczyk et al. 2018, 2020, Szkudlarek et al. 2017, 2020, 2022]. Jeśli przyłączenie ligandu nastąpi do białka w stanie natywnym lub do częściowo zdenaturowanej formy, to stabilność struktury białka z ligandem może ulec zmianie. W efekcie odporność termiczna takiego kompleksu (białko - ligand) będzie inna. Obserwowane za pomocą techniki DSC przejście endotermiczne związane z procesem termicznej denaturacji złożonego kompleksu może przebiegać w innym zakresie temperaturowym niż w przypadku białka bez ligandu. Wyniki badań DSC wskazują, że przyłączenie ligandu do formy natywnej białka może powodować wzrost temperatury, przy której występuje maksimum przejścia (T_m) [Michnik et al. 2006, Koslen et al. 2019]. W pracy Gan et al. dotyczącej wiązań leków do białek zawartych w krwi pokazano, że wiązanie małych molekuł do albuminy ludzkiej (HSA), a więc zmiana jej konformacji, wpływa nie tylko na efekt farmakokinetyczny ale również na fizjologiczne funkcje białka. Poprzez dołączenie ligandu wzrasta stabilność termiczna kompleksu albumina – ligand. Rysunek II. 7 został zaczerpnięty z wymienionej publikacji i jasno pokazuje przesunięcie przejścia endotermicznego dla albuminy (HSA) wraz z przyłączonym ligandem [(HSA-T1 lub HSA-T2) w stronę wyższych temperatur [Gan et al. 2021].



Rysunek 11.7. Zestawienie profili DSC albuminy krwi ludzkiej (HSA), albuminy z Tenovinem 1 oraz albuminy z Tenovinem 6. Żółtą linią jest zaznaczone położenie maksimum lokalnego dla krzywej DSC albuminy bez ligandów [Gan et al. 2021].

Przyłączenie ligandu może nastąpić również do zdenaturowanej formy białka. Efektem będzie obserwacja na krzywych DSC procesu termicznej denaturacji w niższych temperaturach (Zasada Le Chatelier – Braun) oraz niższa wartość T_m [Cooper et al. 1993, 2000]. Oprócz przesunięć przejścia endotermicznego w stronę niższych lub wyższych temperatur na skutek przyłączenia ligandów do makromolekuł białek, kształt przejścia może ulec zmianie. Doniesienia literaturowe z końca XX wieku wykazały bimodalny charakter przejść dla niektórych kompleksów białko – ligand [Shrake et al. 1988, 1990, Yamasaki et al. 1992, Giancola et al. 1997, Cooper et al. 2000].

Dodatkowo właściwości fizykochemiczne roztworów białek mogą być też modyfikowane eksperymentalne, np. poprzez ekspozycję na promieniowanie UV [Artyukhov et al. 2001, Michnik et al. 2008], czy promieniowanie jonizujące [Michnik et al. 2013,

Smelzer et al. 2015, Michnik et al. 2016, Baccaro et al. 2018]. Próbki pobrane od różnych osób wykazują zmienną osobniczo promieniowrażliwość [IAEA 2010, Gasińska 2001].

II.3. Złożoność działania promieniowania jonizującego na roztwory białek surowicy krwi ludzkiej

Wpływ promieniowania jonizującego na większość struktur biologicznych i organizmów jest dobrze znany. Wydaje się, że mechanizmy naprawy komórek zostały dokładnie opisane. Modyfikacje konformacyjne białek i ich stabilność po ekspozycji na promieniowanie jonizujące są jednym z fundamentalnych zagadnień w kontekście zarówno radiobiologicznym czy radioterapeutycznym [Stripe et al. 2016, Słonina et al. 2016, Mishyna et al. 2017, Gramatyka et al. 2018]. Białka bowiem mogą być kluczowymi celami uszkodzeń wskutek oddziaływania promieniowania jonizującego na substancje / obiekty biologiczne [Kashkin et al. 1966, Smeltzer et al. 2015, Radman et al. 2016, Vergara et al. 2018]. Wzrost liczebności oksydacyjnych uszkodzeń struktury białek może być fenotypową przyczyną szybszego starzenia się protein, co tłumaczyłoby tezę zaproponowaną przez Radman et al., że białka są kluczowymi celami biologicznych skutków promieniowania. Zdaniem autorów proteom może odgrywać bardziej decydującą rolę w regeneracji komórek po ekspozycji na promieniowanie niż genom [Radman et al. 2016]. Naukowcy wciąż badają wpływ promieniowania jonizującego na białka także pod kątem aplikacyjnym w przemyśle spożywczym [Baccaro et al. 2018]. Od wielu lat promieniowanie jonizujące jest szeroko stosowane do sterylizacji i modyfikacji żywności. Procedura ta pozwala na podniesienie jakości i wydłużenie okresu przydatności do spożycia wielu produktów. Dawki najczęściej stosowane w takim przypadku oscylują na poziomie kilkudziesięciu kGy, zaczynając od 1 kGy do nawet 70 kGy [Cieśla et al. 2007, 2010].

Uważa się, że dawki z zakresu od 1 Gy wzwyż są w stanie wpływać na interakcje oraz strukturę białek [Reisz et al. 2014]. Wybrany, do badań w ramach niniejszej pracy, został zakres dawek promieniowania rentgenowskiego od 5 Gy do 120 Gy. Dawki od 8 Gy do 15 Gy są najczęściej stosowane jako dawki frakcyjne w radioterapii stereotaktycznej (SBRT – *eng. stereotactic body radiation therapy*) [Wulf et al. 2004]. Taki sam zakres dawek jest też powszechnie stosowany jako dawki całkowite w przypadku napromieniania całego lub połowy ciała w technikach TBI i HBI (TBI – *eng. total body irradiation*, HBI – *eng. half body irradiation*) [Mekdash et al. 2017]. Dawka 10 Gy jest szeroko stosowana

w radiochirurgii stereotaktycznej (RS) jako dawka całkowita lub frakcyjna podana w pojedynczej frakcji podczas sesji radioterapeutycznej [Kalapurakal et al. 2006]. RS stała się metodą odpowiednią dla chirurgicznie niedostępnych guzów, szczególnie zmian nowotworowych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [Mitrasinovic et al. 2019]. Radiochirurgia stereotaktyczna jest często stosowana z/po innych terapiach, takich jak radioterapia całego mózgu (WBRT – *eng. whole brain radiotherapy*) w przypadku przerzutów do mózgu wielu rodzajów nowotworów [Combs et al. 2004, Yomo et al. 2013, Possanzini et al. 2018]. Dawkę 10 Gy, jako dawkę frakcyjną, stosuje się również w przypadku leczenia paliatywnego zaawansowanych nowotworów ginekologicznych [Onsrund et al. 2001]. Dawki z zakresu od 5 Gy do 75 Gy, używane są w radioterapii jako dawki całkowite, podawane pacjentowi we frakcjach od 1.8 Gy do 2 Gy [Yoo et al. 2010, Gabryś et al. 2011, Leszczyński et al. 2012, Hung et al. 2022]. Wysokie dawki frakcyjne promieniowania, od 20 Gy do nawet 40 Gy, stosuje się jako dawkę w terapii stereotaktycznej wczesnego stadium, a tak powstałą terapię nazywa się przyspieszonym częściowym napromienieniem raka piersi (APBI – *eng. accelerated partial breast irradiation*) [Rahimi et al. 2017]. W przypadku APBI, jako techniki leczenia stosuje się teleradioterapię (np. IMRT – *eng. intensity modulated radiotherapy*, radioterapia wiązką z modulacją intensywności dawki) albo brachyterapię.

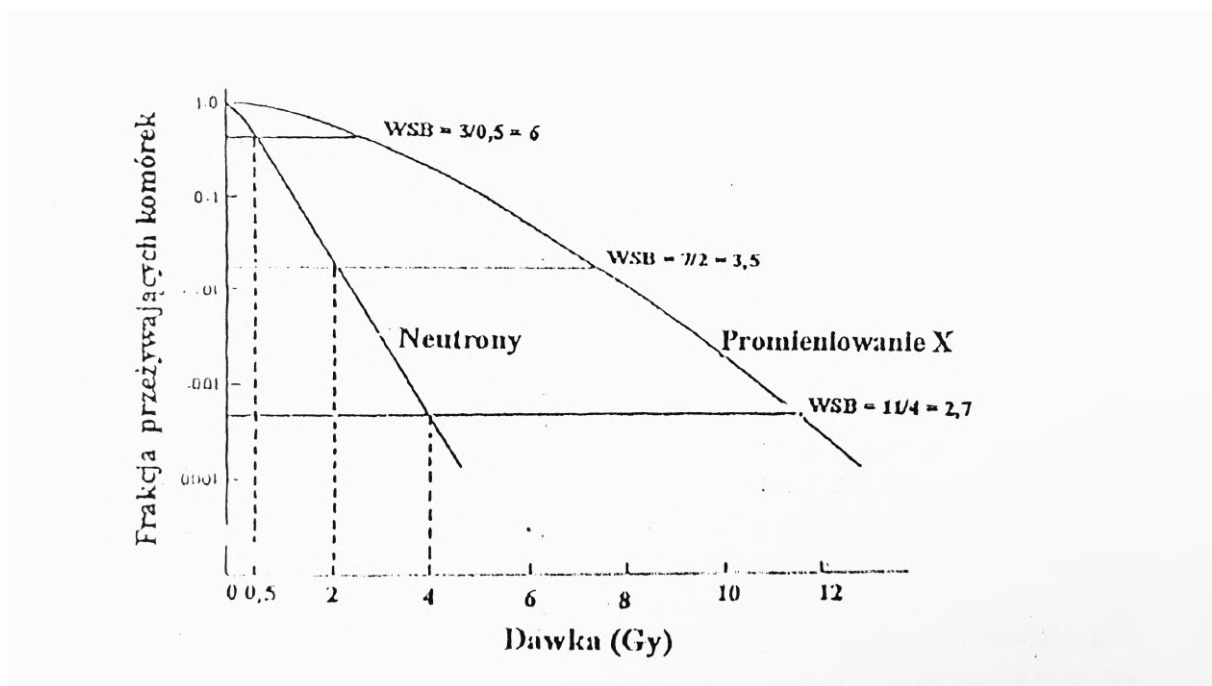
Promieniowanie neutronowe było wykorzystywane w radioterapii powszechniej w ubiegłym wieku, natomiast stosunkowo duża częstość występowania skutków ubocznych spowodowała odejście od tej metody terapeutycznej [Laramore et al. 1985, Buchholz et al. 1992, Douglas et al. 2003]. W jednostkach naukowych bywa stosowana terapia borowo-neutronowa (BNCT – *eng. Boron Neutron Capture Therapy*), zaprojektowana aby wspomóc leczenie pacjentów z nowotworami złośliwymi obszaru głowy [Barth et al. 2015, Dai et al. 2022, Chen J et al. 2022, Chen YW et al. 2022, Monti Hughes et al. 2022, Porra et al. 2022, Kanygin et al. 2022]. BNCT nie jest jednak globalnie wykorzystywana w leczeniu klinicznym. Ważnym aspektem związanym z promieniowaniem neutronowym jest produkcja neutronów wtórnych, które są skutkiem ubocznym terapii podczas stosowania wysokoenergetycznego promieniowania X lub protonowego. Dla wiązek o nominalnej wartości napięcia przyspieszającego powyżej 8 MV, mogą zachodzić reakcje fotojądrowe (γ, n), ($\gamma, 2n$) z elementami głowicy akceleratora, następnie reakcje jądrowe (n, γ) ze wszystkimi elementami wyposażenia bunkra łącznie z powietrzem wewnątrz. W rezultacie, podczas sesji terapeutycznej pacjent jest wystawiony nie tylko na działanie wiązki terapeutycznej, ale również neutronów oraz fotonów generowanych wtórnie. Analiza efektów działania

cząstek wtórnie produkowanych podczas radioterapii jest prowadzona eksperymentalnie i teoretyczno-eksperymentalnie za pomocą zaawansowanych modeli symulacyjnych [Spurný et al. 1996, Kry et al. 2009, Polaczek-Grelik et al. 2010, 2012, Janiszewska et al. 2014, Ezzati et al. 2017, Romero-Expósito et al. 2016, Smith et al. 2019, Leite et al. 2021]. Badanie wpływu neutronów na organizm ludzki jest więc zagadnieniem bardzo istotnym radiobiologicznie.

Promieniowanie rentgenowskie i neutronowe mogą mieć szkodliwy wpływ na organizmy żywe, ponieważ powodują jonizację materii. W ocenie stopnia uszkodzeń po ekspozycji na promieniowanie jonizujące należy wziąć pod uwagę powierzchnię wystawioną na działanie promieniowania (w tym rodzaj narządu /tkanki), wielkość zadanej dawki, czas ekspozycji oraz rodzaj zastosowanego promieniowania. Promieniowanie rentgenowskie oddziałuje z materią najczęściej poprzez efekt fotoelektryczny, zjawisko Comptona lub tworzenie par. Prawdopodobieństwo zajścia danego efektu zależy ściśle od energii promieniowania padającego na materię, przy niższych energiach dominować będzie efekt fotoelektryczny, następnie efekt Comptona, a przy energiach wysokich tworzenie pary elektron-pozyton. W przypadku prowadzonych badań dotyczących próbek biologicznych, zjawiskami dominującymi są efekt fotoelektryczny oraz zjawisko Comptona. Neutrony jako cząstki elektrycznie neutralne bezpośrednio nie wywołują jonizacji. W efekcie oddziaływania z materią neutrony wywołują zjawiska takie jak reakcje jądrowe czy elastyczne rozpraszanie na lekkich jądrach atomowych i protonach. Neutrony jonizują więc materię pośrednio, poprzez jonizację spowodowaną przez wytworzone cząstki naładowanej wskutek reakcji jądrowych.

Skutki oddziaływania promieniowania jonizującego z materią biologiczną mogą zależeć od szeregu czynników fizycznych (np. rodzaju promieniowania, dawki) i biologicznych (w przypadku oddziaływania na komórki np. poziom utlenowania, promieniowrażliwość, stopień uwodnienia). Zależność obserwowanych skutków od natury oddziaływania różnych rodzajów promieniowania jest ścisła. Cząstki zdolne do intensywnej jonizacji, takie jak ciężkie jony, cząstki alfa czy neutrony są zdolne silnie jonizować na stosunkowo krótkim odcinku przebytej drogi w materii. Natomiast oddziaływanie promieniowania rentgenowskiego czy promieniowania gamma powoduje jonizację na długiej drodze ale o stosunkowo niskiej intensywności. Dzieje się tak ze względu na oddawanie całej bądź części energii fotonów na zajście efektów – fotoelektrycznego, tworzenia par i Comptona. Ilość energii utraconej przez cząstki jonizujące materię, przez którą przechodzą na odcinku drogi ich jonizacji określa liniowy przekaz energii (LPE lub LET – *eng. linear*

energy transfer) wyrażony w jednostkach keV/ μm [Goodhead et al. 1989, Gasińska 2001]. Parametrem uwzględniającym zależność skuteczności biologicznej od rodzaju promieniowania, dawki (w tym mocy dawki i liczby frakcji) oraz rodzaju materii poddanej działaniu promieniowania jest względna skuteczność biologiczna (WSB lub RBE – *eng. relative biological effectiveness*). Wartość RBE jest wprost proporcjonalna do ilorazu dawki wiązki standardowej oraz dawki wiązki testowanej. Przyjmuje się też modyfikację wzoru jako iloraz dawki promieniowania X (o maksymalnej energii 250 kV) wywołującej efekt F oraz dawki innego promieniowania wywołującej efekt F, gdzie F oznacza dowolny efekt [Gasińska 2001]. Rysunek II.8. przedstawia tzw. krzywą przeżywalności frakcji komórek poddanych działaniu dwóch rodzajów promieniowania – neutronowego (wysokie LET) oraz rentgenowskiego (niskie LET). Przy zastosowanej dawce 4 Gy promieniowania neutronowego liczba frakcji komórek, które nie uległy zniszczeniu jest znikoma, w porównaniu do liczby frakcji komórek napromienionych fotonami o takiej samej dawce.



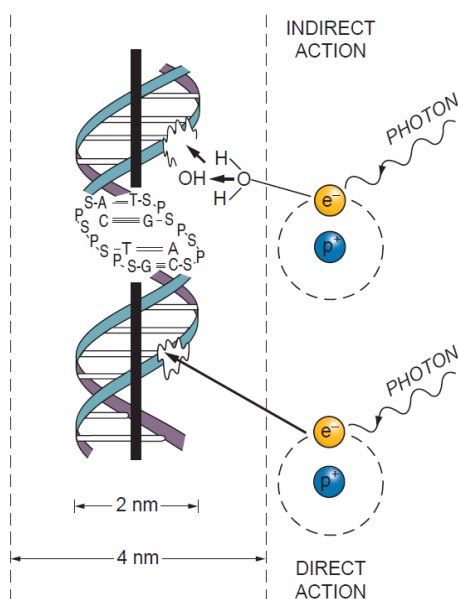
Rysunek II.8. Krzywa przeżywalności komórek eksponowanych na promieniowanie X lub promieniowanie neutronowe [Gasińska 2001].

Ogólne biologiczne skutki oddziaływania promieniowania jonizującego z materią biologiczną można podzielić na dwa rodzaje – skutki stochastyczne oraz deterministyczne. Jeśli częstość wystąpienia spodziewanych efektów ekspozycji na promieniowanie jonizujące

zależy od wielkości zadanej dawki promieniowania, to nazywa się je skutkami stochastycznymi. Jeśli wraz ze wzrostem dawki, wzrasta stopień zaawansowania występujących uszkodzeń popromiennych to skutki te nazywa się deterministycznymi. Skutki deterministyczne występują tylko powyżej pewnego progu dawki, zależnego od rodzaju promieniowania oraz materiału / struktury ekspozowanej na promieniowanie jonizujące [Broszkiewicz et al. 1963, Gorczyca et al. 1997, Pruszyński et al. 2005].

Wyróżnia się dwa mechanizmy oddziaływania promieniowania z biologicznie ważnymi elementami komórki (Rys. II.9):

- Bezpośredni – tzw. efekt tarczy – uszkodzone zostają najbardziej wrażliwe struktury komórkowe przez wolny elektron (25%), dominuje przy oddziaływaniu z promieniowaniem o wysokim LET,
- Pośredni – uszkodzenie struktur komórki przez wolne rodniki na skutek radiolizy wody (75%), dominuje przy oddziaływaniu z promieniowaniem o niskim LET.



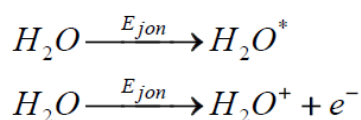
Rysunek II.9. Pośrednie i bezpośrednie działanie promieniowania jonizującego na przykładzie nici DNA [Hall et al. 2000].

Wolne rodniki to jony, atomy lub cząsteczki, które mają od jednego do kilku niesparowanych elektronów na powłoce walencyjnej. Wolne rodniki mogą istnieć samodzielnie ale w większości przypadków są związkami nietrwałymi i silnie reaktywnymi. Źródło powstawania wolnych rodników może być wewnątrzkomórkowe (powstają w mitochondriach podczas normalnych przemian fizjologicznych w komórce) lub zewnątrzkomórkowe (pod wpływem działania czynników zewnętrznych). Szerokie

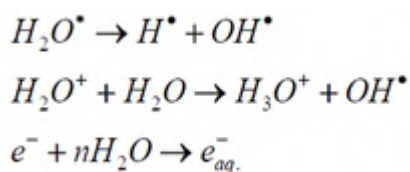
spektrum promieniowania elektromagnetycznego jest znanym czynnikiem generującym powstawanie w większych ilościach wolnych rodników. Do czynników zewnętrznych zwiększających produkcję reaktywnych form tlenu (ROS – *eng. reactive oxygen species*) należą: ultradźwięki, hipoksja czy wysiłek fizyczny.

Promieniowanie jonizujące powoduje radiolizę wody, na skutek czego również powstawać mogą wolne rodniki. Proces jonizacji wody składa się z trzech etapów:

- I etap – procesy fizyczne – wzbudzenie i jonizacja cząsteczek wody, czas trwania ok. 10^{-16} s,



- II etap – procesy chemiczne – skutkiem zajścia reakcji jest powstawanie wolnych rodników (stanowiących fragmenty cząsteczek) i elektronów uwodnionych (niesparowanych), czas trwania ok. 10-13s,

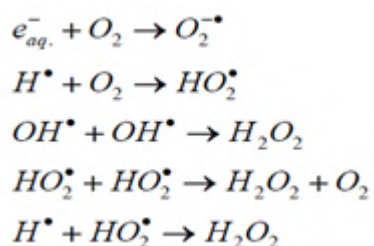
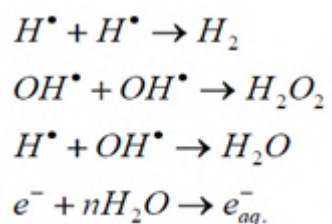


gdzie,

OH^* - wolny rodnik wodorotlenkowy.

Rodnik wodorotlenkowy jest najbardziej uszkodzającym czynnikiem makrocząsteczek biologicznych, choć jego czas działania i zasięg jest bardzo krótki.

- III etap – procesy biochemiczne – czas trwania ponad 10^{-12} s



gdzie,

$O_2^{\cdot -}$ - Anionorodnik ponadtlenny.

Anionorodnik ponadtlenny może również uczestniczyć w reakcjach, których efektem będzie powstawanie kolejnych aktywnych form tlenu nazywanych reaktywnymi formami tlenu (ROS – *eng. reactive oxygen species*)[Beckman et al. 1998, McCord et al. 2000].

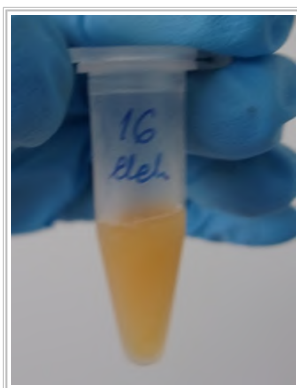
Białka osocza krwi ludzkiej mają właściwości ochronne względem reaktywnych form tlenu ROS poprzez możliwość wychwytu i związania wolnych rodników. Albumina jako białko posiadające duże zdolności wiązania ligandów, wiąże od 10 % do nawet 50 % nadtlenu obecnych w osoczu [Józwiak et al. 2012]. Oddziaływania wolnych rodników powstałych na skutek radiolizy wody z białkami mogą powodować zmiany oksydacyjne białek, fragmentację, a nawet agregację, co zostało bliżej opisane w Rozdziale II.1.

III. MATERIAŁ I METODYKA

III.1. Materiał badawczy – surowica krwi ludzkiej

Materiał badawczy uzyskano w ramach współpracy z Katedrą Nauk Fizjologiczno - Medycznych Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach. Protokół badań był zgodny z wytycznymi Deklaracji Światowego Stowarzyszenia Medycznego w Helsinkach oraz został zatwierdzony przez Instytucjonalny Komitet Etyki Akademii Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach (certyfikat zatwierdzenia nr 4/2013).

Próbki surowicy uzyskano z krwi pobranej od 26 zdrowych, młodych ochotników w wieku 25 ± 5 lat (20 mężczyzn oraz 6 kobiet) (Rys. III.1). Krew pobierano z żyły ochotnika, a następnie próbki surowicy zostały uzyskane przy użyciu rutynowych procedur. Przechowywanie surowic odbywało się w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Rysunek III.1. Surowica krwi ludzkiej.

III.2. Przygotowanie próbek

Po rozmrożeniu próbki surowicy krwi danej osoby, sporządzane były 20 – krotnie rozcieńczone wodne lub buforowe roztwory. Do roztworów wodnych używana była odgazowana woda destylowana, po rozcieńczeniu surowicy pH roztworów wynosiło 6.5 ± 0.5 . Do sporządzenia roztworów buforowych stosowano odgazowany bufor PBS (0.001M, pH = 7.4). Świeży roztwór surowicy krwi uczestnika badania był następnie dzielony na dwie porcje w celu uzyskania: próbki przeznaczonej do ekspozycji na promieniowanie jonizujące (**próbki napromienianej**) oraz **próbki kontrolnej** (Rys. III.2). Napromieniowywanym próbkom zawsze towarzyszyły odpowiednie próbki kontrolne, przebywające (poza samą ekspozycją) zawsze w takich samych warunkach.



Rysunek III.2. Roztwory surowicy krwi ludzkiej jednego ochotnika (próbka kontrolna oraz napromieniana).

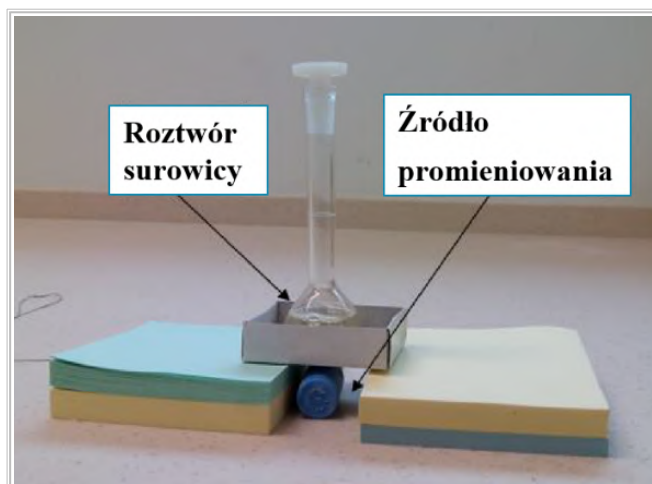
III.3. Proces ekspozycji in vitro próbek surowicy na promieniowanie jonizujące

III.3.1. Ekspozycja na promieniowanie neutronowe

Źródłem neutronów o średniej energii 2,35 MeV był radioizotop Californ-252, którego aktywność w czasie eksperymentu wynosiła od 65 do 58 MBq. Czas połowicznego zaniku tego izotopu to 2.646 lat. Rozpada się on poprzez przemianę alfa (97%) oraz rozszczepienie spontaniczne (3%).

Roztwór surowicy podczas procesu ekspozycji na promieniowanie neutronowe znajdował się około 0.5 cm ponad źródłem promieniowania (Rys. III.3). W pomieszczeniu

oprócz próbki napromienianej zawsze znajdowała się również próbka kontrolna umieszczona za osłoną w pewnej odległości od źródła. Temperatura w pomieszczeniu wynosiła 20 ± 2 °C.



Rysunek III.3. Proces ekspozycji roztworu surowicy na promieniowanie neutronowe z wykorzystaniem źródła Californ-252

Większość próbek poddanych działaniu promieniowania neutronowego została napromieniona dawką 5 Gy. Wykonano też cykl pomiarów dla jednej próbki z zadaną dawką 13 Gy. W tej części doświadczenia badano tylko wodne roztwory surowicy krwi ludzkiej. Czas ekspozycji, zależnie od aktywności źródła w okresie ekspozycji, wynosił od 24 do 26 godzin dla uzyskania dawki 5 Gy. W przypadku próbki napromienianej dawką 13 Gy czas ekspozycji wynosił 69 godzin. Był on wyliczany na podstawie wzoru (15) z wykorzystaniem makra utworzonego w programie Excel:

$$H = \frac{k_n C_n A t_{\text{ekspozycji}}}{4 \pi l^2} \quad (15)$$

gdzie,

H - dawka równoważna,

$T_{\text{ekspozycji}}$ – czas ekspozycji,

k_n - współczynnik konwersji gęstości strumienia na moc dawki równoważnej,

C_n - liczba neutronów wysyłana w pełny kąt bryłowy na 1s na 1GBq,

A - aktywność źródła [GBq],

l - odległość od źródła [cm].

Wykorzystane dane:

$$k_n = 1.30 * 10^{-3} \text{ [mSv} \times \text{cm}^2 \text{h}^{-1} \text{s]},$$

$$A_0 = 0.153 \text{ [GBq]} \text{ (aktywność początkowa źródła, zgodnie z certyfikatem producenta),}$$

$T_{1/2}$ (półzaniku) = 2.646 lat,

t = zmienny [miesiące],

A = zmienna [GBq] (aktywność źródła obecnie),

C_n = $1.16 \cdot 10^8$ [$s^{-1}GBq^{-1}$],

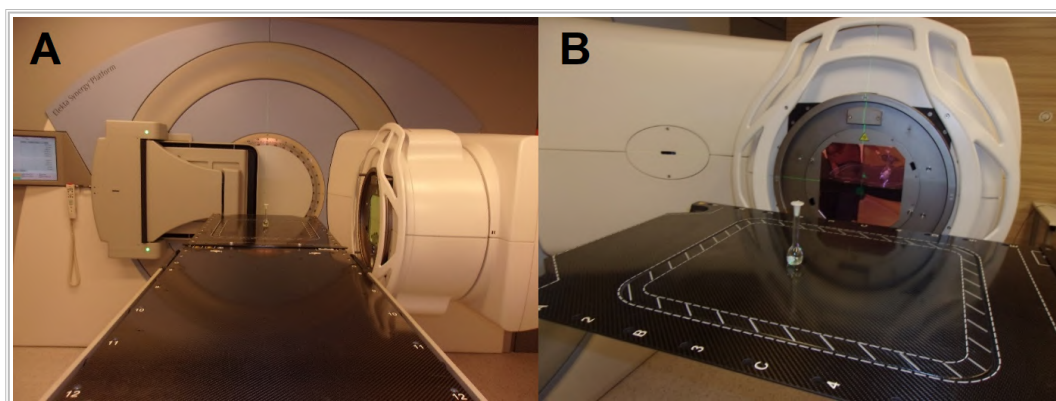
H = zmienna [mSv],

l = 0.5 [cm]

En_{sr} = 2.35 [MeV] (średnia energia neutronów ze źródła ^{252}Cf).

III.3.2. Ekspozycja na promieniowanie X

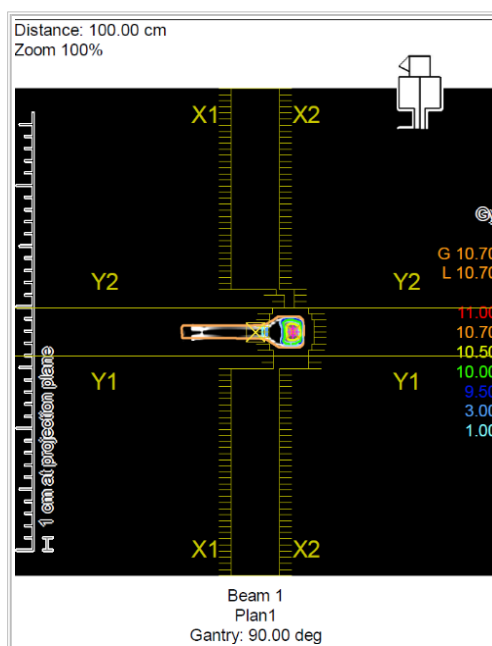
Roztwory surowicy zostały poddane ekspozycji na promieniowanie X o nominalnej wartości napięcia przyspieszającego 6MV, generowane przez liniowy akcelerator medyczny firmy Elekta (Rys. III.4 A,B). Badania były prowadzone w NU-Med Centrum Diagnostyki i Terapii Onkologicznej Katowice. Proces napromienienia odbywał się w oparciu o dedykowany „plan leczenia” opracowany przy pomocy systemu planowania leczenia Oncentra Masterplan z użyciem algorytmu obliczania dawki Collapsed Cone. Dla kolbki zawierającej wodę zostało wykonane badanie za pomocą tomografii komputerowej. Następnie uzyskane dane zostały zaimportowane do systemu planowania leczenia. W celu uzyskania homogenicznej dawki zostały wykorzystane dwa naprzeciwległe pola ukształtowane za pomocą kolimatora MLC (Agility™ multileaf collimator) (Rys. III.5 A, B oraz Rys. III.6). Użyta została wiązka o potencjale nominalnym 6 MV i średniej energii wiązki 1.5 MeV, moc dawki wynosiła 450 JM/min. Temperatura w pomieszczeniu terapeutycznym wynosiła około 22 ± 1 °C, tak samo jak temperatura w sterowni akceleratora, w której podczas ekspozycji przebywała próbka kontrolna.



Rysunek III.4. Proces ekspozycji roztworu surowicy na promieniowanie X z wykorzystaniem akceleratora medycznego.



Rysunek III.5. Rozkład dawki w fiole zawierającej próbkę – zrzuty ekranu z systemu planowania leczenia w dwóch płaszczyznach (A – przekrój czołowy, B – przekrój poprzeczny).



Rysunek III.6. Kształt pola napromieniania dopasowany za pomocą kolimatora MLC – zrzut ekranu z systemu planowania leczenia.

Podczas badań wpływu promieniowania X na surowicę krwi ludzkiej większość próbek została napromieniona dawkami 5 Gy oraz 10 Gy. Badano roztwory wodne oraz buforowe. Jeśli była możliwość, to badania dla surowicy pobranej od tego samego ochotnika, przeprowadzono w dwóch rozpuszczalnikach.

W celu zbadania zależności obserwowanych zmian od wielkości zadanej dawki promieniowania, dodatkowo zastosowano dawki: 10 Gy, 30 Gy, 70 Gy, 120 Gy (Tabela III.1). Serie badań wykonano tylko dla roztworów wodnych.

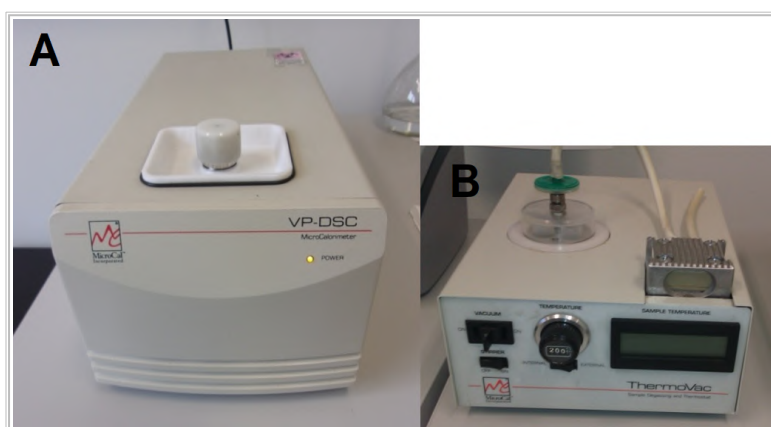
Tabela III.1. Czas ekspozycji próbek surowicy na promieniowanie X w zależności od zadanej dawki.

Dawka [Gy]	Czas napromieniania [JM]		Czas napromieniania [min]
	Kąt 90	Kąt 270	
5	228.3	227.9	1.0
10	452.3	451.5	2.0
30	1345	1344.7	6.0
70	4140	4140	18.4
120	5380	5380	23.9

III.4. Aparatura pomiarowa

III.4.1. Mikrokalorymetr VP-DSC

Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem mikrokalorymetru VP-DSC firmy *MicroCal* (Northampton, MA) (Rys. III.7A) z oprogramowaniem VPViewer współpracującym z aplikacją Origin. Dodatkowo zestaw uzupełnia urządzenie *ThermoVac* służące do odgazowywania i termostatowania próbek oraz czyszczenia komór pomiarowych (Rys. III.7B). Do precyzyjnego, prawidłowego nałożenia próbek, potrzebny jest lejek oraz dwie specjalne strzykawki: *Hamilton* z tępą zakończoną igłą o odpowiedniej długości oraz strzykawka z igłą zaopatrzoną w pierścień, do wyrównywania poziomu zaaplikowanego roztworu w rurkach kapilarnych prowadzących do komór pomiarowych (Rys. III.8).

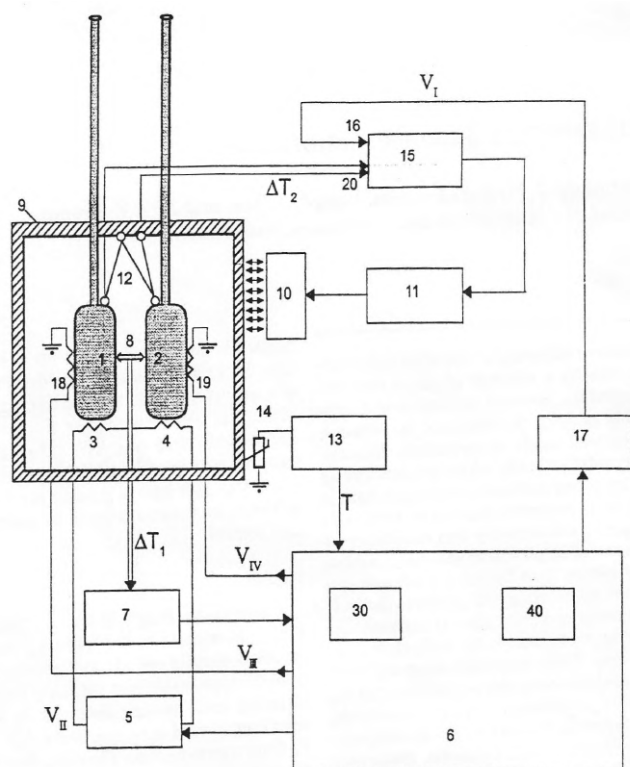


Rysunek III.7. Mikrokalorymetr VP-DSC (A) oraz urządzenie *ThermoVac* służące do odgazowywania cieczy (B).



Rysunek III.8. Zestaw potrzebny do prawidłowego nałożenia próbki: a) lejek, b) strzykawka z pierścieniem do wyrównywania poziomu cieczy w odprowadzeniach kapilarnych (Rys. III.9), c) strzykawka Hamilton z igłą odpowiedniej długości o tępej końcówce do nakładania próbek.

Aparat, który był wykorzystany do wykonania wszystkich pomiarów w niniejszej pracy jest przeznaczony głównie do badań próbek w stanie ciekłym. Urządzenie pracuje w stosunkowo wąskim zakresie temperatur od 0 do 130 °C, z maksymalną szybkością grzania 90 stopni/godz. i chłodzenia 60 stopni/godz. Mikrokalorymetr VP-DSC to kalorymetr z dwoma niewyjmawalnymi komorami pomiarowymi wykonanymi z tantalu. Komory mają objętość ok. 0.514 ml. Schemat takiego typu kalorymetru przedstawia Rysunek III.9 [Plotnikov et al. 1997]. Jedna komora jest przeznaczona na próbkę, natomiast druga to komora referencyjna dla substancji wzorcowej. Dzięki wykorzystaniu takiego typu aparatu, możliwa była rejestracja bardzo małych efektów cieplnych jakie towarzyszą zjawisku denaturacji termicznej białek w roztworach surowicy krwi.



Rysunek III.9. Schemat budowy mikrokalorymetru z dwoma niewyjmawalnymi komorami (1, 2) umieszczonymi w osłonie termicznej (9). Najważniejsze elementy budowy aparatu to: elementy grzewcze główne (3, 4) i pomocnicze (18, 19), krystaliczny czujnik do pomiaru różnicy temperatur między dwoma komorami (8), czujniki temperaturowe (12), miernik efektu cieplnego (7), urządzenie chłodząco-grzewcze (10) sterowane przez regulator (11). Schemat został zaczerpnięty z pracy Plotnikov et al., gdzie można znaleźć pozostałe oznaczenia elementów [Plotnikov et al. 1997].

III.4.2. Spektrofotometr Jasco V530

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem spektrofotometru Jasco V-530 (Rys. III.10). Jest to urządzenie wyposażone w pojedynczy monochromator oraz dwa źródła fali świetlnej: lampę deuterową (190 – 350 nm) oraz halogenową (350 – 1100 nm). Jako detektor zastosowana została fotodioda.



Rysunek III.10. Spektrofotometr Jasco V-530.

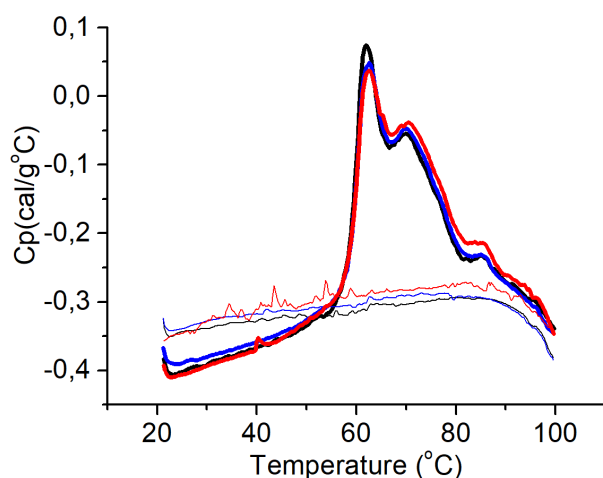
III.5. Metodyka badań kalorymetrycznych

Dla każdej próbki zostały wykonane po dwa skany w zakresie temperatur 20 – 100 °C z szybkością grzania 1°C/min, 15-minutowym czasem termostatowania przed właściwym pomiarem przy ciśnieniu około $1.7 \cdot 10^5$ Pa. Biorąc pod uwagę charakter przejścia denaturacyjnego białek surowicy, zastosowano pasywny tryb pomiarów. Okres filtrowania danych (tzw. *Filtering Period* – czas uśredniania pobieranych danych) ustalono na 16, biorąc pod uwagę, że zakres odpowiedni dla pomiarów białek to 10 – 20 sek.

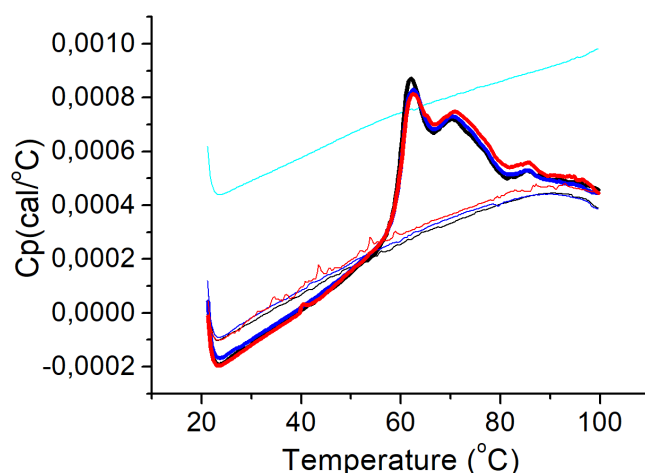
Za pomocą programu Origin 5.0 z nakładką firmy *MicroCal* uzyskane wyniki zostały opracowane do dalszej analizy. W pierwszym etapie od surowych krzywych DSC surowic odjęto instrumentalną linię bazową, którą stanowił skan woda-woda lub bufor-bufor w zależności od użytego w danej serii pomiarowej rozpuszczalnika. Następnie została przeprowadzona normalizacja stężeniowa, aby zaprezentować uzyskane wyniki w przeliczeniu na 1 gram białka całkowitego surowicy. Ilość białka w badanej objętości próbki pomiarowej (objętość komory mikrokalorymetrycznej to 0.5137 mL) mieściła się w przedziale 1.5 – 2.7 g. Zawartość białka całkowitego w próbkach surowicy była

oznaczana w ramach biochemicznych badań laboratoryjnych, a ewentualne korekty zawartości białek przygotowanych roztworach wprowadzane były na podstawie widm UV-VIS tych roztworów. Od znormalizowanych profili DSC została następnie odjęta linia bazowa typu liniowego. Ostateczne wyniki są przedstawione jako pozorna nadmiarowa pojemność cieplna C_p^{ex} [$\text{J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$] w funkcji temperatury T [$^\circ\text{C}$].

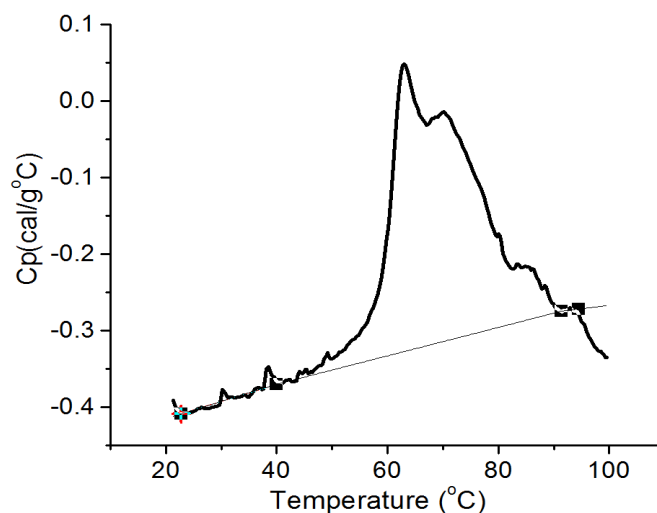
Poszczególne etapy przetwarzania krzywych DSC pokazano na Rys. III.11 – Rys. III.14 dla przykładowych roztworów buforowych surowicy krwi ludzkiej.



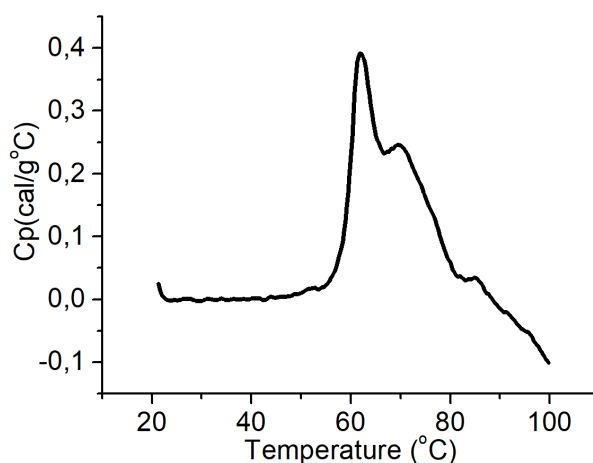
Rysunek III.11 Krzywe DSC (po dwa skany) po odjęciu linii instrumentalnej bufor-bufor oraz po normalizacji na 1 gram białka.



Rysunek III.12 Krzywe DSC zarejestrowane po dwa skany dla trzech próbek: wyjściowej (czarny), kontrolnej (niebieski) oraz napromienionej (czerwony), gdzie linie grube reprezentują pierwsze skany, cieńsze natomiast drugie skany.



Rysunek III.13 Proces wyznaczenia linii bazowej za pomocą narzędzi dostępnych w programie Origin 5.0 z nakładką firmy MicroCal.



Rysunek III.14 Pierwszy skan roztworu surowicy po odjęciu linii bazowej.

Z tak opracowanych krzywych DSC zostały wyznaczone parametry termodynamiczne obserwowanych przejść:

- 1) temperatura przejścia T_m [°C] (temperatura w maksimum pików) oraz temperatury maksimumów lokalnych T_i [°C] (najczęściej $i = 1, 2, 3$),
- 2) pojemność cieplna C_p^{ex} [$J g^{-1} °C^{-1}$] odpowiadająca temperaturze przejścia oraz temperaturom maksimumów lokalnych (wtedy oznaczana jako $C_p^{ex_i}$),
- 3) zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek surowicy ΔH [Jg^{-1}] (obliczona jako pole pod pikiem w zakresie temperaturowym przejścia endotermicznego),

4) wartość szerokości połówkowej (HHW) przejścia w połowie wysokości piku, który je reprezentuje.

III.6. Metodyka badań spektrofotometrycznych

Próbki surowicy krwi ludzkiej po umieszczeniu w kwarcowej mikrokuwecie (droga optyczna 3 mm – Rys. III.15) były mierzone w zakresie od 200 nm do 800 nm z dokładnością pomiaru 1 nm i szybkością skanowania 400 nm / min. Rejestrowano widma absorpcyjne roztworów surowicy krwi ludzkiej: 1) zaraz po sporządzeniu roztworów, 2) po ekspozycji na promieniowanie jonizujące oraz 3) co tydzień do 2 – 4 tygodni. Za pomocą dedykowanego programu *Spectra Analysis* była prowadzona analiza otrzymanych widm absorpcyjnych, zarówno wodnych jak i buforowych, roztworów surowicy krwi ludzkiej.



Rysunek III.15. Mikrokuwety kwarcowe – referencyjna wypełniona wodą i pomiarowa wypełniona roztworem surowicy krwi ludzkiej.

III.7. Tryb pomiarów

Dla roztworów surowicy były wykonywane pomiary kalorymetryczne oraz spektrofotometryczne:

1. świeżo przygotowanych roztworów surowic (**próbki wyjściowe**), **próbek kontrolnych** oraz **próbek napromienionych** zaraz po zakończeniu procesu ekspozycji na promieniowanie lub 1 dzień po ekspozycji (**1d**)

- przechowywanych w lodówce w temperaturze ok. 4 °C próbek napromienionych oraz kontrolnych; pomiary wykonywano co tydzień przez okres 1 - 4 tygodni od ekspozycji na promieniowanie (**1t, 2t, 3t, 4t**).

W celu obserwacji bezpośrednich efektów działania promieniowania neutronowego na roztwory surowicy krwi ludzkiej, możliwie najszybciej po zakończeniu ekspozycji były wykonywane pomiary DSC dla próbek napromienionych oraz kontrolnych. Ze względu na zmieniającą się w czasie aktywność źródła neutronów oraz brak termostatowania pomieszczenia, w którym przeprowadzany był eksperyment napromieniania określoną dawką, zarówno czas ekspozycji, jak i temperatura otoczenia nie były takie same w poszczególnych seriach pomiarowych. Rygorystycznie pilnowano jednak, aby próbki: kontrolna i napromieniowywana zawsze przebywały w jednakowych warunkach.

III.8. Statystyczna analiza otrzymanych wyników

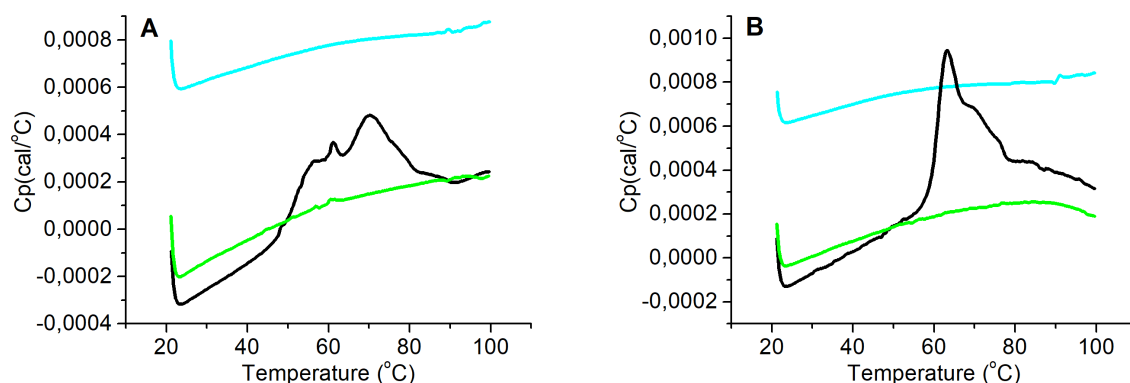
Analiza statystyczna danych została przeprowadzona z wykorzystaniem programu Statistica 12. Wyznaczono statystyki opisowe parametrów przejść termicznych oraz wykonano odpowiednie testy w celu potwierdzenia istotności zmian tych parametrów w czasie i wykazania różnic pomiędzy średnimi wartościami parametrów dla grupy surowic napromieniowanych i kontrolnych. Przyjęty próg istotności statystycznej wynosił $p < 0.05$. W celu sprawdzenia normalności rozkładu otrzymanych parametrów termodynamicznych stosowano test Shapiro-Wilk'a. Jeśli nie stwierdzono istotnych odstępstw od rozkładu normalnego, przeprowadzono analizę wariancji dla powtarzanych pomiarów ANOVA, gdzie czynnikiem powtarzanych pomiarów był czas. Wyróżniono 3 poziomy tego czynnika: pomiary wykonywane zaraz po zakończeniu ekspozycji na promieniowanie neutronowe (1d), pomiary po 1 - 2 tygodniach (1-2t) od ekspozycji, pomiary po 3 - 4 tygodniach od ekspozycji (3-4t). Jako zmienną grupującą (jakościową) przyjęto rodzaj próbki: kontrolna lub napromieniona. W przypadku znaczących odchyłeń rozkładów od rozkładu normalnego, zmiany parametrów w czasie potwierdzono za pomocą nieparametrycznego testu Anova Friedmana. Różnice pomiędzy wynikami dla surowic ekspozowanych na promieniowanie i kontrolnych analizowano stosując test t-Studenta lub nieparametryczny test U Manna-Whitneya.

IV. WYNIKI

IV.1. Odzwierciedlenie zmienności osobniczej proteomu surowicy krwi w profilach DSC wodnych i buforowych roztworów surowic

Źródłem przejść termicznych obserwowanych na krzywych DSC roztworów surowic / osocza krwi jest proces denaturacji obecnych w nich białek. Pod wpływem rosnącej temperatury następuje rozfałdowanie łańcuchów polipeptydowych białek związane z niszczeniem licznych słabych wiązań stabilizujących ich strukturę. Następuje także zmiana hydratacji białka. Przejście białka ze stanu natywnego w zdenaturowany jest przemianą endotermiczną. W pewnych warunkach procesowi rozfałdowania towarzyszy jeszcze agregacja białka, która najczęściej jest procesem egzotermicznym.

Profile DSC zaprezentowane na Rysunku IV.1 przedstawiają przykładowe surowe dane uzyskane w dwóch seriach pomiarowych (jedna dla roztworów wodnych (Rys. IV.1A), druga dla roztworów buforowych (Rys. IV.1B) surowicy) techniką skaningowej kalorymetrii różnicowej. Zarówno w przypadku wodnych, jak i buforowych roztworów surowic, niskotemperaturowy zakres (przed przejściem endotermicznym) na krzywych DSC otrzymanych w pierwszym skanie wskazuje na liniowe zmiany pojemności cieplnej ze wzrostem temperatury. Jest to zgodne z danymi literaturowymi [Privalov et al. 1996, 1997], pokazującymi liniowy wzrost pojemności cieplnej białek w formie natywnej, zanim rozpocznie się proces ich termicznej denaturacji. W zakresie temperatur od około 45 °C do około 90 °C, na krzywych DSC ujawnia się przejście endotermiczne związane ze zmianą konformacji białek w wyniku ich termicznej denaturacji. Obszar temperatur wysokich (od ok. 90 °C) na profilach DSC jest odzwierciedleniem zmian pojemności cieplnej zdenaturowanych białek obecnych w roztworze. Zwykle nie są to już zmiany typu liniowego, przebieg krzywej można dopasować za pomocą wielomianu. Pojemność cieplna białek rozfałdowanych jest większa niż białek w formie natywnej. Często po przejściu endotermicznym może być też obserwowane przejście egzotermiczne, związane z procesem agregacji rozfałdowanych łańcuchów polipeptydowych białek [Ladbury et al. 1997]. Na Rys. VI.1 nie jest ono widoczne. Drugi skan pokazuje zmiany pojemności cieplnej białek zdenaturowanych podczas pierwszego przebiegu. Brak przejścia świadczy o tym, że zmiany zachodzące w surowicy po ogrzaniu do 100 °C są nieodwracalne.

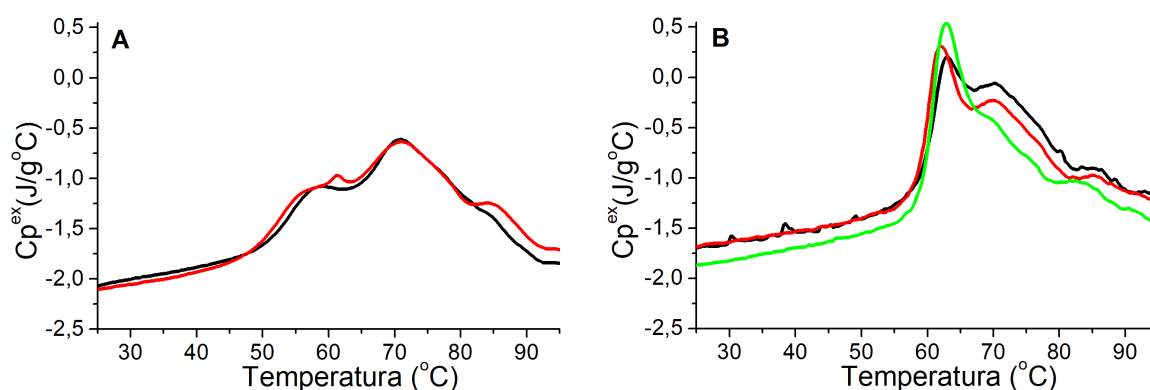


Rysunek IV.1 Profile DSC (surowe dane) surowicy pochodzącej od tego samego ochotnika w dwóch rozpuszczalnikach: wodzie (A) oraz buforze (B), gdzie: **krzywa czarna – pierwszy skan, krzywa zielona – drugi skan, krzywa cyjanowa – rozpuszczalnik.**

Kształt złożonego przejścia endotermicznego rejestrowanego dla roztworów surowicy metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC wynika z sumy wkładów (w odpowiednich proporcjach) obecnych w nich białek oraz oddziaływań pomiędzy tymi białkami oraz pomiędzy białkami i rozpuszczalnikiem. Białka występujące w większej ilości (w szczególności albuminy, immunoglobuliny), dają zatem większy wkład do obserwowanych przejść na krzywych DSC. Uwzględnienie wkładów 16 najobficiej występujących w osoczu białek, w tym albuminy, immunoglobulin (IgG, IgA, IgM), fibrynogenu i transferyny pozwala na dobre odtworzenie kształtu przejścia endotermicznego [Garbett et al. 2008, 2009]. Uzyskiwany kształt profilu DSC jest związany z proteomem badanej surowicy, który zmienia się dynamicznie w czasie i zależy od wielu czynników. Profile DSC surowicy krwi tej samej osoby wykonane w większym odstępie czasowym (w takim samym rozpuszczalniku) mogą różnić się nieznacznie lub nawet w stopniu znaczącym. Zmiana diety, kondycja zdrowotna, suplementacja, itp. mogą wpłynąć na nieznaczne różnice w otrzymanym kształcie profili DSC. Jeśli obserwowane byłyby znaczne zmiany w kształcie krzywych DSC surowicy tego samego pacjenta to najprawdopodobniej mogą być one związane jego stanem zdrowotnym.

Porównanie krzywych na Rys. IV.1 A i B wskazuje, że kształt przejścia endotermicznego odzwierciedlającego proces denaturacji białek surowicy w wodzie i w buforze PBS wyraźnie różni się. To zagadnienie opisano i przedyskutowano w artykule opublikowanym w JTAC (JTAC – eng. *Journal of thermal analysis and calorimetry*)

[Michnik et al. 2021A]. Wyniki przeprowadzonych pomiarów pokazały także, że zarówno dla roztworów wodnych jak i buforowych surowic ilość widocznych maksimów lokalnych na profilach DSC jest zmienna osobniczo, choć dla osób zdrowych profile te wykazują duże podobieństwo. Kształt otrzymanego profilu DSC niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika silnie zależy od proteomu surowicy. Na Rys. IV.2 zilustrowano krzywe DSC surowic pochodzących od kilku osób nie zgłaszających problemów zdrowotnych w czasie kilku tygodni poprzedzających moment pobrania krwi do badania.



Rysunek IV.2 Profile DSC (po normalizacji stężeniowej) dla przykładowych roztworów surowicy krwi ludzkiej: wodnych (A) oraz buforowych (B).

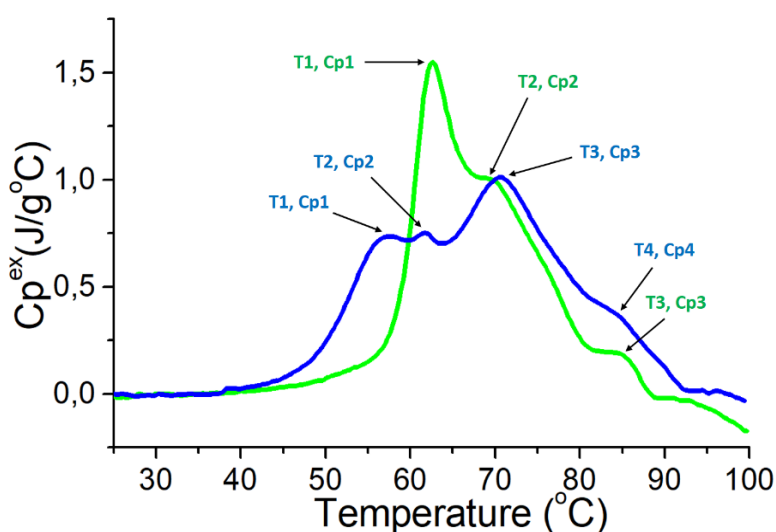
W efekcie zastosowania wody jako rozpuszczalnika (pH ~ 6.5) dla surowicy krwi ludzkiej otrzymujemy profile DSC, gdzie najczęściej można wyróżnić trzy lokalne maksima (Rys IV.1 A, IV.2 A, IV.3). Pierwsze maksimum, przy ok. 57 °C (nie zawsze widoczne jako wyraźne ekstremum lokalne), jest głównie związane z wkładem od nieligandowanej albuminy oraz α_2 globulin [Michnik et al. 2006, 2007, 2008, 2010, 2013, 2021A]. Następne dwa maksima lokalne pochodzą od α_1 i α_2 globulin oraz β i γ globulin. Występowanie i intensywność drugiego maksimum lokalnego w okolicach 62 °C jest silnie osobnicze. Związane jest ono głównie z procesem denaturacji termicznej haptoglobiny (białka ostrej fazy) i czasami nie ujawnia się w postaci charakterystycznego ostrego piku. Trzeci pik, przy temperaturze około 70 °C reprezentuje głównie wkłady od immunoglobulin [Michnik et al. 2008, 2010, 2013, 2016, 2018, 2020, 2021A]. Znaczący wkład do przejścia w tym zakresie temperaturowym mogą dawać także albuminy z przyłączonymi ligandami, np. kwasami tłuszczowymi [Shrake et al. 1988, 1990, Michnik et al. 2006]. Czasem przy temperaturze ok. 83 °C występuje również czwarte maksimum lokalne.

W przypadku profili DSC roztworów wodnych surowic, najczęściej widoczne jest w okolicy tej temperatury tylko ramię (Rys 2 – krzywa czerwona). Podobnie jak w przypadku roztworów buforowych osocza, pochodzi ono głównie od domeny CH3 immunoglobuliny IgG1 i / lub transferyny [Garber et al. 2007, Garbett et al. 2008, 2009, Schaefer et al. 2018, Jonas et al. 2018, Michnik et al. 2021A]. Warto jednak podkreślić, że profile DSC uzyskiwane dla transferyny w roztworze wodnym [Michnik et al. 2021A Rys. 4] oraz buforowym [Garbett et al. 2008 Supplement Rys. 1] znacząco się różnią. Dodatkowo skład rozpuszczalnika ma wpływ na stabilność termiczną i koloidalną immunoglobulin IgG [Schaefer et al. 2018]. Rozróżnienie, które białka dają w okolicy tej temperatury większy wkład jest trudne.

W roztworach buforowych (pH 7.4), na profilach DSC surowic zdrowych osób obserwuje się główny pik o dużej intensywności przy około 63 °C oraz pik lub ramię ulokowane w okolicach około 70 °C (Rys. IV.1 B, IV.2 B). Główny pik reprezentuje nakładające się przejścia pochodzące od procesów denaturacji nieligandowanej albuminy oraz α_1 , α_2 globulin, w tym haptoglobiny. Drugie maksimum lokalne ma takie samo pochodzenie jak w przypadku trzeciego maksimum na krzywych DSC roztworów wodnych surowic tzn. związane jest z procesem denaturacji immunoglobulin, w szczególności IgG, IgA, IgM [Garbett et al. 2009, 2015, 2016, 2017, Fish et al. 2010, Todinova et al. 2012, Krumova et al. 2013, 2017, Barcelo et al. 2015, Krędra-Królik et al. 2017, Michnik et al. 2019, 2021A, Duch et al. 2019]. Pochodzenie kolejnego zarysowującego się piku (lub ramienia) przy temperaturze ok. 83 °C jest takie jak opisano komentując krzywe DSC surowic w roztworach wodnych.

Dla lepszego porównania, na Rysunku IV.3 pokazano profile temperaturowych zmian nadmiarowej pojemności cieplnej (C_p^{ex}) roztworu surowicy krwi tego samego ochotnika (z tej samej porcji surowicy) wykonane w różnych rozpuszczalnikach. Wskazano także charakterystyczne dla roztworów wodnych i buforowych surowicy maksima lokalne widoczne w obszarze rozważanego przejścia endotermicznego. W większości przypadków więcej maksimów lokalnych można wyróżnić dla roztworów wodnych surowicy. Różnice w kształcie profili DSC wodnych oraz buforowych surowicy uwidaczniają się głównie w zakresie temperatur od ok. 45 °C do ok. 65 °C (Rys. IV.3). W obszarze tym, na krzywych DSC wodnych roztworów surowic najczęściej występują dwa dobrze rozróżnialne maksima lokalne przy temperaturach ok. 58 °C (T1) oraz 62 °C (T2) choć zamiast pierwszego z nich często pojawia się ramię. Na krzywych DSC surowic w roztworach buforowych widoczne jest w tym zakresie temperatur jedno maksimum lokalne przy około 63°C. W zakresie od ok. 65 °C do 100 °C interpretacja krzywych DSC

jest podobna niezależnie od zastosowanego rodzaju rozpuszczalnika. Maksima lokalne przy temperaturach ok. 70 °C (dla roztworów wodnych maksimum T3, dla roztworów buforowych T2) oraz ok. 83°C (dla roztworów wodnych maksimum T4, dla roztworów buforowych T3) w obu wybranych rozpuszczalnikach odzwierciedlają wkłady od procesów denaturacji tych samych białek. Maksimum lokalne przy temperaturze ok. 83 °C nie zawsze jest widoczne na krzywych DSC, częściej występuje na profilach roztworów buforowych surowicy.



Rysunek IV.3. Porównanie profili DSC (po odjęciu linii bazowej liniowej) surowicy pochodzącej od tego samego ochotnika w dwóch rozpuszczalnikach: wodzie (niebieski) oraz buforze (zielony).

Wyraźnie dostrzegalne różnice pomiędzy zilustrowanymi na Rys. IV.3 profilami denaturacji surowicy w obydwu roztworach znajdują odzwierciedlenie w wyznaczonych uśrednionych parametrach przejścia. W Tabeli IV.1 oraz w Tabeli IV.2 przedstawiono wartości charakteryzujące maksima lokalne (temperatury oraz odpowiadające im wartości nadmiarowych pojemności cieplnych) odpowiednio dla roztworów wodnych oraz buforowych surowic. W przypadku profili DSC dla roztworów wodnych pik przy temperaturze ok. 83°C występuje rzadko, dlatego w Tabeli IV.1 nie uwzględniono parametrów dla tego maksimum lokalnego. Tabela IV.3 przedstawia uśrednione wartości zmiany entalpii (ΔH) związanej z denaturacją białek surowicy oraz szerokości połówkowej (HHW) obserwowanego przejścia endotermicznego.

Tabela IV.1. Uśrednione wartości (\pm odchylenie standardowe) temperatur oraz nadmiarowej pojemności cieplnej odpowiadających maksimum lokalnym widocznym na profilach DSC surowicy krwi ludzkiej w **roztworze wodnym** ($n = 26$).

Maksimum lokalne	Temperatura [°C]	Nadmiarowa pojemność cieplna [J/g°C]
(T1, Cp1)	57.6 \pm 1.7	0.64 \pm 0.10
(T2, Cp2)	62.1 \pm 0.9	0.71 \pm 0.15
(T3, Cp3)	70.5 \pm 0.6	0.86 \pm 0.13

Tabela IV.2. Uśrednione wartości (\pm odchylenie standardowe) temperatur oraz nadmiarowej pojemności cieplnej odpowiadającej maksimum lokalnym widocznym na profilach DSC surowicy krwi ludzkiej w **roztworze buforowym** ($n = 12$).

Maksimum lokalne	Temperatura [°C]	Nadmiarowa pojemność cieplna [J/g°C]
(T1, Cp1)	63,3 \pm 0,96	1,63 \pm 0,25
(T2, Cp2)	69,7 \pm 0,3	1,13 \pm 0,11
(T3, Cp3)	82,1 \pm 0,6	0,30 \pm 0,09

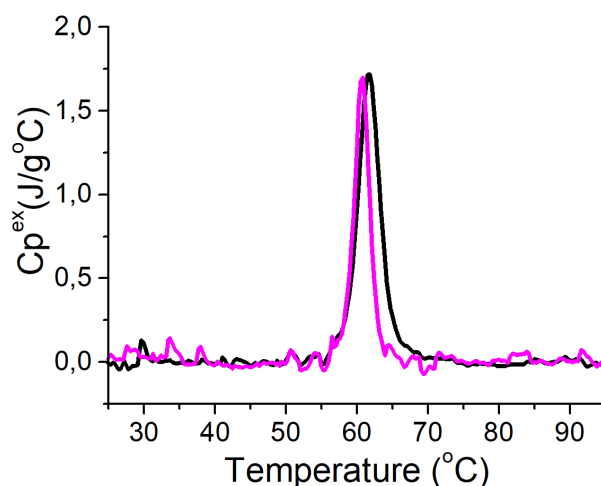
Zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek surowicy ΔH jest większa dla roztworów buforowych niż dla roztworów wodnych surowicy (Tabela IV.3). Różnica pomiędzy średnimi wartościami ΔH w obydwu roztworach jest istotna statystycznie, co potwierdził nieparametryczny test U Manna – Whitneya ($p = 0.007$). Znacząco mniejsza szerokość połówkową przejścia (HHW) w przypadku roztworów buforowych surowicy wiąże się z jego większą wysmukłością niż w przypadku roztworów wodnych. Pojemność cieplna Cp^{ex} odpowiadająca temperaturom maksimum lokalnych T1 (0,64 J / g °C) oraz T2 (0,71 J / g °C) obserwowanych na profilach DSC wodnych roztworów surowicy jest znacznie mniejsza niż ta otrzymana dla roztworów buforowych surowicy przy maksimum lokalnym T1 (1,63J / g °C).

Tabela IV.3. Uśrednione wartości (\pm odchylenie standardowe) zmian entalpii (ΔH) oraz szerokości połówkowej (HHW) przejścia endotermicznego w rozpuszczalniku **wodnym oraz buforowym** ($n=26$ i 12).

Parametr termodynamiczny	Woda	Bufor
ΔH [cal/g]	19,66 \pm 3,96	23,45 \pm 2,67
HHW [°C]	24,3 \pm 2,1	13,2 \pm 2,6

Zasadnicza różnica pomiędzy przejściami zarejestrowanymi dla roztworów wodnych i buforowych surowic wiąże się z możliwością obserwacji wkładu od haptoglobiny. W oparciu o profil DSC surowicy w roztworze buforowym nie jest możliwe zidentyfikowanie podwyższonego poziomu haptoglobiny bez wykonania dekonwolucji oraz rozseparowania pików. Nie jest więc możliwe szybkie uzyskanie informacji o podwyższonym stężeniu tego białka jedynie w oparciu o uzyskany profil DSC surowicy w roztworze buforowym.

Występowanie maksimum lokalnego związanego z wkładem pochodzącym od procesu denaturacji termicznej haptoglobiny jest silnie osobnicze. Rysunek IV.4 przedstawia profile DSC uzyskane dla wodnych roztworów dwóch fenotypów haptoglobiny. Przejście endotermiczne dla haptoglobiny uwidacznia się na krzywych DSC przy ok. 62 °C. Dla fenotypu 1-1 jego maksimum przypada na 61.8 °C, a dla fenotypu 2-2 ujawnia się przy nieco niższej temperaturze, 60.8 °C. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, charakter przebiegu termicznej denaturacji haptoglobiny w roztworze buforowym, pH 7.4, jest bardzo podobny biorąc pod uwagę zarówno kształt przejścia jak i temperaturę denaturacji [Garbett et al. 2008 Supl Rys. 1]. Wśród przebadanych wodnych roztworów surowic maksimum lokalne przy temperaturze ok. 62 °C ujawniło się w większości przypadków, ale na niektórych profilach DSC nie było ono widoczne. Wprowadzono zatem dla profili DSC wodnych roztworów surowic podgrupy rozróżniające profile względem uzyskiwanego kształtu: grupa pierwsza profili DSC ma widoczne maksimum przy ok. 62 °C ($n = 23$), natomiast grupa druga go nie posiada ($n = 3$).



Rysunek IV.4 Profile DSC dla dwóch fenotypów haptoglobiny w roztworze wodnym, gdzie: – **typ 1-1**, – **typ 2-2**.

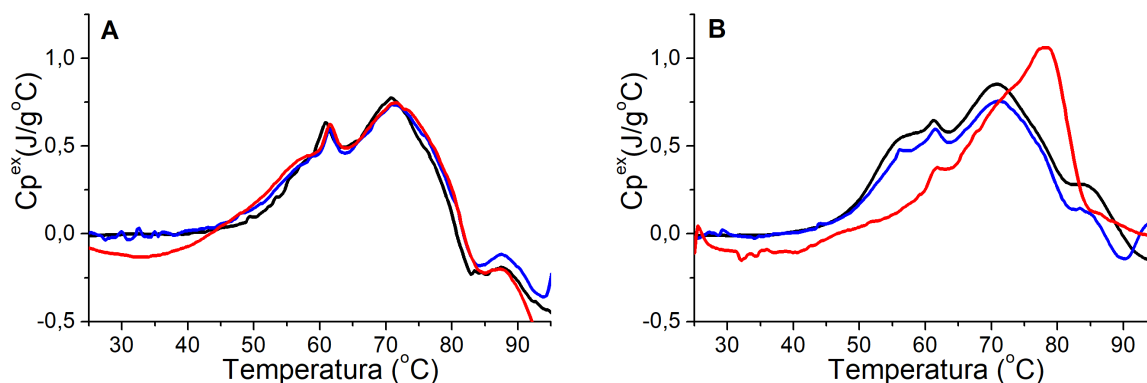
Otrzymane w ramach przeprowadzonych badań profile DSC, ze względu na stosunkowo duże podobieństwo proteomu surowic krwi osób zdrowych (zmiennosc osobnicza składu białkowego tylko w pewnych zakresach), charakteryzują się przy ustalonych warunkach fizykochemicznych i eksperymentalnych znacznym stopniem podobieństwa. Skład białkowy surowicy krwi oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy zawartymi w niej biomolekułami i ich modyfikacje mają decydujący wpływ na obserwowane na krzywych DSC przejście endotermiczne, determinują występowanie i wzajemne proporcje pików składowych. Przy interpretacji temperaturowych zmian pojemności cieplnej surowic należy dodatkowo uwzględnić rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika oraz warunki eksperymentalne.

IV.2. Efekty bezpośrednie wpływu promieniowania jonizującego na profile DSC roztworów surowicy krwi ludzkiej

IV.2.1. Promieniowanie neutronowe

Na Rysunku IV.5 pokazano przykładowe profile DSC zarejestrowane bezpośrednio po ekspozycji roztworów na promieniowanie neutronowe w przypadku, kiedy dawka wynosiła 5 Gy. Rysunki IV.5 A i IV.5 B przedstawiają krzywe DSC roztworów wodnych surowicy krwi pobranej od dwóch osób. Dla przykładu zilustrowanego na Rysunku IV.5 A aktywność źródła promieniotwórczego użytego jako emitera promieniowania neutronowego

wynosiła 65 MBq. Ekspozycja trwała 23 godz. 51 min., a temperatura w pomieszczeniu wynosiła 18 °C. Natomiast w przypadku drugiego przykładu widocznego na Rysunku IV.5 B czas ekspozycji wynosił 26 godz. 30 min., a temperatura 21 °C.



Rysunek IV.5 A, B. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 5 Gy promieniowania neutronowego przykładowych roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona. Rysunki przedstawiają krzywe DSC roztworów wodnych surowicy krwi pobranej od dwóch osób: (Rys A – osoba pierwsza, Rys B – osoba druga). Rysunek 1 A – napromienianie próbki trwało 23 h 51 min. przy temperaturze 18 °C. Rysunek 1 B – napromienianie próbki trwało 26 h 30 min. przy temperaturze 21 °C.

Na Rysunku IV.5 A różnice pomiędzy profilami surowicy kontrolnej i wyjściowej są niewielkie. Krzywą DSC surowicy napromieniowanej wyróżnia jednak zarysowujące się przejście egzotermiczne w zakresie temperatur niższych niż ten odpowiadający przejściu endotermicznemu. Wyraźnie większe zróżnicowanie krzywych pokazuje Rysunek IV.5 B. Zilustrowany na tym rysunku przykład wskazuje, że po ekspozycji na promieniowanie neutronowe (dawka 5 Gy) różnice pomiędzy krzywymi DSC dla roztworu kontrolnego oraz napromienionego mogą być zauważalne w całym badanym zakresie temperaturowym, choć w zależności od serii pomiarowej uwidaczniają się w specyficzny sposób w trzech przedziałach temperaturowych. W kolejnych z nich, dla próbki eksponowanej na neutrony w porównaniu do kontrolnej na krzywych DSC występują następujące zmiany:

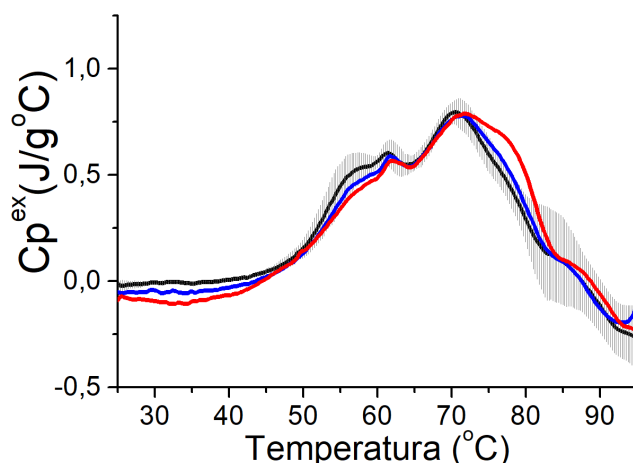
- 1) 20 – 50 °C - ujawnia się przejście egzotermiczne, świadczące prawdopodobnie o przebiegającym w roztworze procesie agregacji pewnej frakcji białek,
- 2) 50 – 65 °C- zmniejsza się intensywność obserwowanych maksimum lokalnych (T1, Cp^{ex}_1 ; T2, Cp^{ex}_2),

- 3) 65 -85 °C- kształt przejścia w okolicy najintensywniejszego maksimum lokalnego (T_3 , Cp^{ex_3}) (będącego jednocześnie maksimum całego przejścia, oznaczanego (T_m , Cp_m)) zmienia się; przesuwa się ono w stronę wyższych temperatur, dodatkowo następuje wzrost pojemności cieplnej Cp^{ex_3} .

Zmiana kształtu przejścia endotermicznego sugeruje, że w roztworze zachodzą procesy, które mają bezpośredni wpływ na białka w nim zawarte. Osłabienie intensywności w zakresie niskotemperaturowym tego przejścia lub nawet zanik pierwszego maksimum może wskazywać na mniejszy wkład od procesu denaturacji termicznej albumin nieligandowanych. Zachodzące w roztworze procesy mogą powodować przyłączenie do albumin ligandów, co może wiązać się z widocznym na profilach DSC przesunięciem głównego maksimum w kierunku wyższych temperatur (Rozdział II.2.4).

Bezpośredni efekt ekspozycji na promieniowanie neutronowe dawką 5 Gy wykazywały wszystkie badane roztwory surowic – choć intensywność zmian uwidaczniających się na profilach DSC była zarówno silnie osobnicza jak i związana z aktywnością źródła w czasie eksperymentu oraz ze środowiskiem. Zależnie od aktywności źródła, dla uzyskania dawki 5Gy, czas ekspozycji wynosił od 24 do 26 godzin. Obserwowane na Rysunku IV.5 B różnice pomiędzy profilami DSC próbek napromienionych oraz kontrolnych są zdecydowanie większe niż w przypadku tych zaprezentowanych na Rysunku IV.5 A. Dodatkowo, zauważalne są także różnice pomiędzy krzywymi DSC próbki wyjściowej i kontrolnej. Warto wspomnieć, że czas ekspozycji był dłuższy w przypadku serii, której wyniki zaprezentowano na Rysunku IV.5 B niż IV.5 A (różnica wynosiła 2 godz. 39 min.). Temperatura panująca w pomieszczeniu była o 3 °C większa w przypadku ekspozycji roztworu, który później wykazywał większe zmiany w kształcie profili DSC. Próbką kontrolną roztworu przebywającego 26,5 godz. w temperaturze 21 °C wykazuje charakterystyczne zmiany związane ze starzeniem się roztworu (Rys. IV.5 B), co nie było widoczne na krzywych DSC dla roztworów kontrolnych krócej przebywających w temperaturze pokojowej jak w przypadku krzywej DSC próbki kontrolnej widocznej na Rysunku IV.5 A. Najprawdopodobniej również zmienność osobnicza badanych surowic może być jednym z czynników wpływających na wielkość obserwowanych w badaniach kalorymetrycznych efektów, zarówno tych związanych ze starzeniem, jak i działaniem promieniowania jonizującego. Dokładne określenie, który czynnik może w większym stopniu determinować szybsze lub wolniejsze starzenie się poszczególnych roztworów surowicy krwi nie jest możliwe w oparciu o przeprowadzone badania.

Po uśrednieniu profili DSC, otrzymanych zaraz po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania neutronami (dawka 5 Gy) roztworów wodnych surowicy, można zauważyć zarysowujące się efekty napromieniowania (Rys. IV.6). Charakter różnicy pomiędzy krzywymi DSC dla roztworów kontrolnych oraz tych poddanych ekspozycji jest zgodny z opisanym wyżej dla przykładowych próbek (Rys. IV.5 A, B).



Rysunek IV.6. Zestawienie uśrednionych krzywych DSC ($n = 5$) zarejestrowanych bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 5 Gy promieniowania neutronowego roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbki wyjściowe, – próbki kontrolne, – próbki napromienione. Zacięniowany obszar na krzywej wyjściowej reprezentuje odchylenie standardowe.

Porównując uśrednione wartości parametrów zebranych w Tabeli IV.4 (strona obok) dla surowic napromienionych i kontrolnych można zauważyć pewne tendencje związane z działaniem promieniowania. Jednakże ze względu na zbyt małą liczebność próbek i stosunkowo duże odchylenia standardowe nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy parametrami przejścia.

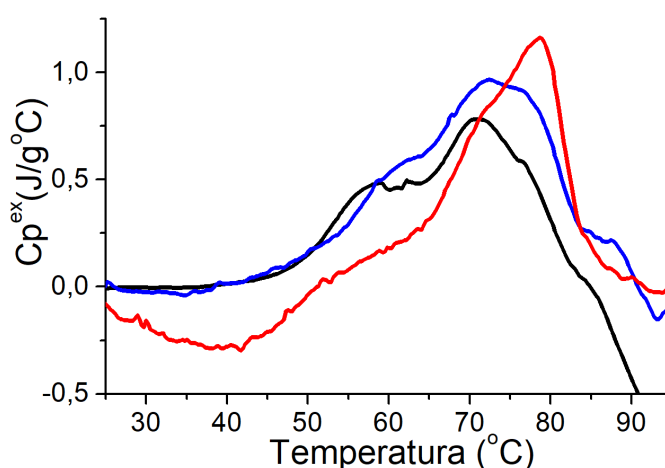
Tabela IV.4. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC **wodnych roztworów surowicy** ($n = 5$): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) **dawką 5 Gy promieniowania neutronowego**.

Parametry	Wyjściowa	1 dzień	
		k	n
$T_m / ^\circ\text{C}$	$70,6 \pm 0,4$	$70,9 \pm 0,9$	$72,3 \pm 3,0$
$C_{p_m} / \text{J g}^{-1}\text{C}^{-1}$	$0,75 \pm 0,11$	$0,80 \pm 0,06$	$0,86 \pm 0,18$
$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	$18,0 \pm 2,2$	$18,3 \pm 2,2$	$19,1 \pm 4,0$
HHW / $^\circ\text{C}$	$24,5 \pm 2,2$	$24,4 \pm 2,8$	$23,4 \pm 4,4$
$A / \text{J g}^{-1}$	0	$0,8 \pm 1,2$	$1,1 \pm 1,3$

Parametry przejścia endotermicznego: T_m – temperatura przejścia, C_{p_m} – nadmiarowa pojemność cieplna odpowiadająca temperaturze przejścia T_m , ΔH – zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek, HHW – szerokość połówkowa przejścia endotermicznego.

Parametr przejścia egzotermicznego: A – wartość egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi agregacji

W celu potwierdzenia zaobserwowanych tendencji zmian w profilach DSC surowic, wywołanych ekspozycją na promieniowanie neutronowe, przeprowadzono jednostkowy eksperyment z większą dawką, wynoszącą 13 Gy. Rysunek IV.7 przedstawia wyniki tego eksperymentu. Czas ekspozycji był odpowiednio dłuższy, niż w przypadku wcześniej opisanych pomiarów i wynosił 69 h 6 min (aktywność źródła 58 MBq).



Rysunek IV.7. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 13 Gy promieniowania neutronowego przykładowego roztworu surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 13 Gy. Napromienianie trwało 69 godz. 6 min. przy temperaturze 21 C.

Zmiany w kształcie profili DSC obserwowane są w przypadku próbki kontrolnej i napromienionej w odniesieniu do profilu DSC roztworu (świeżego) wyjściowego. Różnice pomiędzy profilami DSC próbki napromienionej w stosunku do kontrolnej występują w takich samych zakresach temperaturowych, jak te opisane dla próbek napromienionych poddanych działaniu neutronów o dawce 5 Gy (Rys. IV.5 - IV.6). Są one jednak wyraźnie większe. Porównując uzyskane efekty działania wyższej dawki (13 Gy) promieniowania neutronowego do tych obserwowanych na profilach DSC, gdzie dawka wynosiła 5 Gy można zauważyć:

- 1) 20 – 50 °C – dla próbki napromienionej ujawnia się bardziej zaawansowane przejście egzotermiczne niż dla kontrolnej,
- 2) 50 – 65 °C - dla próbki napromienionej zmniejsza się intensywność obserwowanego maksimum lokalnego (T_1 , Cp^{ex_1}) powodując jego całkowity zanik,
- 3) 65 - 85 °C - dla próbek napromienionej i kontrolnej kształt przejścia w tym zakresie zmienia się i przesuwa w stronę wyższych temperatur, co przy dawce 5 Gy dotyczyło tylko próbki napromienionej,
- 4) 65 - 85 °C - na profilu DSC próbki napromienionej następuje silniejszy wzrost pojemności cieplnej Cp^{ex_3} odpowiadającej temperaturze maksimum lokalnego (T_3 , Cp^{ex_3}) niż było to widoczne na profilu DSC próbki napromienionej dawką 5 Gy,
- 5) 65 - 85 °C - próbka kontrolna przebywająca dłużej w temperaturze pokojowej (ta odpowiadająca próbce napromienionej dawką 13 Gy) też wykazuje wzrost pojemności cieplnej Cp^{ex_3} , czego nie obserwuje się na krzywych DSC próbek kontrolnych towarzyszących próbkom napromienianym dawką 5 Gy.

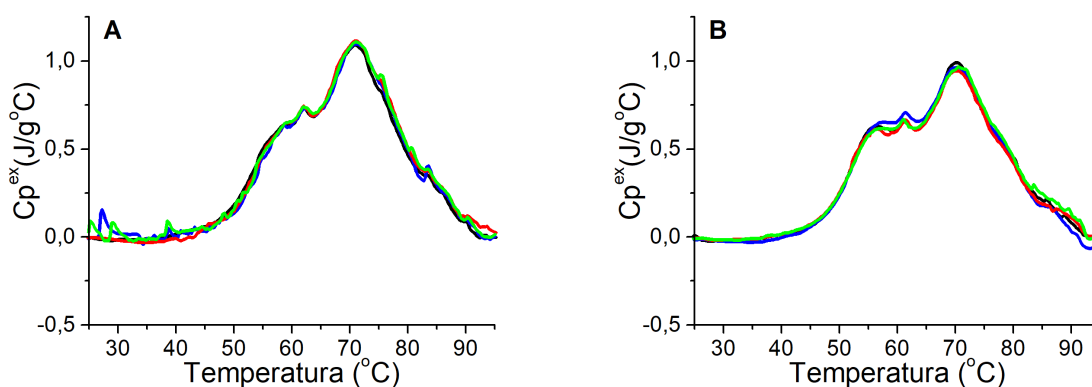
Wyniki eksperymentu z dawką 13 Gy pozwoliły zarejestrować wyraźne różnice pomiędzy próbką eksponowaną na promieniowanie neutronowe, a kontrolną zaraz po zakończeniu ekspozycji. Biorąc pod uwagę długi czas przebywania próbek w temperaturze pokojowej (ponad 69 godzin), wskazują one na szybsze starzenie się napromienionych roztworów surowicy. Problem trudności, w rozdzieleniu efektów związanych z napromienianiem oraz starzeniem się, był częściowo poruszany w ramach wcześniejszych badań surowicy krwi ludzkiej poddanej działaniu promieniowania jonizującego z użyciem mniejszej dawki (0.5 Gy) promieniowania neutronowego [Michnik et al. 2016, Kiełboń et al. 2019] i będzie bliżej opisany w Rozdziale V.2.

IV.2.2. Promieniowanie X

IV.2.2.1. Ekspozycja na dawki 5 Gy i 10 Gy

IV.2.2.1.1. Wodne roztwory surowicy krwi

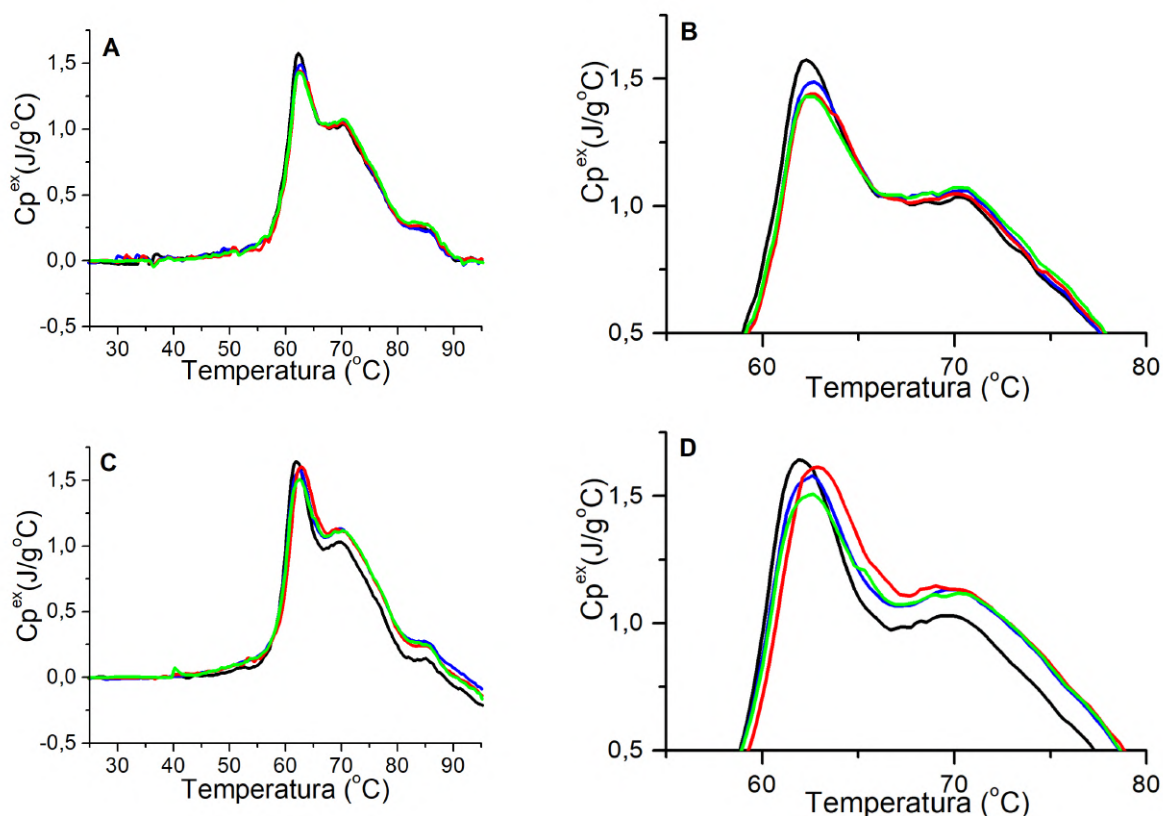
Rysunek IV.8 przedstawia zestawienie krzywych DSC dla przykładowych roztworów wodnych surowic pochodzących od dwóch osób. W zestawieniu zostały ujęte po dwie próbki napromienione, każda odpowiednio albo dawką 5 Gy (krzywe czerwone) albo dawką 10 Gy (krzywe zielone) promieniowania rentgenowskiego w odniesieniu do roztworów wyjściowych (świeżych) oraz kontrolnych. W przypadku ekspozycji na promieniowanie X proces napromieniowania trwał zaledwie 1 lub 2 minuty (dawka 5 lub 10 Gy), co oznacza, że efekt starzenia się roztworu surowicy w tym czasie można zaniedbać. Profile DSC próbki kontrolnej oraz napromienionych dawką 5 Gy oraz tych napromienionych dawką 10 Gy mają bardzo zbliżony kształt do profilu uzyskanego dla roztworu wyjściowego (Rys. IV.8 – krzywe czarne). Te przykładowe oraz pozostałe ($n = 12$) niezaprezentowane wyniki sugerują, że ekspozycja wodnych roztworów surowic na promieniowanie rentgenowskie dawkami 5 Gy oraz 10 Gy nie powoduje żadnych efektów widocznych na krzywych DSC.



Rysunek IV.8.A, B. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 5 Gy oraz 10 Gy promieniowania X przykładowych roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona. Rysunki przedstawiają krzywe DSC roztworów wodnych surowicy krwi pobranej od dwóch osób (Rys A – osoba pierwsza, Rys B – osoba druga).

IV.2.2.1.2. Buforowe roztwory surowicy krwi

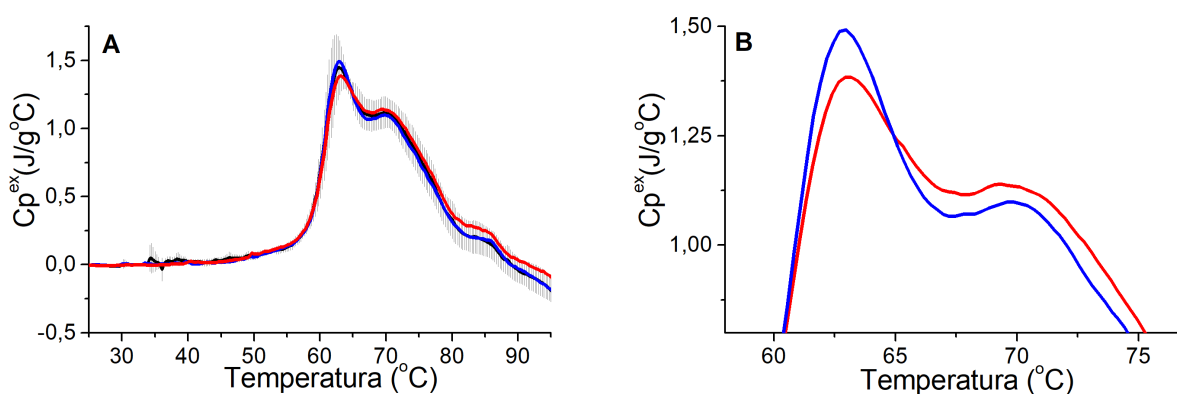
Rysunek IV.9 ukazuje zestawienie krzywych DSC wykonanych dla buforowych roztworów surowicy krwi pobranych od dwóch wybranych osób (odpowiednio Rys. IV.9 A, B oraz Rys. IV.9 C, D, gdzie Rys. IV.9 B jest powiększeniem fragmentu Rys. IV.9 A, Rys. IV.9 D jest powiększeniem fragmentu Rys. IV.9 C), napromienionych dawkami 5 i 10 Gy. W tym przypadku zarysowują się pewne efekty napromieniowania. Dla poszczególnych badanych roztworów ($n = 7$) najczęściej różnice ujawniają się w zakresie 60 – 68 °C jako nieznaczny spadek intensywności maksimum lokalnego (T_1 , C_p^{ex}) na krzywych DSC próbek napromienionych w porównaniu do kontrolnych, co jest widoczne na Rysunku IV.9 A, B. Efekt ten nie zawsze występuje w przypadku dawki 5 Gy, przykładem jest Rysunek IV.9 C, D.



Rysunek IV.9.A, B, C, D. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawkami 5 Gy oraz 10 Gy promieniowania X przykładowych roztworów buforowych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 5 Gy, – próbka napromieniona dawką 10 Gy. Rysunki przedstawiają krzywe DSC roztworów buforowych surowicy krwi pobranej od dwóch osób (Rys A, B – osoba pierwsza, Rys C, D – osoba druga). Rysunek IV.9 B jest powiększeniem fragmentu Rysunku IV.9 A, natomiast Rysunek IV.9 D jest powiększeniem fragmentu Rysunku IV.9 C.

Na krzywej DSC próbki napromienionej większą dawką (10Gy) jest widoczny nieznaczny spadek intensywności maksimum lokalnego ($T_1, C_p^{ex_1}$) co nie ujawnia się na krzywych DSC roztworu kontrolnego oraz napromienionego mniejszą dawką (5Gy) promieniowania X. Zatem dawka 10 Gy promieniowania rentgenowskiego wyraźniej wywołuje w roztworach buforowych surowicy niewielki efekt możliwy do wychwycenia techniką kalorymetryczną. Porównując krzywe DSC uzyskane dla roztworów buforowych surowicy można zauważyć zarysowujące się tendencje zmian związanych z napromieniowaniem, choć są one silnie zależne osobniczo. Porównując uśrednione krzywe DSC ($n = 7$) roztworów buforowych surowicy krwi ludzkiej (Rys. IV.10 A, B) można stwierdzić, że dzień po ekspozycji surowic na promieniowanie X dawką 10 Gy pojawiają się nieznaczne różnice pomiędzy próbkami kontrolną oraz napromienioną w zakresie temperatur 60 – 75 °C. Dla próbek poddanych działaniu promieniowania X, w porównaniu do kontrolnych, na krzywych DSC następuje:

- 1) 60 – 68 °C – nieznaczny spadek intensywności obserwowanego maksimum lokalnego ($T_1, C_p^{ex_1}$), będącego jednocześnie maksimum (T_m, C_{p_m}) przejścia endotermicznego
- 2) 68 – 75 °C – nieznaczny wzrost intensywności obserwowanego maksimum lokalnego ($T_2, C_p^{ex_2}$).



Rysunek IV.10.A, B. Uśrednione zestawienie krzywych DSC ($n = 7$) zarejestrowanych bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania promieniowaniem X dawką 10 Gy roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbki wyjściowe, – próbki kontrolne, – próbki napromienione (A). Rysunek 10 B jest powiększeniem fragmentu rysunku 10 A.

Uśrednione wartości nadmiarowych pojemności cieplnych C_p^{ex} odpowiadających temperaturze maksimum przejścia T_m również potwierdzają obserwowaną na profilach DSC tendencję (Tabela IV.5). (W Tabeli IV.5 zamiast oznaczenia maksimum lokalnego (T_l , $C_p^{ex_l}$) występuje oznaczenie (T_m , $C_p^{ex_m}$), ponieważ jest ono jednocześnie globalnym maksimum przejścia.)

Tabela IV.5. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC buforowych roztworów surowicy ($n = 7$): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) dawką 10 Gy promieniowania rentgenowskiego.

Parametry	Wyjściowa	1 dzień	
		k	n
$T_m / ^\circ\text{C}$	$63,1 \pm 1,3$	$63,6 \pm 0,9$	$63,7 \pm 1,2$
$C_{p_m} / \text{J g}^{-1}\text{C}^{-1}$	$1,53 \pm 0,11$	$1,42 \pm 0,11$	$1,38 \pm 0,12$
$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	$24,0 \pm 3,5$	$22,2 \pm 2,1$	$22,5 \pm 1,1$
HHW / $^\circ\text{C}$	$14,7 \pm 1,3$	$15,0 \pm 0,8$	$15,7 \pm 1,1$
$A / \text{J g}^{-1}$	0	$1,1 \pm 2,9$	$1,6 \pm 3,4$

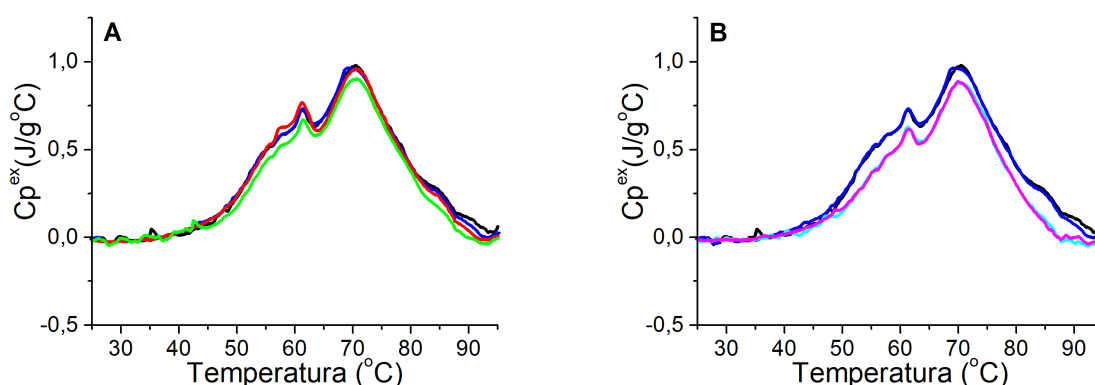
Parametry przejścia endotermicznego: T_m – temperatura przejścia, C_{p_m} – nadmiarowa pojemność cieplna odpowiadająca temperaturze przejścia T_m , ΔH – zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek, HHW – szerokość połówkowa przejścia endotermicznego.

Parametr przejścia egzotermicznego: A – wartość egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi agregacji

IV.2.2.1.3. Wyniki pojedynczego eksperymentu ekspozycji wodnego roztworu surowicy krwi na dawki z zakresu 10 Gy – 120 Gy

Rysunek IV.11 przedstawia zestawienie krzywych DSC dla roztworu surowicy krwi ludzkiej pobranej od jednej osoby. Wodne roztwory poddane zostały ekspozycji na promieniowanie X następującymi dawkami: 10 Gy, 30 Gy, 70 Gy, 120 Gy. Porównując przebieg uzyskanych profili DSC można zauważyć, że przy zastosowanych dawkach od 30 Gy wzwyż nieznacznie zmniejsza się intensywność całego przejścia endotermicznego. Najwyraźniej jest to widoczne na krzywej DSC próbki napromienionej dawką 120 Gy. Zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek zawartych w roztworach napromienionych zmniejsza się wraz ze wzrostem dawki promieniowania ($\Delta H_{kontrolna} = 23.0 \text{ J g}^{-1}$, $\Delta H_{10Gy} = 22.5 \text{ J g}^{-1}$, $\Delta H_{30 Gy} = 20.0 \text{ J g}^{-1}$, $\Delta H_{70 Gy} = 18.1 \text{ J g}^{-1}$, $\Delta H_{120 Gy} = 18.1 \text{ J g}^{-1}$). Przejście endotermiczne obserwowane na krzywych DSC próbek napromienionych dawkami 70 Gy i 120 Gy ma mniejszą szerokość połówkową ($\text{HHW}_{70 Gy, 120 Gy} = 20.5 \text{ }^\circ\text{C}$) niż przejścia endotermiczne widoczne na pozostałych krzywych

DSC roztworu kontrolnego ($HHW_{kontrolna} = 24.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) oraz tych napromienionych niższymi dawkami ($HHW_{10 \text{ Gy}} = 23.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $HHW_{30 \text{ Gy}} = 23.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Może to być związane ze wzmożonym w wyniku napromieniowania egzotermicznym procesem agregacji rozfałdowanych łańcuchów polipeptydowych. W przypadku wyższych dawek promieniowania, w wysokotemperaturowym zakresie przejścia endotermicznego większy staje się wkład od nakładającego się efektu egzotermicznego, co tłumaczy zmniejszenie wartości ΔH



Rysunek IV.11.A, B. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawkami: A) - 10 Gy, 30 Gy, B) - 70 Gy, 120 Gy roztworów surowicy krwi ludzkiej pochodzącej od jednej osoby, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 10 Gy, – próbka napromieniona dawką 30 Gy – próbka napromieniona dawką 70Gy, – próbka napromieniona dawką 120 Gy.

IV.2.3. Posumowanie

Porównując różnice pomiędzy krzywymi DSC próbek kontrolnych oraz napromienionych można stwierdzić, że bezpośrednie efekty napromieniowania są zauważalne w przypadku działania zastosowanych dawek promieniowania neutronowego oraz wyższych dawek (od 30 Gy wzwyż) promieniowania X. W wypadku zastosowania dawki 5 Gy promieniowania neutronowego, profil DSC uzyskany dla roztworu surowicy poddanej ekspozycji zawsze jest zmieniony w porównaniu do profilu DSC roztworu surowicy kontrolnej, choć widoczne różnice objawiają się w różnym zakresie temperatur dla poszczególnych próbek. Wykonany pomiar wpływu dawki 13 Gy promieniowania neutronowego na wodny roztwór surowicy ujawnia bardziej zaawansowane zmiany, ale o takim samym charakterze jak te widoczne na profilach DSC roztworów poddanych

ekspozycji dawką 5 Gy. Porównanie krzywych DSC badanych roztworów surowic wskazuje, że ekspozycja na promieniowanie X nie powoduje przy dawkach 5 Gy oraz 10 Gy bezpośrednich efektów, które mogą być uchwycone techniką DSC choć zauważalne są pewne tendencje, lepiej widoczne w przypadku roztworów buforowych niż wodnych. Po ekspozycji na promieniowanie X nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic pomiędzy dawkami 5 Gy i 10 Gy dla analizowanych parametrów przejść termicznych białek surowicy. Uzyskane wyniki sugerują brak bezpośredniego wpływu zastosowania dawek 5 Gy i 10 Gy promieniowania rentgenowskiego na strukturę białek surowicy krwi ludzkiej. Dopiero wyższa dawka promieniowania X (30 Gy, 70 Gy, 120 Gy) powoduje widoczne efekty na krzywych DSC roztworów wodnych surowicy ale można uchwycić jedynie zarysowujące się tendencje, o nieco innym charakterze niż te obserwowane na profilach DSC surowic napromienionych niższymi dawkami promieniowania X.

IV.3. Efekty długofalowe wpływu promieniowania jonizującego na profile DSC roztworów surowicy krwi ludzkiej

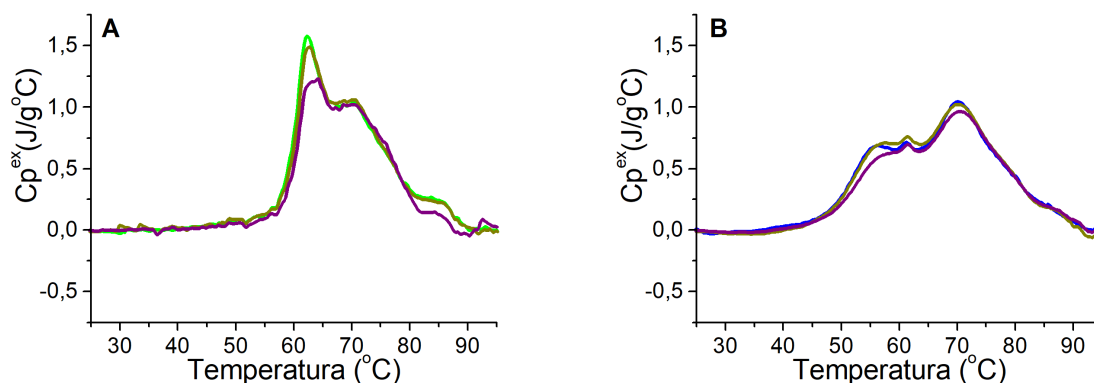
W celu zbadania długofalowych efektów jednorazowo zaaplikowanej roztworom surowicy krwi dawki promieniowania jonizującego, śledzono zmiany zachodzące w krzywych DSC tych roztworów w czasie. Porównano profile termicznej denaturacji surowic poddanych ekspozycji na promieniowanie X lub promieniowanie neutronowe oraz odpowiednich roztworów kontrolnych, wszystkich przechowywanych w tych samych warunkach chłodniczych przez okres 2 do 4 tygodni. Zaobserwowane różnice, wynikające ze starzenia się próbek, omówiono zarówno dla wodnych jak i buforowych roztworów surowic.

Część wyników związanych z tematyką tego rozdziału została opublikowana w dwóch artykułach naukowych [Michnik et al. 2016, Kielboń et al. 2019]. Wcześniejszy z nich [Michnik et al. 2016] dotyczył ujawniających się w czasie efektów związanych z wpływem dawki 0.5 Gy promieniowania neutronowego na wodne roztwory surowicy krwi ludzkiej. Autorka bieżącej rozprawy nie jest jego współautorką, ale zainteresowała się prowadzonymi badaniami w okresie jego powstawania. W drugim z artykułów przedyskutowano wpływ promieniowania rentgenowskiego (dawki 10 Gy) na buforowe roztwory surowicy krwi ludzkiej [Kielboń et al. 2019]. Przedmiotem badań prowadzonych

w ramach niniejszej pracy stało się poszerzenie informacji uzyskanych we wspomnianym eksperymencie. Oprócz zastosowanych wcześniej, użyto wyższych dawek promieniowania jonizującego.

IV.3.1. Proces starzenia się surowicy krwi ludzkiej w roztworach wodnych i buforowych

Rysunek IV.12 A i B przedstawia zestawienie przykładowych profili DSC uzyskanych dla świeżo przygotowanego buforowego (A) i wodnego (B) roztworu surowicy krwi ludzkiej (krzywa wyjściowa) oraz po 1 dniu i 1 tygodniu od sporządzenia roztworu (próbki przechowywano w warunkach chłodniczych, w temperaturze około 4 °C). Rys. IV.12 A pozwala zauważyć, że po tygodniu, intensywność maksimum lokalnych występujących dla buforowego roztworu surowicy przy temperaturach około 63 °C oraz około 83 °C, maleje. Nie widać znaczących zmian w okolicy maksimum lokalnego przy 70 °C.

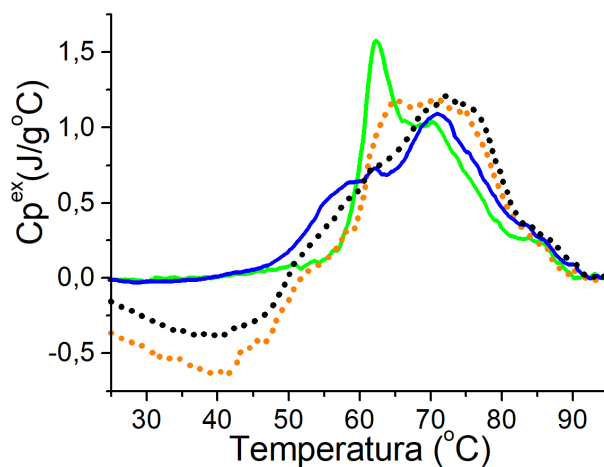


Rysunek IV.12. A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego buforowego (A) oraz wodnego (B) roztworu surowicy, gdzie: – **świeży roztwór buforowy**, – **świeży roztwór wodny**, – **roztwór buforowy lub wodny po 1 dniu**, – **roztwór buforowy lub wodny 1 tydzień od sporządzenia roztworu**.

W przypadku zastosowania wody jako rozpuszczalnika (Rys. IV.12 B), jedyną różnicą widoczną na profilu DSC próbki tygodniowej w porównaniu do wcześniejszych pomiarów, jest nieznaczny spadek intensywności maksimum lokalnego widocznego przy temperaturze około 57 °C. Należy wspomnieć, że w przypadku kilku próbek nie zaobserwowano żadnych zmian w kształcie przejścia endotermicznego po upływie 1 tygodnia od sporządzenia

roztworu. Były też takie próbki, które zmieniły się po tygodniu bardziej niż te, dla których krzywe zilustrowano na Rys. IV.12.

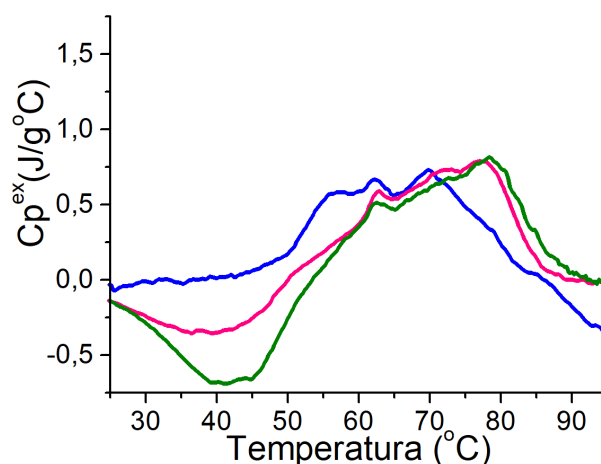
Niezależnie od zastosowanego rodzaju rozpuszczalnika, podczas kilkutydniowych badań zaobserwowano bardzo zbliżony przebieg zmian związanych ze starzeniem się roztworów surowicy. Na Rysunku IV.13 porównano efekty 2-tygodniowego przechowywania przykładowych roztworów surowicy w obydwu rozpuszczalnikach. W zakresie niskich temperatur (ok. 20 – 50 °C) na profilach DSC roztworów surowic, zarówno wodnych jak i buforowych, uwidacznia się nowy, charakterystyczny efekt, sporadycznie ujawniający się już dla próbek tygodniowych. Jest to przejście egzotermiczne o intensywności wzrastającej wraz z upływem czasu. Następuje także zmiana kształtu i przesunięcie „środka ciężkości” złożonego przejścia endotermicznego w stronę wyższych temperatur w porównaniu do roztworów świeżych. W zakresie temperatur ok. 50 – 65 °C następuje spadek intensywności obserwowanych maksimum, natomiast w zakresie ok. 65 – 85 °C obserwuje się jej wzrost.



Rysunek IV.13. Porównanie zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego wodnego oraz buforowego roztworu surowicy, gdzie: – świeży roztwór buforowy, – roztwór buforowy po 2 tygodniach, – świeży roztwór wodny, – roztwór wodny po 2 tygodniach.

Po dłuższym czasie przechowywania próbek opisane efekty towarzyszące starzeniu pogłębiają się zarówno dla buforowych jak i wodnych roztworów surowicy. Ilustruje to Rysunek IV.14, który przedstawia profile DSC uzyskane po 3 i 4 tygodniach przechowywania roztworów wodnych surowicy. Egzotermiczny efekt cieplny towarzyszący procesowi agregacji białek widoczny w zakresie niskich temperatur na profilu DSC próbki

trzy tygodniowej ($A \cong 6,7 \text{ J g}^{-1}$) jest zdecydowanie mniejszy niż ten dla próbki przechowywanej przez miesiąc ($A \cong 12,5 \text{ J g}^{-1}$). Kształt przejścia endotermicznego dla roztworu surowicy po 3 tygodniach przechowywania sugeruje przesunięcie maksimum lokalnego ($T_3, C_p^{\text{ex}_3}$) w stronę wyższych temperatur oraz „narastanie” nowego maksimum w okolicy $80 \text{ }^\circ\text{C}$.



Rysunek IV.14. lustracja zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego wodnego roztworu surowicy, gdzie: – **świeży roztwór (próbka wyjściowa)**, – **3 tygodnie**, – **4 tygodnie od sporządzenia roztworu**.

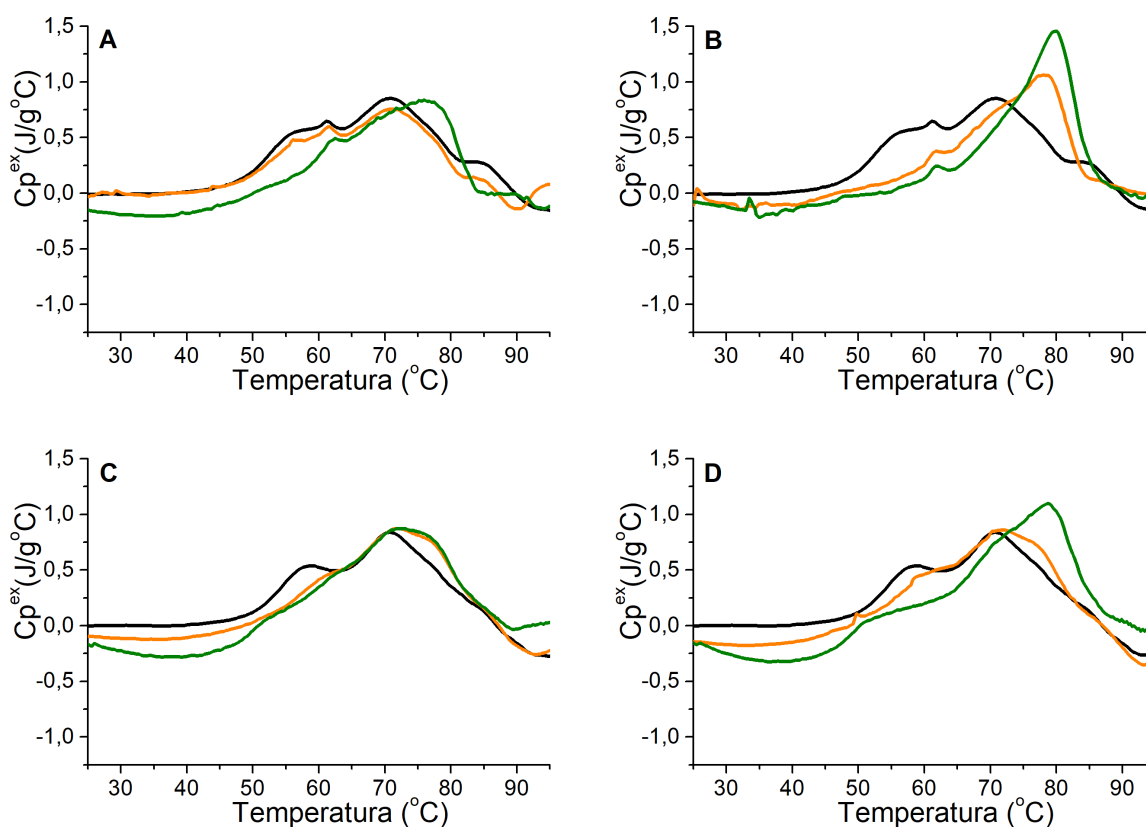
IV.3.2. Starzenie się próbek eksponowanych na promieniowanie neutronowe

IV.3.2.1. Roztwory wodne, dawka 5 Gy

Podczas badań roztworów wodnych surowic można było wyróżnić dwie główne grupy próbek, różniących się od siebie pod względem kształtu uzyskiwanego profilu DSC dla świeżo sporządzonych roztworów (opisane bliżej w Rozdziale IV.1). Dlatego na Rysunku IV.15 pokazano efekty ekspozycji na dawkę 5 Gy promieniowania neutronowego dla przykładowych roztworów reprezentujących każdą z tych grup. Pierwsza grupa próbek (nazywana dalej grupą pierwszą surowic) odpowiada roztworom surowic, dla których w złożonym przejściu endotermicznym można wyróżnić wyraźnie 3 maksima lokalne, w tym ($T_2, C_p^{\text{ex}_2}$) ujawniające wkład od procesu denaturacji termicznej haptoglobiny przy ok. $62 \text{ }^\circ\text{C}$. Dla drugiej grupy (nazywanej dalej grupą drugą surowic) wkład

ten się nie uwidaczniał i obserwowano tylko 2 maksima lokalne w zakresie temperatur przejścia do ok. 80 °C.

Rysunek IV.15 prezentuje zestawienie wyjściowych krzywych DSC roztworów wodnych surowicy z grupy pierwszej (A, B) oraz drugiej (C, D) oraz po 1 dniu i 1 tygodniu od ekspozycji *in vitro* na promieniowanie neutronowe dawką 5 Gy (B, D) w porównaniu do analogicznych krzywych próbek kontrolnych (A, C). Po tygodniu od ekspozycji na promieniowanie neutronowe (Rys. IV.15 – krzywe zielone), na krzywych DSC próbki kontrolnej oraz napromienionej uwidacznia się zmiana kształtu przejścia endotermicznego w porównaniu do krzywych rejestrowanych dla obu próbek po 1 dniu. Tendencje tych zmian są zgodne z opisanymi dla starzejących się roztworów surowicy (Rozdział IV.3.1). W zilustrowanym na Rys. IV.15 przykładzie zauważalne jest zarysowujące się niskotemperaturowe przejście egzotermiczne już dla próbek 1-tygodniowych.



Rysunek IV.15.A, B, C, D. Ilustracja zmian czasowych obserwowanych na profilach DSC dla dwóch przykładowych wodnych roztworów surowicy: A, B – roztwór z pierwszej grupy surowic (napromienianie próbki trwało 26 h 30 min. przy temperaturze 21 °C); C, D – roztwór z drugiej grupy surowic (napromienianie próbki trwało 26 h 7 min. przy temperaturze 19 °C), gdzie: – próbka wyjściowa, – pomiar po 1 dniu, – pomiar po 1 tygodniu.

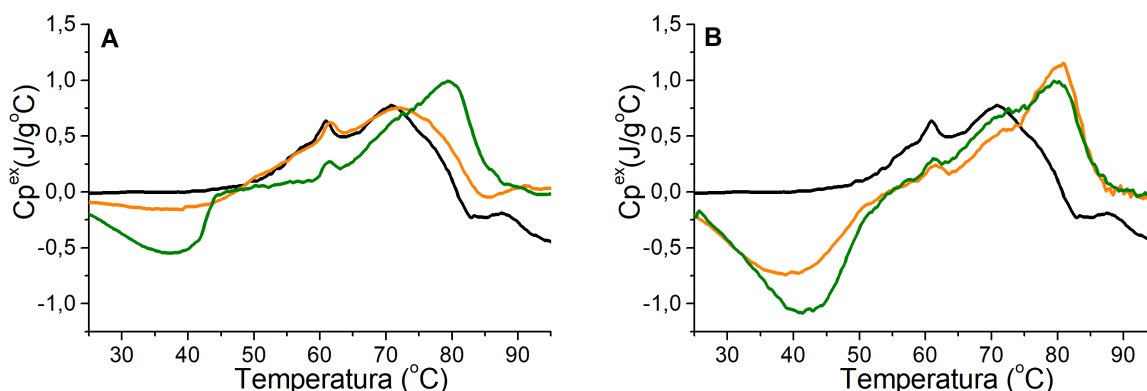
W porównaniu do profilu DSC świeżego roztworu, po czasie 1 dnia oraz 1 tygodnia następuje spadek pojemności cieplnych Cp^{ex_1} oraz Cp^{ex_2} odpowiadających maksimum lokalnym przy temperaturach T1 oraz T2. Po tygodniu od ekspozycji, na wszystkich prezentowanych profilach DSC próbek (zarówno kontrolnych jak i napromienionych) maksimum lokalne (T1, Cp^{ex_1}) zanika. Maksimum przejścia endotermicznego przesuwają się w kierunku wyższych temperatur.

Porównując krzywe DSC dla próbek napromieniowanych i kontrolnych, łatwo zauważyć znacząco większe zmiany w czasie po napromienianiu. Szczególnie wyraźny efekt ekspozycji na neutrony widoczny jest na Rys. IV.15 B w zestawieniu z Rys. IV.15 A. Duże różnice pomiędzy roztworem poddanym ekspozycji na neutrony, a kontrolnym występują już w pierwszym dniu po napromienianiu.

Wraz z upływem czasu, na krzywych DSC roztworów napromienionych można zaobserwować wyostrenie piku z maksimum przy temperaturze około 80 °C. Zmiana ta jest bardziej zaawansowana w przypadku próbki reprezentującej pierwszą grupę surowic (Rys. IV.15 A, B). Efekt ten na profilach DSC próbek kontrolnych nie jest widoczny do tygodnia przechowywania. Jednakże po dłuższym czasie przechowywania także w przypadku niektórych próbek kontrolnych pojawiało się podobne wyostrenie i zwiększenie intensywności piku w okolicy 80 °C (Rys. IV.16). Dla napromieniowanego roztworu surowicy z grupy pierwszej (Rys IV.15 B) już po dniu od ekspozycji na neutrony, intensywność maksimum przejścia wzrasta o 0.24 J g⁻¹°C⁻¹, a po tygodniu o 0.64 J g⁻¹°C⁻¹. Dla eksponowanego na taką samą dawkę promieniowania roztworu surowicy z grupy drugiej, dopiero po tygodniu przechowywania intensywność ta wzrasta o 0,6 J g⁻¹°C⁻¹ (Rys 4 D). Dla przedstawionego na Rys. IV.15 przykładu wodnego roztworu surowicy z widocznym w zakresie przejścia endotermicznego maksimum lokalnym (T2, Cp^{ex_2}), obserwowane zmiany związane z procesem starzenia oraz działaniem promieniowania jonizującego wydają się zachodzić szybciej w porównaniu z roztworem reprezentującym drugą grupę surowic. Warto jednak zwrócić uwagę, że choć czasy ekspozycji były w obydwu przypadkach podobne, to temperatura otoczenia była o 2 °C niższa przy napromienianiu próbki z drugiej grupy surowic. Ta różnica temperatury otoczenia podczas ekspozycji, a nie pochodzenie surowic, mogła być zatem główną przyczyną zaobserwowanych różnic. Jednakże tego wpływu różnicy temperatur otoczenia nie widać przy porównaniu 1-dniowych próbek kontrolnych, towarzyszących eksponowanym, z wyjściowymi. Zaskakująco, krzywa DSC odpowiadająca próbce kontrolnej na Rys. IV.15 C jest bardziej zmieniona niż analogiczna

krzywa na Rys. IV.15 A względem krzywej próbki wyjściowej. Nasuwa się zatem pytanie, czy wpływ wyższej temperatury w czasie ekspozycji ujawnia się w surowicy napromieniowanej z opóźnieniem?

Rysunek IV.16 prezentuje zestawienie krzywych DSC ilustrujące zmiany czasowe zachodzące w próbce eksponowanej na neutrony i odpowiadającej jej próbce kontrolnej, przechowywanych przez 3 – 4 tygodnie od momentu ekspozycji.



Rysunek IV.16.A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC wybranego wodnego roztworu surowicy: kontrolnego (A) oraz eksponowanego na promieniowanie neutronowe dawką 5 Gy (B), gdzie: – próbka wyjściowa, – pomiar po 3 tygodniach, – pomiar po 4 tygodniach. Napromienianie trwało 23 godz. 51 min. przy temperaturze 18 C.

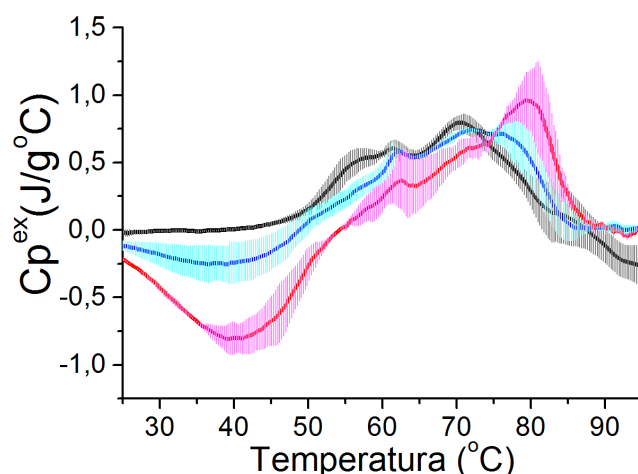
Porównując Rysunki IV.15 i IV.16 można stwierdzić, że zmiany widoczne na profilach DSC roztworów przechowywanych dłużej intensyfikują się. Najlepiej widocznym efektem różnicującym krzywe DSC roztworu napromienionego w stosunku do kontroli jest pogłębiające się przejście egzotermiczne widoczne w niskich temperaturach. Dla zilustrowanego przykładu, po 3 tygodniach wartość egzotermicznego efektu cieplnego dla roztworu kontrolnego wynosi 2.8 J g^{-1} , a dla roztworu napromienionego aż 14.0 J g^{-1} . Po 4 tygodniach analogiczne wartości to: 8.2 J g^{-1} dla próbki kontrolnej i 17.8 J g^{-1} dla napromienionej.

Próbka napromieniona zaprezentowana na Rysunku IV.16 B jest przykładem roztworu, dla którego na profilach DSC, mierzonych po czasie 3 – 4 tygodni, przejście endotermiczne w zakresie temperatur powyżej 65 °C staje się bardziej złożone. Maksimum przejścia obserwujemy na krzywych DSC próbki napromienionej przy temperaturze ok. 80 °C , jednocześnie przy temperaturze ok. 73 °C widoczne jest ramię. Do 3 tygodni przechowywania profil DSC próbki kontrolnej w tym zakresie temperatur pozostaje prawie bez zmian.

Ujawniają się one wyraźnie w kształcie przejścia endotermicznego odpowiadającego roztworowi kontrolnemu dopiero po 4 tygodniach. Wy tłumaczenia przyczyn wolniejszych w czasie zmian próbki kontrolnej w przypadku zilustrowanym na Rys. IV.16 A (także w porównaniu z 1-tygodniowymi próbkami, dla których krzywe DSC przedstawiono na Rys. IV.15 A i C) należy prawdopodobnie szukać w stosunkowo niskiej temperaturze otoczenia (18 °C) w trakcie ekspozycji. Także czas przebywania próbek w warunkach nie chłodniczych w trakcie ekspozycji był krótszy w przypadku eksperymentu odnoszącego się do wyników pokazanych na Rys. IV.16 w porównaniu z tymi z Rys. IV.15, ze względu na większą aktywność źródła neutronów w tym okresie.

Podczas pomiarów długofalowych na krzywych DSC obserwowano jeszcze jedno charakterystyczne zjawisko polegające na początkowym wzroście, a następnie po określonym czasie, różnym osobniczo dla poszczególnych próbek, spadku pojemności cieplnej odpowiadającej maksimum przejścia endotermicznego. Skutki tego zjawiska widoczne są na Rys. IV.16 B przy porównaniu krzywej DSC próbki napromienionej po 4 tygodniach przechowywania z krzywą DSC tej samej próbki mierzonej po 3 tygodniach od ekspozycji. Taki efekt narastania, a następnie spadku intensywności w temperaturze maksimum przejścia obserwowany był w czasie starzenia się roztworów surowicy dla większości z nich.

Rysunek IV.17 przedstawia zestawienie uśrednionych profili DSC dla roztworów wodnych surowicy mierzonych po 3 tygodniach od ekspozycji na neutrony dawką 5 Gy.



Rysunek IV.17. Uśrednione krzywe DSC ($n = 4$) zarejestrowane 3 tygodnie po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania neutronami dawką 5 Gy roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbki wyjściowe, – próbki kontrolne, – próbki napromienione. Zacięniowany obszar na krzywych DSC to odchylenie standardowe.

Odchylenie standardowe jest stosunkowo duże ze względu na podkreślaną wcześniej znaczącą zmienność osobniczą oraz brak możliwości zapewnienia identycznych warunków ekspozycji. Uśrednione krzywe DSC pokazują wyraźne różnice w kształcie profilu DSC próbek napromienionych, w odniesieniu do profilu DSC próbek kontrolnych w całym badanym zakresie temperaturowym.

W Tabeli IV.6 zebrano średnie wartości parametrów termodynamicznych przejść obserwowanych na profilach DSC roztworów wodnych surowicy poddanych ekspozycji na promieniowanie neutronowe (dawka 5 Gy) oraz odpowiadających im roztworów kontrolnych, a także roztworów świeżo przygotowanych (wyjściowych). Aby umożliwić przeprowadzenie analizy statystycznej wyników, w celu zwiększenia liczebności w poszczególnych grupach wyników, zaprezentowane dane czasowe zostały pogrupowane na pomiary po 1 - 2 tygodniach (1-2 t) od ekspozycji oraz pomiary po 3 - 4 tygodniach ekspozycji (3-4 t).

Tabela IV.6. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC **wodnych roztworów surowicy** ($n = 6$): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) **dawką 5 Gy promieniowania neutronowego**.

Parametry	Wyjściowa	1 – 2 tygodnie		3 – 4 tygodnie	
		k	n	k	n
$T_1 / ^\circ\text{C}$	$58,0 \pm 0,8$	58,0*	58,0*	58,0*	58,0*
$T_2 / ^\circ\text{C}$	$62,0 \pm 1,2$	$62,7 \pm 1,4$	$62,8 \pm 1,5$	$62,7 \pm 1,1$	$62,6 \pm 1,1$
$T_3 / ^\circ\text{C}$	$70,6 \pm 0,4$	$73,8 \pm 2,9$	$76,2 \pm 3,5$	$76,3 \pm 3,5$	$77,4 \pm 3,3$
$Cp_1 / \text{J g}^{-1}\text{C}^{-1}$	$0,54 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,21$	$0,32 \pm 0,27$	$0,19 \pm 0,20$	$0,23 \pm 0,18$
$Cp_2 / \text{J g}^{-1}\text{C}^{-1}$	$0,65 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,28$	$0,57 \pm 0,34$	$0,54 \pm 0,14$	$0,49 \pm 0,17$
$Cp_3 / \text{J g}^{-1}\text{C}^{-1}$	$0,75 \pm 0,11$	$0,91 \pm 0,13$	$1,08 \pm 0,22$	$0,89 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,15$
$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	$18,0 \pm 2,2$	$18,2 \pm 2,7$	$18,9 \pm 3,7$	$15,0 \pm 1,3$	$15,5 \pm 1,5$
HHW / $^\circ\text{C}$	$24,5 \pm 2,2$	$20,6 \pm 5,1$	$18,0 \pm 6,7$	$18,1 \pm 5,1$	$19,0 \pm 5,2$
$A / \text{J g}^{-1}$	0	$4,3 \pm 3,7$	$6,5 \pm 4,4$	$8,1 \pm 5,6$	$15,3 \pm 1,6$

Parametry przejścia endotermicznego: T_i – temperatura maksimum lokalnego gdzie $i = 1, 2, 3$, Cp – nadmiarowa pojemność cieplna odpowiadająca temperaturze maksimum lokalnego T_i , ΔH – zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek, HHW – szerokość półkwaowa przejścia endotermicznego,

Parametr przejścia egzotermicznego: A – wartość egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi agregacji
 * Z powodu zaniku maksimum lokalnego (T_1 , Cp^{ex_1}) niemożliwe było oznaczenie temperatury T_1 na krzywych DSC próbek mierzonych po czasie. Dlatego zdecydowano się na odczytywanie wartości Cp^{ex_1} w temperaturze 58°C , przy której występowało to maksimum dla próbki wyjściowej.

Dane przedstawione w Tabeli IV.6 wskazują, iż w trakcie starzenia się roztworów surowicy zarysowuje się tendencja do spadku wartości pojemności cieplnych odpowiadających maksimum lokalnym przy temperaturach T1 oraz T2. Wartości nadmiarowej pojemności cieplnej Cp^{ex_1} oraz Cp^{ex_2} nieco bardziej maleją w czasie dla próbek napromienionych w stosunku do próbek kontrolnych. Wykonany nieparametryczny test Friedmana wykazał istotność statystyczną zmiany parametru Cp^{ex_1} w badanych etapach czasowych zarówno dla próbek kontrolnych ($p = 0.004$, współczynnik zgodności Kendalla 0.74) jak i napromienionych ($p = 0.01$, współczynnik zgodności Kendalla 0.61). Nie ma jednak istotnych statystycznie różnic wartości Cp^{ex_1} pomiędzy badanymi grupami próbek. Po 1-2 tygodni przechowywania roztworów pojemność cieplna Cp^{ex_2} maleje bardziej dla próbek napromienionych (o $0.08 \text{ J g}^{-1}\text{C}^{-1}$) niż kontrolnych (o $0.02 \text{ J g}^{-1}\text{C}^{-1}$). Po dłuższym czasie przechowywania spadek wartości Cp^{ex_2} dla obu badanych grup próbek, w porównaniu do wartości tego parametru po 1-2 tygodniach, jest zbliżony. Różnica wartości Cp^{ex_2} pomiędzy grupą próbek kontrolnych, a napromienionych utrzymuje się na podobnym samym poziomie (1-2 tygodnie $0.06 \text{ J g}^{-1}\text{C}^{-1}$, 3-4 tygodnie $0.05 \text{ J g}^{-1}\text{C}^{-1}$).

Średnia wartość temperatury odpowiadającej maksimum lokalnemu ($T3$, Cp^{ex_3}), będącemu jednocześnie maksimum całego przejścia, wzrasta wraz z czasem przechowywania próbek. Po 2 tygodniach przechowywania, dla próbek napromienionych przesunięcie maksimum w stronę wyższych temperatur następuje o większą wartość (o $5.6 \text{ }^\circ\text{C}$, do $76.2 \pm 3.5 \text{ }^\circ\text{C}$) niż w przypadku próbek kontrolnych (o $3.2 \text{ }^\circ\text{C}$, do $73.8 \pm 2.9 \text{ }^\circ\text{C}$) w odniesieniu do roztworu wyjściowego ($70.6 \pm 0.4 \text{ }^\circ\text{C}$). Wykonany nieparametryczny test U Manna-Whitneya nie potwierdził istotności statystycznej zmiany parametru T3 względem dwóch grup badanych próbek. Po dłuższym czasie, dla próbek kontrolnych wartość temperatury T3 dalej znacznie wzrasta (o $2.5 \text{ }^\circ\text{C}$, do $76.3 \pm 3.5 \text{ }^\circ\text{C}$), natomiast wzrost dla próbek napromienionych jest już mniejszy (o $1.2 \text{ }^\circ\text{C}$, do $77.4 \pm 3.3 \text{ }^\circ\text{C}$). Nieparametryczny test Friedmana wykazał, że towarzyszący starzeniu się roztworów surowicy wzrost temperatury przejścia T3 jest statystycznie istotny zarówno dla roztworu kontrolnego ($p = 0.001$, współczynnik zgodności Kendalla 0.88) jak i roztworu napromienionego ($p = 0.001$, współczynnik zgodności Kendalla 0.90).

Po 1-2 tygodni przechowywania roztworów, wartość pojemności cieplnej odpowiadającej temperaturze maksimum przejścia wzrasta dla obu badanych grup próbek. Wzrost wartości Cp^{ex_3} jest większy dla próbek napromienionych niż dla kontrolnych, co zostało potwierdzone nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya ($p = 0.02$).

Po 3 – 4 tygodniach przechowywania wartość średnia Cp^{ex}_3 nieco spada i jest podobna dla surowic napromienionych i kontrolnych. Źródłem wzrostu, a następnie spadku wartości Cp^{ex}_3 , może być powstawanie jakiegoś nietrwałego produktu starzenia się surowicy, a potem jego rozpad lub przekształcenie się w nową substancję, dającą mniejszy wkład do pojemności cieplnej w tym zakresie temperatur. Przy porównaniu średnich wartości Cp^{ex}_3 dla próbek wyjściowych, „1-2 t” i „3-4 t”, nieparametryczny test Friedmana wskazał istotne różnice w przypadku roztworu kontrolnego ($p = 0.04$, współczynnik zgodności Kendalla 0.48) natomiast dla roztworu napromienionego nie wykazał istotności statystycznej ($p = 0.07$ współczynnik zgodności Kendalla 0.40). Niski współczynnik zgodności Kendalla może sugerować, że zachowanie tego parametru jest niejednakowe dla wszystkich badanych próbek.

Średnie wartości entalpii procesu termicznej denaturacji białek surowicy (ΔH) maleją po 3 – 4 tygodniach przechowywania roztworów zarówno dla próbek napromienionych jak i kontrolnych. Za takie zachowanie może w dużej mierze odpowiadać coraz większy wkład egzotermicznego procesu agregacji białek w zestarzałych roztworach surowic. Wyniki analizy statystycznej ANOVA dla powtarzanych pomiarów potwierdzają istotność statystyczną zmian czasowych parametru ΔH ($p = 0.01$) ale nie ma istotnych różnic w obrębie badanych grup kontrolnej oraz napromienionej.

Średnia wartość szerokości połówkowej przejścia endotermicznego (HHW), po czasie 1 – 2 tygodni przechowywania roztworów, maleje bardziej dla próbek napromienionych (o $6.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $18.0 \pm 6.7\text{ }^{\circ}\text{C}$) niż kontrolnych (o $3.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $20.6 \pm 5.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) w stosunku do wartości wyjściowej $24.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po czasie 3 – 4 tygodni tylko dla próbek kontrolnych jest obserwowany niewielki dalszy spadek wartości HHW. Za pomocą analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów ANOVA potwierdzono istotność statystyczną zmian czasowych ($p < 0.001$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbkami napromieniowanymi, a kontrolnymi na tych samych etapach starzenia się roztworów ($p = 0.09$).

Uśrednione wartości egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi niskotemperaturowej agregacji (A) wzrastają znacznie wraz z upływem czasu zarówno dla roztworów eksponowanych na promieniowanie jak i dla kontrolnych. Jednakże przejście egzotermiczne na profilach DSC próbek napromienionych intensyfikuje się w czasie bardziej niż dla próbek kontrolnych. Analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów ANOVA

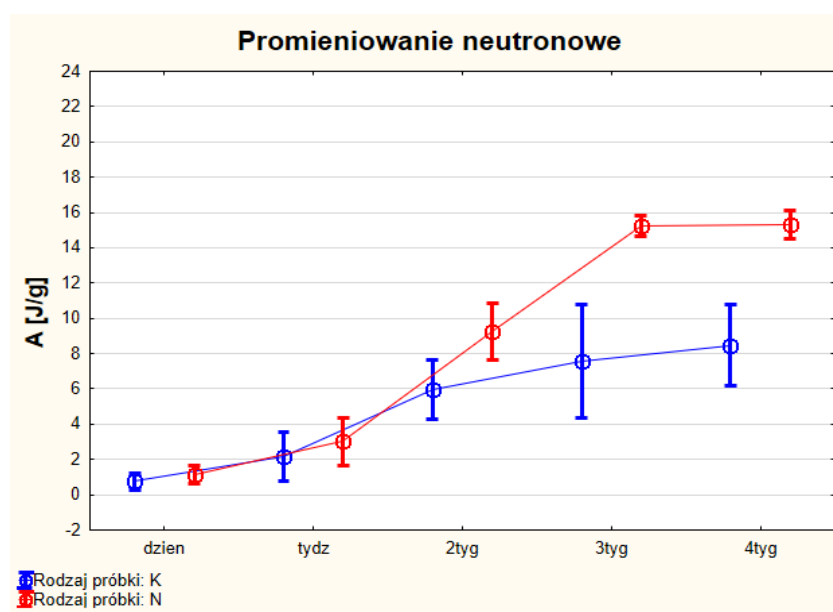
(z czynnikiem powtarzanych pomiarów – etap czasowy oraz czynnikiem jakościowym – rodzaj próbki) wykazała statystyczną istotność zmian średniej wartości A dla badanych roztworów surowicy w czasie starzenia się badanych próbek ($p < 0.001$). Istotne statystycznie różnice wykazano również biorąc pod uwagę dwie badane grupy próbek: kontrolne oraz napromienione ($p = 0.01$). Tabela IV.7 przedstawia wynik wykonanego testu Scheffego (*post-hoc*) pokazujący istotność różnic pomiędzy parami średnich wartości parametru A w poszczególnych etapach czasowych z uwzględnieniem rodzaju próbki.

Tabela IV.7 Wynik wykonanego testu *post hoc* Scheffego, z zaznaczeniem kolorem czerwonym wartości statystycznie istotnych.

Nr podkl.	Test Scheffego; zmienna DV_1 (promNeut_powt_pom) Prawdopodobieństwa dla testów <i>post-hoc</i> Błąd: MS międzygrupowe, powt. Pomiarów, połączone = ,68753, df							
	rodzaj próbki	CZAS	{1} ,2	{2} 1,2	{3} 2,0	{4} ,3	{5} 1,9	{6} 3,6
1	K	1 d		0.519	0.043	1.000	0.040	0.000
2	K	1-2 t	0.519		0.726	0.595	0.789	0.001
3	K	3-4 t	0.043	0.726		0.042	1.000	0.068
4	N	1 d	1.000	0.595	0.042		0.080	0.000
5	N	1-2 t	0.040	0.789	1.000	0.080		0.068
6	N	3-4 t	0.000	0.001	0.068	0.000	0.068	

Rysunek IV.18 zamieszczono w celu dokładniejszego zilustrowania zmian w czasie nietypowego przejścia egzotermicznego (w zakresie niższych temperatur niż—przejście endotermiczne), ujawniającego się podczas starzenia roztworów surowic. Prezentuje on zestawienie uzyskanych średnich wartości A dla wszystkich poszczególnych badanych etapów czasowych (dane zbierane przez 4 tygodnie, w odstępach tygodniowych) i umożliwia bardziej czytelne dostrzeżenie różnic pomiędzy napromieniowanymi i kontrolnymi roztworami surowicy. Po tygodniu przechowywania roztworów uzyskane średnie wartości entalpii agregacji są nieco większe dla próbek napromienionych ($3.0 \pm 1.3 \text{ J g}^{-1}$) niż kontrolnych ($2.1 \pm 1.4 \text{ J g}^{-1}$), ale nie różnią się w granicach błędu doświadczalnego. Dwa tygodnie po ekspozycji, wartości A dla próbek napromienionych ($9.2 \pm 1.6 \text{ J g}^{-1}$) są znacznie większe niż dla próbek kontrolnych ($6.0 \pm 1.7 \text{ J g}^{-1}$). Po 3 oraz 4 tygodniach

przechowywania roztworów, średnia wartość A dla próbek napromienionych jest znacznie większa niż dla kontrolnych, a odchylenie standardowe niewielkie. Małą wartość odchylenia standardowego w przypadku 3 i 4 tygodniowych próbek napromienionych można wytłumaczyć tym, że po takim czasie, niskotemperaturowy proces agregacji pewnej frakcji białek surowicy nie ulega dalszej intensyfikacji.

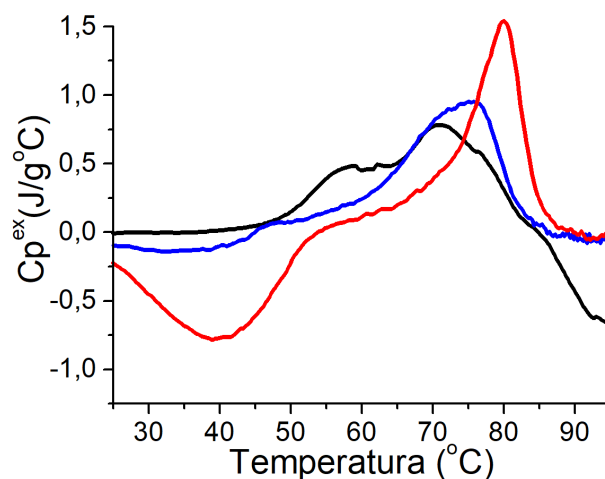


Rysunek IV.18. Średnie (\pm błąd standardowy) wartości egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi agregacji (A) ujawniającemu się na krzywych DSC roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej w niskotemperaturowym zakresie temperatur: (– wartości A próbki kontrolne, – wartości A próbki napromienione dawką 5 Gy). (punkty reprezentujące wyznaczone średnie połączono tylko dla wygody śledzenia zmian)

IV.3.2.2. Starzenie się wodnego roztworu surowicy krwi jednorazowo ekspozowanego na dawkę 13 Gy promieniowania neutronowego.

Jak opisano w Rozdziale IV.2.1, w celu zbadania przewidywanych większych efektów wpływu wyższych dawek promieniowania neutronowego na roztwory surowic, wykonana została pojedyncza ekspozycja roztworu wodnego surowicy na dawkę 13 Gy promieniowania neutronowego. Rysunek IV.19 pokazuje wyniki uzyskane po tygodniu od ekspozycji. Chociaż charakter zmian jest podobny do tych obserwowanych dla roztworów po ekspozycji na dawkę 5 Gy promieniowania neutronowego, to różnice w profilach termicznych zmian pojemności

cieplnej pomiędzy napromieniowanymi i kontrolnymi roztworami surowicy są wyraźniej widoczne przy zastosowaniu wyższej dawki promieniowania.



Rysunek IV.19. Krzywe DSC zarejestrowane tydzień po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 13 Gy promieniowania neutronowego przykładowego roztworu surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 13 Gy. Napromienianie trwało 69 godz. 6 min. przy temperaturze 21 $^{\circ}C$.

Zestawienie krzywych DSC na Rys. IV.19 pokazuje, że po tygodniu od ekspozycji na promieniowanie, przesunięcie maksimum przejścia endotermicznego w stronę wyższych temperatur z równoczesnym wzrostem odpowiadającej mu pojemności cieplnej jest większe dla próbki napromienionej (odpowiednio o 9 $^{\circ}C$ i 0.76 $J g^{-1}C^{-1}$) niż kontrolnej (4.8 $^{\circ}C$ i 0.17 $J g^{-1}C^{-1}$). Tak dużego efektu nie obserwowano we wcześniejszych badaniach. Biorąc pod uwagę znacznie dłuższy czas napromieniania próbki (ponad 69 godz.) niż w przypadku zastosowania dawki 5 Gy, należało się spodziewać (i tak było) większych starzeniowych efektów widocznych także na krzywych DSC roztworu kontrolnego. Podobne wartości parametrów opisujących maksimum przejścia, jak uzyskane dla próbki kontrolnej po 1 tygodniu od ekspozycji, obserwowane były dla roztworów napromienionych dawką 5 Gy dopiero po 3 – 4 tygodniach przechowywania.

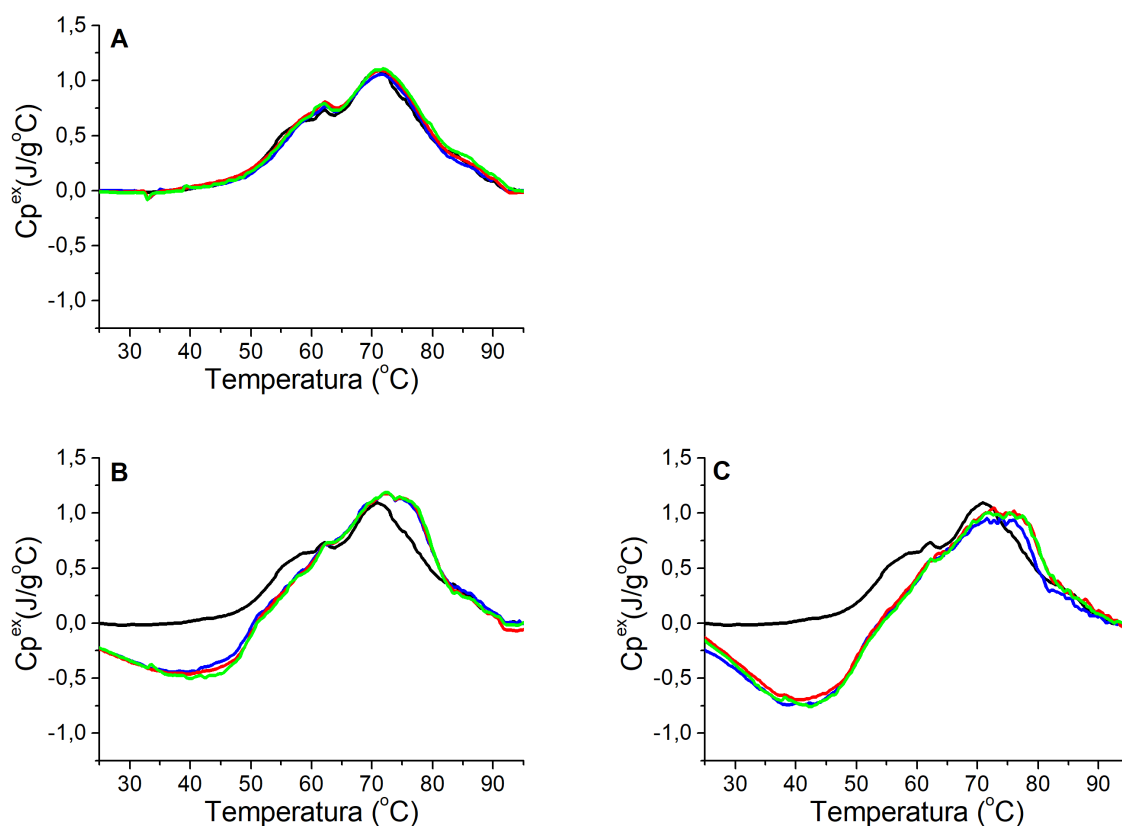
Po tygodniu przechowywania roztworów, pomimo zróżnicowania kształtu profili DSC, wartość entalpii procesu denaturacji wynosi tyle samo dla próbki kontrolnej i napromienionej ($\Delta H = 16.1 J g^{-1}$). Należy zaznaczyć, że szerokość połówkowa przejścia endotermicznego próbki kontrolnej jest około dwa razy większa (HHW = 14.6) niż ta dla próbki napromienionej (HHW = 7.7).

Przejście egzotermiczne widoczne na Rys. IV.19 na profilu DSC próbki kontrolnej jest stosunkowo małe ($A = 2.4 \text{ J g}^{-1}$), natomiast na profilu DSC próbki napromienionej bardzo zaawansowane ($A = 14.8 \text{ J g}^{-1}$). Tak duży efekt egzotermiczny wykazywały próbki napromienione dawką 5 Gy po długim czasie przechowywania (3- 4 tygodni).

IV.3.3. Starzenie się próbek eksponowanych na promieniowanie rentgenowskie

IV.3.3.1. Roztwory wodne surowicy, dawka 5 Gy i 10 Gy

Na Rysunku IV.20 zilustrowane zostały wyniki pomiarów kalorymetrycznych wykonanych po czasie 1, 2 oraz 3 tygodni dla wybranego wodnego roztworu surowicy krwi ludzkiej poddanego działaniu promieniowania rentgenowskiego (dawka 5 Gy lub 10 Gy). Po tygodniu od ekspozycji nie są widoczne żadne zmiany na profilach DSC mierzonych próbek (Rys. IV.20 A).

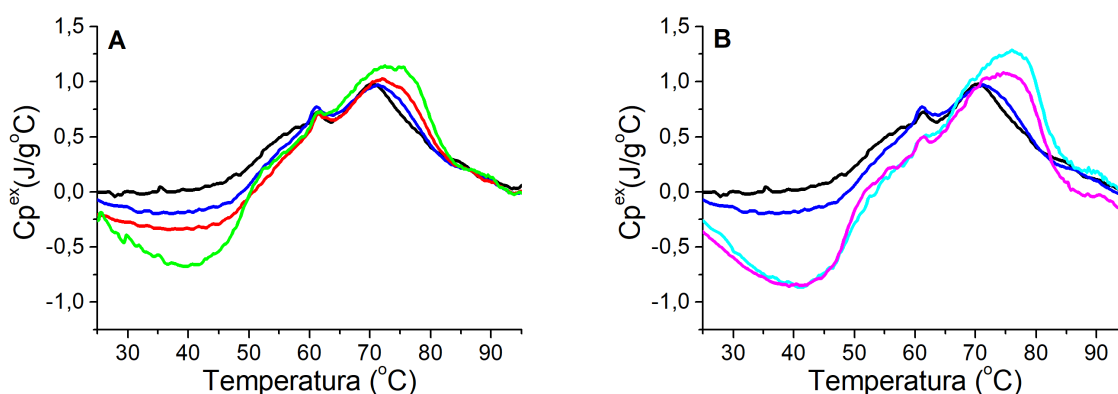


Rysunek IV.20.A, B, C. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego wodnego roztworu surowicy eksponowanego na promieniowanie X mierzonego po 1 tygodniu (A), 2 tygodniach (B), 3 tygodniach (C), gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 5 Gy, – próbka napromieniona dawką 10 Gy.

Po 2 oraz 3 tygodniach przechowywania próbek można zauważyć charakterystyczne zmiany w kształcie uzyskanych profili DSC związane ze starzeniem się wszystkich badanych próbek. Porównanie krzywych DSC uzyskanych dla próbek kontrolnych, napromienionych dawką 5 Gy oraz napromienionych dawką 10 Gy wyraźnie wskazuje na brak różnic wynikających z ekspozycji surowicy na powyższe dawki promieniowania rentgenowskiego. We wszystkich przebadanych wodnych roztworach surowic ($n = 12$) długofalowy wpływ promieniowania X dawkami 5 Gy oraz 10 Gy był słabo widoczny lub nie ujawniał się na krzywych DSC.

IV.3.3.2. Wodny roztwór surowicy krwi, dawki z zakresu 10 Gy – 120 Gy

W rozdziale przedstawiono wyniki pojedynczego eksperymentu napromienienia wodnego roztworu surowicy krwi ludzkiej pochodzącej od jednej osoby różnymi dawkami promieniowania rentgenowskiego (10 Gy, 30 Gy, 70 Gy, 120 Gy). Najwyraźniej efekt związany ze wzrostem dawki promieniowania rentgenowskiego można było zaobserwować porównując krzywe DSC zarejestrowane po 3 tygodniach, co przedstawia Rysunek IV.21.



Rysunek IV.21.A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC zarejestrowanych 3 tygodnie po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawkami: A) - 10 Gy, 30 Gy, B) - 70 Gy, 120 Gy roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej pochodzącej od jednej osoby, gdzie: - **próbka wyjściowa**, - **próbka kontrolna**, - **próbka napromieniona dawką 10 Gy**, - **próbka napromieniona dawką 30 Gy**, - **próbka napromieniona dawką 70 Gy**, - **próbka napromieniona dawką 120 Gy**.

Po 3 tygodniach przechowywania, charakterystyczne zmiany starzeniowe ujawniają się na krzywych DSC wszystkich zaprezentowanych próbek w całym badanym zakresie temperaturowym, zarówno w obrębie przejścia endo- jak i egzotermicznego. Intensywność obserwowanego przejścia egzotermicznego jest silnie zależna od wartości dawki

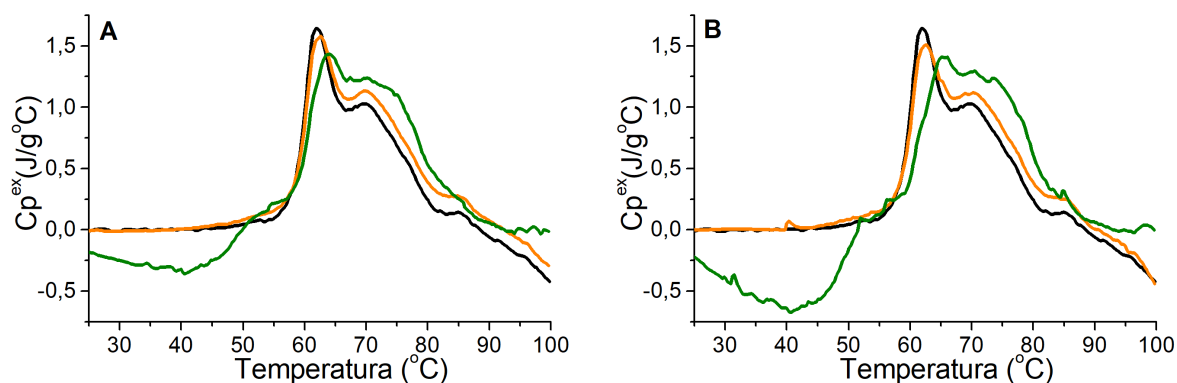
promieniowania ($A_{10\text{Gy}} = 7.5 \text{ J g}^{-1}$, $A_{30 \text{ Gy}} = 12.9 \text{ J g}^{-1}$, $A_{70 \text{ Gy}} = 17.0 \text{ J g}^{-1}$, $A_{120 \text{ Gy}} = 17.7 \text{ J g}^{-1}$) oraz jest znacznie większa dla każdej próbki napromienionej w porównaniu do próbki kontrolnej ($A_{\text{kontrolna}} = 3.7 \text{ J g}^{-1}$). Szerokość połówkowa (HHW) obserwowanych przejść endotermicznych jest najmniejsza w przypadku krzywych DSC roztworów napromienionych dawkami 70 Gy oraz 120 Gy ($\text{HHW}_{70 \text{ Gy}, 120 \text{ Gy}} = 16.2 \text{ }^\circ\text{C}$), w porównaniu do tych poddanych działaniu dawek 10 Gy lub 30 Gy ($\text{HHW}_{10 \text{ Gy}, 30 \text{ Gy}} = 20.7 \text{ }^\circ\text{C}$) oraz kontrolnej ($\text{HHW}_{\text{kontrolna}} = 22.0 \text{ }^\circ\text{C}$). Intensywność maksimum lokalnego (T_3 , Cp^{ex_3}) na krzywych DSC próbek napromienionych jest tym większa im wyższa była zadana dawka promieniowania ($\text{Cp}^{\text{ex}_3 / 10\text{Gy}} = 1.02 \text{ J g}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Cp}^{\text{ex}_3 / 30 \text{ Gy}} = 1.13 \text{ J g}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Cp}^{\text{ex}_3 / 70 \text{ Gy}} = 1.28 \text{ J g}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}$) za wyjątkiem próbki napromienionej najwyższą dawką ($\text{Cp}^{\text{ex}_3 / 120\text{Gy}} = 1.08 \text{ J g}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}$) w odniesieniu do próbki kontrolnej ($\text{Cp}^{\text{ex}_3 \text{ kontrolna}} = 0.97 \text{ J g}^{-1}\text{ }^\circ\text{C}$). W przypadku roztworów surowicy obserwowanych przez dłuższy czas, na profilach DSC w miarę uzyskiwania kolejnych wyników pomiarów kalorymetrycznych, po stopniowym wzroście maksimum lokalnego przy temperaturze ok. $70 \text{ }^\circ\text{C}$ następował spadek intensywności tego maksimum. Ostatni widoczny na profilach DSC etap starzenia się badanych roztworów wodnych w zakresie temperatur ok. $65 - 85 \text{ }^\circ\text{C}$ obejmował spadek intensywności przejścia endotermicznego, co jest podobne do obserwowanego efektu na krzywej DSC próbki poddanej najwyższej zadanej dawce promieniowania X (120 Gy). Obserwując zmiany w kształcie krzywych DSC próbek poddanych działaniu wysokich dawek promieniowania X można by stwierdzić, że im wyższa została użyta dawka tym bardziej zaawansowany etap starzenia roztworu uwidacznia się na krzywych DSC.

IV.3.3.3. Roztwory buforowe, dawki 5 Gy i 10 Gy

W badaniach DSC długofalowego wpływu promieniowania X na roztwory buforowe surowicy, efekty dawek 5 Gy i 10 Gy były bardzo podobne. Rysunek IV.22 pokazuje zmiany, jakie zachodzą po 1 tygodniu w kształcie otrzymywanych profili DSC dla reprezentatywnej próbki roztworu buforowego surowicy poddanej ekspozycji na promieniowanie X dawką 10 Gy oraz kontrolnej, w odniesieniu do krzywych mierzonych po 1 dniu od ekspozycji. Na krzywych DSC ujawniają się dwa charakterystyczne efekty, związane ze starzeniem się białek zawartych w badanych roztworach: 1) obecność przejścia egzotermicznego w niskich temperaturach $20 - 55 \text{ }^\circ\text{C}$, 2) przesunięcie przejścia endotermicznego w stronę wyższych temperatur. Porównanie profili DSC próbki kontrolnej oraz napromienionej, otrzymanych po

1 tygodniu przechowywania sugeruje, że wskazane zmiany zachodzą szybciej dla próbek poddanych działaniu promieniowania X niż dla kontrolnych.

Związane z procesem egzotermicznym przejście pojawiające się w niskich temperaturach na krzywych DSC próbki ekspozycji na promieniowanie jest wyraźnie większe niż w przypadku próbki kontrolnej mierzonej po tym samym czasie (Rys. IV.22 – krzywe zielone). Prawdopodobnie może to świadczyć, o większym nasileniu niskotemperaturowego egzotermicznego procesu agregacji pewnej frakcji białek w napromienionym roztworze surowicy niż w roztworze kontrolnym. W większości badanych próbek surowicy przejście egzotermiczne na krzywych DSC mogło być obserwowane już po pierwszym tygodniu i pogłębiało się wraz z procesem starzenia się badanych roztworów. Zdarzały się jednak przypadki próbek, gdzie proces egzotermiczny w niski temperaturach ujawniał się dopiero po 2 tygodniach przechowywania próbek [Kielboń et al. 2019 Rys. 3].



Rysunek IV.22.A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla reprezentatywnego buforowego roztworu surowicy: kontrolnego (A) oraz ekspozycji na promieniowanie X dawką 10 Gy (B), gdzie: – próbka wyjściowa, – pomiar po 1 dniu, – pomiar po 1 tygodniu.

Tabela IV.8 pokazuje średnie wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego dla buforowych roztworów surowicy krwi ludzkiej poddanych działaniu promieniowania X (dawka 10 Gy). W ramach analizy statystycznej uzyskanych wartości parametrów termodynamicznych wykonano test ANOVA dla powtarzanych pomiarów czasowych: 1 dniowych (1d) (dane przedstawione w Tabeli IV.5), po 1 tygodniu (1t) oraz 2 tygodniach przechowywania (2t). Rodzaj próbki (kontrolna lub napromieniona) przyjęto jako jakościową zmienną grupującą. W przypadku braku spełnienia założeń, wykonany został nieparametryczny test Friedmana.

Tabela IV.8. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC buforowych roztworów surowicy ($n = 6$): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) dawką 10 Gy promieniowania rentgenowskiego.

Parametry	Wyjściowa	1 tydzień		2 tygodnie	
		k	n	k	n
$T_m / ^\circ\text{C}$	63.1 ± 1.3	66.0 ± 2.8	66.6 ± 2.8	65.9 ± 3.1	67.2 ± 2.8
$Cp_m / \text{J g}^{-1}\text{C}^{-1}$	1.53 ± 0.11	1.28 ± 0.10	1.31 ± 0.10	1.29 ± 0.14	1.32 ± 0.20
$\Delta H / \text{J g}^{-1}$	24.0 ± 3.5	22.9 ± 3.8	23.3 ± 3.7	23.0 ± 2.4	23.3 ± 2.9
HHW / $^\circ\text{C}$	14.7 ± 1.3	16.8 ± 1.2	16.9 ± 1.2	16.7 ± 1.6	17.0 ± 2.1
$A / \text{J g}^{-1}$	0	3.2 ± 4.0	6.0 ± 7.1	16.9 ± 7.1	22.0 ± 8.1

Parametry przejścia endotermicznego: T_m – temperatura przejścia, Cp_m – nadmiarowa pojemność cieplna odpowiadająca temperaturze przejścia T_m , ΔH – zmiana entalpii procesu termicznej denaturacji białek, HHW – szerokość połówkowa przejścia endotermicznego,

Parametr przejścia egzotermicznego: A – wartość egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi agregacji

Dla roztworu buforowego surowic maksimum lokalne (T_1 , Cp^{ex}_1) wykazujące największą intensywność stanowi zarazem maksimum globalne przejścia i oznaczane jest w tym rozdziale jako (T_m , Cp^{ex}_m). Wartość średnia temperatury odpowiadającej maksimum (T_m , Cp^{ex}_m) do tygodnia od ekspozycji wzrasta dla obu badanych grup próbek – dla napromienionych (o $3.5\text{ }^\circ\text{C}$) nieco bardziej niż dla kontrolnych (o $2.9\text{ }^\circ\text{C}$) w stosunku do wartości wyjściowej. Po 2 tygodniach przechowywania dla próbek kontrolnych średnia wartość T_m utrzymuje się na podobnym poziomie ($65.9 \pm 3.1\text{ }^\circ\text{C}$), natomiast dla próbek napromienionych dalej nieznacznie rośnie (o $0.6\text{ }^\circ\text{C}$, do $76,3 \pm 3.5\text{ }^\circ\text{C}$). Wykonane testy statystyczne wykazały istotne statystycznie ($p < 0.001$) przesunięcie maksimum przejścia w stronę wyższych temperatur podczas starzenia się próbek surowicy. Nie wykazano jednak istotnych różnic biorąc pod uwagę dwie badane grupy próbek (kontrolnych i napromienionych) dotyczących tego parametru w badanych trzech etapach czasowych. Wykonany test *post – hoc* Tukey’a wykazał istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami T_m pomiędzy badanymi etapami czasowymi dla: 1) próbek kontrolnych 1 dzień oraz 1 tydzień ($p = 0.04$), 2) próbek napromienionych 1 dzień oraz 1 tydzień ($p = 0.01$), 3) próbek napromienionych 1 dzień oraz 2 tygodnie ($p = 0.002$). Dwa bardziej konserwatywne testy *post – hoc* Bonferroni’ego oraz Scheffe’go wykazały istotne statystycznie zmiany pomiędzy badanymi etapami czasowymi tylko dla próbek napromienionych: 1) 1 dzień oraz 1 tydzień (Bonferroni $p = 0.02$, Scheffe $p = 0.004$), 2) 1 dzień oraz 2 tygodnie (Bonferroni $p=0.002$, Scheffe $p = 0.007$).

Wartości średnie pojemności cieplnej Cp^{ex}_m odpowiadającej temperaturze maksimum lokalnego T_m i zarazem maksimum przejścia po tygodniu przechowywania roztworów maleją nieco bardziej dla próbek kontrolnych (o $0.25 \text{ J g}^{-1}\text{C}^{-1}$) niż napromienionych (o $0.22 \text{ J g}^{-1}\text{C}^{-1}$) w odniesieniu do wartości wyjściowej. Po 2 tygodniach wartości średnie Cp^{ex}_m zarówno dla próbek kontrolnych jak i tych poddanych ekspozycji na promieniowanie X nie zmieniają się już znacząco. Przeprowadzony test nieparametryczny Friedman'a wykazał istotność statystyczną zmiany tego parametru podczas badanych etapów starzenia tylko w przypadku roztworów kontrolnych ($p = 0.02$, współczynnik zgodności Kendall'a wynosił 0.55).

Kształt uzyskiwanych krzywych DSC nie pozwalał na dokładne oznaczenie temperatury T_2 oraz pojemności cieplnej Cp^{ex}_2 odpowiadającej temperaturze maksimum lokalnego (T_2, Cp^{ex}_2) dlatego parametry dotyczące tego maksimum nie zostały zamieszczone w Tabeli 1 oraz nie została wykonana analiza statystyczna.

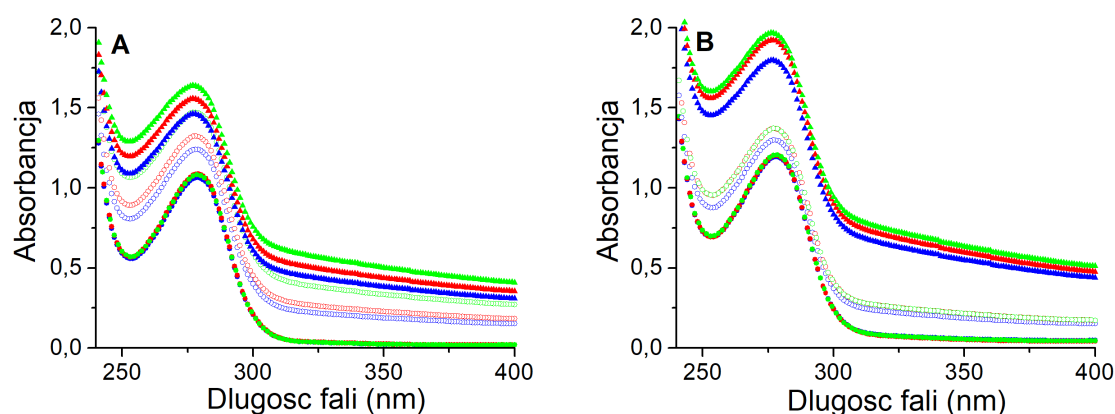
Średnia wartość entalpii procesu termicznej denaturacji białek surowicy (ΔH) po tygodniu przechowywania próbek maleje nieco bardziej dla próbek kontrolnych (o 1.1 J g^{-1}) niż napromienionych (o 0.7 J g^{-1}), ale przy dużych wartościach odchylenia standardowego (odpowiednio 3.8 i 3.7 J g^{-1}). Po 2 tygodniach średnie wartości ΔH obu typów próbek pozostają na zbliżonym poziomie. Nie wykazano istotności statystycznej zmian tego parametru w czasie, ani różnic pomiędzy próbkami napromieniowanymi i kontrolnymi.

Wartość szerokości połówkowej (HHW) przejścia w połowie wysokości piku nieznacznie wzrasta wraz z procesem starzenia się roztworów surowicy, biorąc pod uwagę zarówno próbki kontrolne jak i napromienione. Istotność zmian wartości średnich HHW w czasie dla wszystkich badanych próbek potwierdziła wykonana analiza wariancji ANOVA ($p = 0.005$). Nie wykazano jednak istotnych różnic biorąc pod uwagę dwie badane grupy próbek ($p = 0.8$). Wykonany test *post – hoc* NIR pokazuje istotność zmian tego parametru w badanych etapach czasowych pomiędzy: 1) próbką kontrolną 1 dzień oraz 1 tydzień ($p = 0.01$), 2) próbką kontrolną 1 dzień oraz 2 tygodnie ($p = 0.02$), 3) próbką kontrolną 1 dzień oraz napromienioną 1 tydzień ($p = 0.02$), 4) próbką kontrolną 1 dzień oraz napromienioną 2 tygodnie ($p = 0.01$).

Średnia wartość egzotermicznego efektu cieplnego (A) towarzyszącego procesowi agregacji ulega zwiększaniu w miarę prowadzenia badań starzeniowych dla obu badanych grup próbek. Po tygodniu przechowywania próbek następuje większy wzrost wartości średniej A dla próbki napromienionej (o $6.0 \pm 7.1 \text{ J g}^{-1}$) niż dla kontrolnej (o $3.2 \pm 4.0 \text{ J g}^{-1}$) w stosunku

do wyjściowej. Po 2 tygodniach tendencja zmian średniej wartości A dla badanych próbek jest taka sama – dla napromienionej wartość średnia A wzrasta o 16 J g^{-1} natomiast dla kontrolnej o 13.7 J g^{-1} . Istotność statystyczna zmian parametru A w obu badanych grupach próbek została potwierdzona poprzez wykonany nieparametryczny test Friedmana (próbki kontrolne $p = 0.001$, próbki napromienione $p = 0.004$). Wysokie wartości współczynnika zgodności Kendall'a (próbki kontrolne $p = 0.93$, próbki napromienione $p = 0.79$) w obu badanych grupach próbek sugerują wysoki stopień podobieństwa zmian parametru A odzwierciedlającego stopień starzenia się poszczególnych próbek roztworów surowic.

Szybsze starzenie się roztworów surowicy poddanych ekspozycji na promieniowanie rentgenowskie potwierdziły także wyniki badań spektrofotometrycznych. Rysunek IV. 23 przedstawia zestawienie widm absorpcyjnych UV VIS ilustrujących zmiany zachodzące w czasie dla dwóch przykładowych roztworów buforowych surowicy poddanych działaniu promieniowania X. W przypadku obu badanych roztworów wyjściowe widma dla próbek kontrolnych oraz tych poddanych działaniu promieniowania X (dawki 5 Gy i 10 Gy), zmierzonych w krótkim czasie (do 20 godzin) po ekspozycji na promieniowanie pokrywają się – kształt widm w całym badanym zakresie jest taki sam. Po tygodniu, a następnie po 2 tygodniach przechowywania roztworów w warunkach chłodniczych, następuje podwyższenie absorpcji w całym badanym zakresie – znacznie bardziej zaawansowane dla próbek napromienionych niż kontrolnych.



Rysunek IV.23 A, B. Widma absorpcyjne dwóch roztworów buforowych surowicy pochodzącej od dwóch ochotników (A i B), gdzie: ● próbka kontrolna, ● próbka napromieniona dawką 5 Gy, ● próbka napromieniona dawką 10 Gy, ○ próbka kontrolna po tygodniu przechowywania, ○ próbka napromieniona dawką 5 Gy po tygodniu przechowywania, ○ próbka napromieniona dawką 10 Gy po tygodniu przechowywania, ▲ próbka kontrolna po 2 tygodniach, ▲ próbka napromieniona dawką 5 Gy po 2 tygodniach, ▲ próbka napromieniona dawką 10 Gy po 2 tygodniach.

Porównanie przykładowych widm zilustrowanych na Rysunku IV.A i B wskazuje, że zarówno zmiany czasowe roztworów surowicy jak i zależność tych zmian od wielkości zastosowanej dawki promieniowania są osobniczo zmienne. W przypadku zilustrowanym na Rysunku IV.23 A już po tygodniu przechowywania roztworu surowicy wyraźnie widoczna jest różnica pomiędzy dawkami 5 Gy i 10 Gy. Efekt dawki 10 Gy jest tak duży, że widmo roztworu, który ją otrzymał pokrywa się z widmem dla roztworu kontrolnego przechowywanego 2 tygodnie. Po 2 tygodniach starzenia się roztworów różnica pomiędzy dawkami 5 Gy i 10 Gy zmniejsza się, ale nadal pozostaje. Po tygodniu przechowywania, na widmach absorpcyjnych, przedstawionych na Rysunku IV.23 A, wyraźnie uwidacznia się różnica absorpcji w całym mierzonym zakresie pomiędzy próbkami kontrolną oraz napromienionymi (dawki 5 Gy i 10 Gy). Pomiar spektrofotometryczny próbki napromienionej dawką 10 Gy wskazuje na większą absorpcję promieniowania z zakresu UV-VIS niż w przypadku próbki napromienionej dawką 5 Gy, oraz znacznie większą niż dla odpowiadającej jej próbki kontrolnej. Dłuższy czas przechowywania roztworów nie wpływa znacząco na różnice obserwowanych widm absorpcyjnych względem rodzaju próbki. Widma próbek napromienionych dawkami 5 Gy i 10 Gy widoczne na Rysunku IV.23 B po tygodniu mają wyższą absorpcję w całym badanym zakresie niż widmo odpowiadającej im próbki kontrolnej, natomiast nie wykazują różnic pomiędzy sobą. Dopiero po 2 tygodniach przechowywania roztworów, uwidacznia się nieznacznie wyższa absorpcja w całym zakresie pomiarowym dla próbki poddanej działaniu wyższej dawki promieniowania (10 Gy) w stosunku do napromienionej dawką niższą (5Gy).

Dla opisu zmian w pasmie 250 – 300 nm, pochodzącym od aminokwasów aromatycznych (tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny) zmierzono wartości absorpcji w jego maksimum (przy około 278 nm) i minimum (przy około 253 nm) oraz wyznaczono stosunek tych wartości (Tabela IV.9). Zmętnienie roztworów surowicy w trakcie starzenia się, z powodu postępującej agregacji białek, oceniono na podstawie rosnącej wartości absorpcji przy długości fali 320 nm (Tabela IV.9, zamieszczona na kolejnej stronie).

Tabela IV.9. Wartości stosunku absorpcji w maksimum lokalnym pasma absorpcji przy długościach fali 278 nm i minimum lokalnym przy 253 nm (A_{max}/A_{min}) oraz wartość absorpcji przy długości fali 320 nm (A_{320}) na widmach UV-VIS buforowych roztworów surowicy: kontrolnych (k), napromienionych dawką 5 Gy (n 5 Gy) oraz napromienionych dawką 10 Gy (n 10 Gy) promieniowania rentgenowskiego.

Próbka	Czas	Rodzaj próbki	A_{max}/A_{min}	A_{320nm}
Rys. A	wyjściowe	k	0,511	0,038
		n 5 Gy	0,511	0,038
		n 10 Gy	0,511	0,038
	1 tydzień	k	0,435	0,226
		n 5 Gy	0,433	0,271
		n 10 Gy	0,407	0,393
	2 tygodnie	k	0,373	0,448
		n 5 Gy	0,359	0,509
		n 10 Gy	0,350	0,582
Rys. B	wyjściowe	k	0,507	0,078
		n 5 Gy	0,507	0,078
		n 10 Gy	0,507	0,078
	1 tydzień	k	0,424	0,227
		n 5 Gy	0,419	0,262
		n 10 Gy	0,419	0,262
	2 tygodnie	k	0,344	0,648
		n 5 Gy	0,364	0,703
		n 10 Gy	0,368	0,743

Stosunek absorpcji przy długości fali 278 nm i 253 nm wskazuje jasno, że wraz z postępującym starzeniem się badanych roztworów następuje zmniejszenie tego parametru. Wartość stosunku A_{max}/A_{min} dla próbek napromienionych w odniesieniu do próbek kontrolnych jest mniejszy po jednym i dwóch tygodniach przechowywania

dla obu przedstawionych przykładowych roztworów surowicy krwi ludzkiej. Obserwowany spadek wartości parametru A_{\max}/A_{\min} świadczy o zmianach absorpcji światła przez chromofory aminokwasów aromatycznych na skutek zmian strukturalnych w białkach. Podobny efekt obserwowano w przypadku destrukcyjnego działania na albuminę surowicy promieniowania z zakresu UVC [Michnik et al. 2008, Artyukhov et al. 2001]. Parametr A_{320} potwierdza większy stopień zmętnienia badanych próbek analizowanych po czasie w stosunku do próbek świeżych – wartości odczytane z widm wzrastają wraz z czasem przechowywania roztworów. Dodatkowo wyraźnie podkreśla również różnice pomiędzy próbkami napromienionymi w odniesieniu do kontrolnych – roztwory kontrolne są mniej zmienione, mniej zmętniałe w stosunku do napromienionych. W przypadku roztworu przedstawionego na Rys. IV.23 A wartości $A_{320\text{nm}}$ są zawsze większe dla próbek napromienionych dawką wyższą (10 Gy) niż dawką niższą (5 Gy).

IV.3.4. Podsumowanie

Porównanie wszystkich zaprezentowanych na Rysunkach IV.12 – IV.22 różnic pomiędzy profilami DSC próbek kontrolnych i napromienionych wskazuje jednoznacznie na szybciej zachodzący proces starzenia się roztworu ekspozowanego na promieniowanie neutronowe niż kontrolnego. Wyniki eksperymentu z wyższą dawką promieniowania neutronowego (13 Gy) pokazują silniejszy wpływ na roztwory surowicy krwi ludzkiej niż ten pochodzący od dawki 5 Gy. Należy jednak wziąć pod uwagę odpowiednio dłuższy czas ekspozycji próbki poza warunkami chłodniczymi do uzyskania wyższej dawki, co powoduje duże trudności w porównaniu wprost widocznych efektów.

Efekty długofalowego wpływu promieniowania rentgenowskiego uwidaczniają się na krzywych DSC napromienionych wodnych roztworów surowic w porównaniu do roztworów kontrolnych dopiero po 2 - 3 tygodniach przechowywania. W przypadku buforowych roztworów surowicy zmiany w kształcie profili DSC próbek napromienionych i kontrolnych najczęściej widoczne są już po tygodniu przechowywania. Jednakże dalsze zmiany polegają głównie na intensyfikacji niskotemperaturowego przejścia egzotermicznego. Wykonane pomiary sugerują brak wyraźnych różnic pomiędzy profilami DSC roztworów napromienionych dawką 5 Gy oraz 10 Gy. Wyraźną zależność obserwowanych efektów od zadanej dawki można zaobserwować na krzywych DSC roztworów poddanych działaniu dawek od 30 Gy wzwyż – zmiany uwidaczniają się po 3 tygodniach przechowywania roztworu (Rys. IV.21).

V. DYSKUSJA

V.1. Wprowadzenie

W celu obserwacji możliwych efektów wpływu promieniowania jonizującego na białka surowicy krwi ludzkiej badania prowadzono z użyciem dwóch rodzajów promieniowania (neutronowe, rentgenowskie) oraz kilku wybranych wartości dawek (5, 10, 13, 30, 70, 120 Gy).

Prowadzone od wielu lat badania DSC białek, głównie pochodzenia wołowego, w kontekście badań związanych z przetwórstwem, sterylizacją, przechowywaniem żywności, wykazują wyraźnie widoczne skutki działania promieniowania jonizującego na te makrocząsteczki dopiero przy dawkach rzędu od kilku do kilkudziesięciu kGy [Fessas et al. 1998, Cieśla et al. 2004, 2010]. Wyniki wcześniejszych badań DSC wpływu mniejszych dawek promieniowania jonizującego na frakcję α , β - globulin ludzkich pokazały, że dopiero dawka 100 Gy promieniowania X zmienia krzywe DSC tych białek w zauważalny sposób [Michnik et al. 2013]. Jednakże już przy ekspozycji roztworów surowic krwi ludzkiej na dawkę 0.5 Gy promieniowania neutronowego, zaobserwowano przyspieszony proces starzenia się próbek napromienionych w porównaniu z próbkami kontrolnymi [Michnik et al. 2016]. Wyniki badań sugerowały, że użycie wyższych dawek promieniowania niż zastosowane wcześniej przez Michnik et al. 2016, może dostarczyć istotnych informacji o możliwych bezpośrednich oraz długofalowych efektach wpływu promieniowania na białka surowicy krwi ludzkiej.

V.2. Trudności w porównaniu efektów działania promieniowania X oraz neutronowego na roztwory surowicy krwi

Ekspozycja na wysokie dawki promieniowania jonizującego może powodować fragmentację białek (rozerwanie łańcucha polipeptydowego), a także wpłynąć na konformacje białek. W przypadku białek w formie stałej może zachodzić degradacja białka poprzez zerwanie wiązań w układach pierścieniowych oraz wiązań peptydowych. W przypadku roztworów białek należy również wspomnieć o zachodzącym procesie radiolizy wody – będzie ona zależna od LET użytego promieniowania oraz od pH rozpuszczalnika [IAEA 2010]. Wolne rodniki powstające na skutek oddziaływania promieniowania jonizującego

z cząsteczkami rozpuszczalnika mogą uszkadzać strukturę białek i powodować utlenianie trójwartościowych dla funkcjonowania protein aminokwasów [Smeltzer et al. 2015, Vergara et al. 2018, Schaden et al. 2018]. Wytworzenie kowalencyjnych wiązań poprzecznych w efekcie utlenienia grup – SH, i wytworzenia wiązań – S – S – może powodować polimeryzację białek. Ekspozycja *in vitro* na promieniowanie jonizujące może też skutkować agregacją.

Trudności pojawiające się przy próbie porównania efektów takiej samej dawki obydwu rodzajów promieniowania jonizującego związane są zarówno z odmienną naturą promieniowania X i neutronowego (podstawową wielkością, która je różnicuje jest LET) jak i czynnikami eksperymentalnymi. Ze względu na znacznie mniejszy LET fotonów w porównaniu z neutronami, ich spodziewany wpływ powinien być mniejszy niż neutronów przy tej samej dawce. Dodatkowo oba rodzaje promieniowania oddziałują w nieco inny sposób z materią. Zgodnie z faktami opisanymi w Rozdziale II.3, w przypadku ekspozycji *in vitro* surowicy krwi ludzkiej na promieniowanie X z największym prawdopodobieństwem zachodzić będzie głównie efekt Comptona. Promieniowanie oddziałujące z cząsteczkami białek, czy też rozpuszczalnika, nie będzie przekazywać całej swojej energii na oddziaływanie z cząsteczkami białek / wody (buforu). Część energii jaka zostanie zdeponowana w badanym roztworze zostanie spożytkowana na zachodzący równocześnie proces radiolizy wody. Średnia droga swobodna przy oddziaływaniu fotonów z materią jest zasadniczo większa, niż ciężkich cząstek jonizujących, więc gęstość przekazu energii jest mniejsza. Zatem prawdopodobieństwo przekazu przez fotony ilości energii wystarczającej do zmian konformacyjnych białek będzie mniejsze, niż w przypadku ciężkich cząstek. Natomiast przy użyciu promieniowania neutronowego spodziewane efekty działania tego typu promieniowania na roztwory surowicy powinny być większe. Względna skuteczność biologiczna RBE neutronów jest znacznie wyższa niż fotonów. Neutrony mają znacznie większą niż fotony zdolność przekazania w jednym akcie oddziaływania, energii na tyle wysokiej żeby przerwać wiązanie i uszkodzić strukturę białek. Potrzebują one natomiast znacznie wyższej energii, żeby dotrzeć na tą samą głębokość w wodzie / tkance niż fotony. Wraz z długością drogi oddziaływania neutronów w materii, zmieniają się zasadniczo typy oddziaływań tych cząstek z materią. Zmienia się w rezultacie wartość porcji przekazywanej energii i prawdopodobieństwo zajścia danego typu interakcji.

Porównanie efektów działania promieniowania neutronowego oraz rentgenowskiego jest trudne ze względu na niemożliwość zachowania takich samych czasów ekspozycji dla uzyskania określonej dawki. Czas ekspozycji roztworów surowicy na promieniowanie

neutronowe był znacząco dłuższy niż w przypadku wykorzystania promieniowania X. Roztwory przebywały kilkadziesiąt godzin w temperaturze pokojowej, co powodowało widoczne na profilach DSC zmiany starzeniowe próbki napromienionej i kontrolnej nawet tuż po zakończeniu ekspozycji. Przedstawione wyniki wpływu promieniowania neutronowego wyraźnie wskazują na silne powiązanie i nakładanie się efektów napromieniowania i starzenia się roztworów. W przypadku promieniowania X emitowanego przez akcelerator, czasy ekspozycji są krótkie nawet przy zadanej stosunkowo wysokiej dawce, np. dla najwyższej zastosowanej dawki 120 Gy czas ekspozycji dla dwóch pól wyniósł ok. 50 minut. Niemożliwa jest więc obserwacja procesów starzenia się na tym samym etapie dla roztworów surowic eksponowanych na promieniowanie X lub neutronowe.

V.3. Efekty bezpośrednie

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały, że w przypadku promieniowania neutronowego, bezpośrednio po ekspozycji na dawkę 5 Gy dostrzegalna jest różnica pomiędzy krzywymi DSC napromieniowanych i kontrolnych roztworów surowicy. Dla próbek wystawionych na działanie promieniowania X, nie zaobserwowano przy takiej samej dawce różnic pomiędzy krzywymi próbek eksponowanych i kontrolnych, zarejestrowanymi zaraz po zakończeniu procesu napromienienia. Takiego efektu należało się spodziewać biorąc pod uwagę stosunkowo niski LET promieniowania X oraz sposób oddziaływania fotonów z materią. Promieniowanie neutronowe, jako bardziej skuteczne biologicznie, już przy użytej dawce 5 Gy, w dostrzegalny eksperymentalnie sposób, wpływa na białka zawarte w badanym roztworze. Pozostaje jednak pewna wątpliwość, czy zinterpretowany jako bezpośredni, efekt dawki 5 Gy promieniowania neutronowego nie jest już efektem związanym ze starzeniem się roztworów surowicy podczas długiego czasu ekspozycji.

W celu zaobserwowania jakichkolwiek bezpośrednich efektów na profilach DSC roztworów surowic poddanych działaniu promieniowania X należało użyć dawki 30 Gy i wyższych. Stosując oba rodzaje promieniowania, dalsze zwiększanie dawki powoduje pogłębianie się widocznych efektów na krzywych DSC badanych roztworów. Zmiana w kształcie profilu surowic poddanych działaniu promieniowania X, zachodzi tylko w obrębie przejścia endotermicznego. Na krzywych DSC nie są obserwowane żadne przejścia egzotermiczne. Natomiast profile DSC roztworów eksponowanych na neutrony

oraz ich roztworów kontrolnych zmieniają swój kształt w całym zakresie temperaturowym. Dodatkowo, w zakresie niskotemperaturowym pojawia się przejście egzotermiczne, bardziej intensywne na krzywych DSC próbki, gdzie zastosowano wyższą dawkę promieniowania (13 Gy). Efekt związany z postępującym w próbce procesem egzotermicznym może być w największym stopniu związany z długim czasem ekspozycji w temperaturze pokojowej. Przedstawione dane pokazują, że trudno oddzielić bezpośrednie efekty napromieniowania od tych, które modyfikują proces starzenia się roztworów surowicy.

V.4. Przyspieszone procesy starzenia roztworów surowicy krwi jako efekt długofalowy wpływu promieniowania jonizującego

Obserwowane efekty długofalowe wpływu promieniowania jonizującego na roztwory surowic wydają się mieć taką samą naturę niezależnie od zastosowanego rodzaju promieniowania. Z upływem czasu, na krzywych DSC surowic ekspozowanych na promieniowanie neutronowe (dawka 5 Gy), w stosunku do roztworów kontrolnych, widoczne są coraz bardziej zaawansowane zmiany starzeniowe objawiające się w całym analizowanym zakresie temperaturowym. Skutkiem ekspozycji *in vitro* na promieniowanie jonizujące jest więc przyspieszenie procesu starzenia się napromienionych roztworów surowicy. Użycie wyższej dawki promieniowania neutronowego (dawka 13 Gy) skutkuje intensyfikacją zmian widocznych na profilach DSC, zarówno dla próbek kontrolnych jak i napromienionych. Rezultatem ekspozycji roztworów na dawkę 13 Gy jest dalej bardziej zaawansowany proces starzenia się próbki napromienionej w odniesieniu do kontrolnej niż to było w przypadku użycia dawki 5 Gy. W przypadku użycia fotonów, efekt długofalowy związany z wielkością dawki promieniowania był słabo widoczny lub nie ujawniał się na krzywych DSC przy porównaniu wyników dla roztworów surowic ekspozowanych na dawki 5 Gy i 10 Gy. Udało się go zaobserwować dopiero dla dawek od 30 Gy wzwyż.

Przeprowadzone spektrofotometryczne badania roztworów surowicy poddanych działaniu promieniowania jonizującego potwierdziły szybsze starzenie się napromienionych próbek surowicy w stosunku do kontrolnych. Wartości parametru $A_{278\text{nm}}/A_{251\text{nm}}$, świadczące o zmianach absorpcji światła przez chromofory aminokwasów aromatycznych na skutek zmian strukturalnych w białkach, malały w czasie i zawsze były niższe na danym etapie starzenia się dla ekspozowanych na promieniowanie roztworów

surowic niż dla kontrolnych. Mierzony przy 320 nm wzrost absorbancji w okresie starzenia się próbek był także bardziej intensywny dla roztworów surowicy poddanych działaniu promieniowania jonizującego wskazując na ich większe zmętnienie z powodu postępującej agregacji białek niż w przypadku odpowiednich próbek kontrolnych.

Efekty oksydacyjne

W trakcie obserwacji czasowych, wszystkie badane roztwory wykazały różnice w kształcie profili DSC próbek kontrolnych w odniesieniu do tych wystawionych na działanie promieniowania jonizującego. Biochemiczne przemiany toczące się podczas starzenia roztworów surowicy krwi zatem najprawdopodobniej uległy wzmożeniu w wyniku narażenia na promieniowanie jonizujące. Najliczniej występujące modyfikacje białek będą wiązały się z różnorodnym procesem oksydacji. Należy pamiętać, że istnieje szereg rodzajów oksydantów, pochodzących z różnych źródeł (np. powstających podczas radiolizy wody), mających odmienny charakter. Efektem oddziaływania oksydantów czy wolnych rodników tlenowych (najczęstszy przypadek) z molekułami białek mogą być zarówno odwracalne, jak i nieodwracalne uszkodzenia ich struktury. Reaktywne formy tlenu (ROS – *reactive oxygen species*) mogą poprzez oddziaływanie z molekułami cukrów czy lipidów, generować zmienione formy tych związków, które w efekcie będą oddziaływać na białka. Utlenianiu mogą podlegać zarówno łańcuchy polipeptydowe, jak i łańcuchy boczne reszt aminokwasowych. Aminokwasy aromatyczne są najbardziej narażone na nieodwracalne zmiany oksydacyjne [Berlett et al. 1997, Levine et al. 2001]. Podczas utleniania do łańcuchów bocznych białek mogą być dołączane grupy karbonylowe lub hydroksylowe. Proces oksydacji może również prowadzić do oligomeryzacji i agregacji białek zawartych w roztworze [Richardson et al. 2014]. Utlenianie białek podczas zachodzących procesów starzeniowych jest powszechnie znanym i badanym aspektem [Friguet et al. 2000, Szweda et al. 2002, Beal et al. 2002, Petropoulos et al. 2006, Stadtman et al. 2006, Humphries et al. 2006, Chudzik et al. 2016, Maciążek-Jurczyk et al. 2018]. Zmienione oksydacyjnie białka, ich fragmenty lub agregaty, głównie albuminy, lipoproteiny i fibrynogen, mogą być nazywane zaawansowanymi produktami utleniania białek (AOPP – *advanced oxidation protein products*).

W ramach badań prowadzonych do niniejszej pracy wykazano zmiany absorbancji na widmach roztworów surowic starzejących się. Dodatkowo różnice na widmach absorpcyjnych przejawiały się też przy porównaniu widm próbek kontrolnych i napromienionych. Zmiany oksydacyjne, wpływające w stopniu największym

na aminokwasy aromatyczne, poskutkowały zmianą struktury białek zawartych w roztworach, co technika spektrofotometryczna zdołała wychwycić. Podobne efekty rozważano w pracy Maciążek-Jurczyk et al. – zmiany oksydacyjne albuminy ludzkiej spowodowały identyczne efekty widoczne na widmach absorpcyjnych UV-VIS roztworów albuminy jak w przypadku widm starzeniowych badanych surowic w niniejszej pracy [Maciążek-Jurczyk et al. 2021]. Po oddziaływaniu promieniowania jonizującego z roztworami surowicy, na skutek radiolizy wody postępujące procesy oksydacji zostały wzmożone, co miało najprawdopodobniej znaczący wpływ na obserwowane różnice w wynikach zarówno spektrofotometrycznych jak i kalorymetrycznych.

Kumulacja oksydacyjne uszkodzonych białek jest cechą wielu chorób czy patologii, w szczególności chorób neurodegeneracyjnych, jak choroby Alzheimera czy Parkinsona, nowotworów czy cukrzycy [Beal et al. 2007]. Najpowszechniej podczas oksydacji dochodzi do przyłączenia grup karbonylowych do łańcuchów bocznych argininy, treoniny, lizyny i proliny [Requena et al. 2003]. Wykrycie zmian karbonylacyjnych przy pomocy 2,4-dinitrofenylohydrazyny może być użyte jako metoda do sprawdzenia stopnia oksydacji białek, która została zaproponowana przez Stadtman i Levine w ich pionierskich pracach dotyczących oksydacyjnych zmian białek [Beal et al. 2007, Dalle-Donne et al. 2003]. Zaawansowane produkty utleniania białek AOPP są wykorzystywane jako markery stresu oksydacyjnego oraz oksydacyjnego uszkodzenia białek [Piwowar et al. 2007, Grzebyk et al. 2016, Suzuki et al. 2016, Kokot et al. 2021]. Często zmiany oksydacyjne mogą być przyczyną lub konsekwencją danego schorzenia, co stało się przedmiotem szczegółowych badań już na przełomie XX i XXI wieku [Smith et al. 1991, Lih-Brody et al. 1996, Berlett et al. 1997, Dominguez et al. 1998, Fu et al. 1998, Levine et al. 2001, Stadtman et al. 2001]. W wielu badaniach kalorymetrycznych zmiany obserwowane na profilach DSC roztworów osocza / surowicy krwi ludzkiej noszą cechy podobne do cech starzeniowych. Przeprowadzone badania przez Michnik et al. 2018 pokazały, zmiany w profilach DSC roztworów buforowych surowicy osób chorych na Parkinsona w stosunku do grupy kontrolnej, bardziej zaawansowane im bardziej był zaawansowany stopień choroby. Zmiany widoczne na profilach DSC surowic osób chorych noszą charakter podobny do zmian starzeniowych – w roztworach buforowych (pH 7.4) najbardziej znaczącym objawem jest spadek intensywności maksimum przejścia endotermicznego (przy temperaturze ok. 63 °C) z jednoczesnym wzrostem intensywności maksimum lokalnego (lub ramienia) przy około 70 °C.

Badania Michnik et al. surowicy krwi ludzkiej, pobranej od ultramaratończyków dostarczyły efektów niespotykanych do tej pory przy badaniach kalorymetrycznych surowicy sportowców [Michnik et al. 2021B]. Na krzywych DSC roztworów surowic ujawniły się po ukończeniu 12-godzinnego biegu znaczne zmiany w kształcie złożonego przejścia endotermicznego. Co ciekawe, zmiany te nosiły charakter zmian starzeniowych, bardzo podobnych do zmian obserwowanych podczas badań do niniejszej pracy. Przyjmuje się, że intensywne ćwiczenia fizyczne mogą prowadzić do zwiększonego poboru tlenu, wywołania stresu oksydacyjnego, do powstawania reaktywnych form tlenu, a nawet wystąpienia odpowiedzi ostrej fazy [Mastaloudis et al. 2001, Fallon 2001, Imai et al. 2002, Finaud et al. 2006, Lamprecht et al. 2008, Park et al. 2016]. Uzyskane efekty widoczne na krzywych DSC są bardzo intensywne. Należy jednak wziąć pod uwagę, że wysiłek podjęty podczas ultramaratonu jest również ekstremalnie intensywny. Levey et al. wykazali, że podczas tak dużego wysiłku zwiększa się akumulacja nitrotyrozyny oraz wzmagają się procesy karbonylacyjne białek zawartych w moczu i osoczu [Levey et al. 2005]. Prawdopodobnie także po ekspozycji na promieniowanie jonizujące, z czasem silnie wzmagają się procesy oksydacyjne, co widoczne jest pod postacią bardzo zmienionego w kształcie przejścia endotermicznego. Najciekawszym, być może najważniejszym, aspektem różnicującym wyniki DSC otrzymane dla uczestników ultramaratonu w kontekście tych przedstawionych w niniejszej pracy, jest brak niskotemperaturowego przejścia egzotermicznego (zinterpretowanego tutaj jako agregacja pewnej frakcji białek) na profilach DSC surowicy ultramaratończyków. Sugeruje to silny związek tego przejścia ze starzeniem się roztworów surowicy i procesem prawdopodobnie niezależnym od zjawisk determinujących w tym samym czasie modyfikacje przejścia endotermicznego.

Efekty glikacyjne

Oprócz zmian oksydacyjnych, warto wziąć również pod uwagę proces glikacji, który może zostać przyspieszony przez oddziaływania z wolnymi rodnikami oraz reaktywnymi formami tlenu (ROS) powstałymi na skutek oddziaływania promieniowania jonizującego z roztworami surowicy. Najszybciej w wyniku reakcji cukrów z białkami, poprzez utworzenie wiązań między grupami aminowymi i karbonyłowymi, powstają tzw. zasady Schiffa czyli aldiminy. Stan równowagi po zajściu takiej reakcji jest bardzo szybki, ponieważ osiągany po zaledwie kilku godzinach. Następnie, po kilku tygodniach, następuje przegrupowanie Amadoriego, po którym stan równowagi

układu ustala się po 28 dniach od zajścia reakcji. Powstałe w taki sposób produkty odwracalne nazywane są wczesnymi produktami glikacji. Następnie mogą one ulec procesom oksydacji, dehydratacji czy innych reakcji, czego rezultatem jest formowanie tzw. końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE) [Frolov et al. 2010, Bodiga et al. 2013, Grzebyk et al. 2013, Bohlooli et al. 2014, Thornalley et al. 2014, Maciążek-Jurczyk et al. 2018]. Liczne transformacje takiego typu powodować będą powstawanie w rezultacie bardziej reaktywnych związków tj. reaktywne formy tlenu (ROS), rodniki organiczne lub związki diakarbonyłowe [Warwas et al. 2010]. Zaawansowane produkty końcowe glikacji (AGE) mogą również powodować sieciowanie łańcuchów peptydowych, co może skutkować modyfikacjami właściwości chemicznych białek [Hadley et al. 2001, Urios et al. 2007, Maciążek-Jurczyk et al. 2018]. Proces nieenzymatycznej glikacji zachodzi w organizmie człowieka w warunkach naturalnych i uszkodzone białka są na bieżąco usuwane poprzez degradację w proteasomach, nie wymagając przeprowadzania ubiquitynacji. Pobierając krew do badań należy więc pamiętać, że w składzie uzyskanej surowicy mogą występować produkty z różnych etapów glikacji. Produkty te mogą ulegać dalszym przemianom glikacyjnym czy oksydacyjnym ale ich degradacja w warunkach *in vitro* będzie najprawdopodobniej niemożliwa.

Próbując zinterpretować różnice ujawniające się na profilach DSC roztworów surowic eksponowanych na promieniowanie jonizujące oraz odpowiadających im roztworów kontrolnych w kontekście przebiegającego w próbkach procesu glikacji należy wziąć pod uwagę rozpiętość czasową reakcji Maillarda. Należy też pamiętać, że AGE mogą być obecne już w świeżych próbkach surowicy, ale ich ilość będzie stosunkowo mała, choć zwiększać się będzie z naturalnie postępującym procesem starzenia badanych próbek. Jeśli promieniowanie jonizujące wzmaga tempo procesu glikacji, to efektów na profilach DSC próbek napromienionych należałoby się spodziewać po kilku tygodniach od ekspozycji, ponieważ tyle czasu potrzeba, aby zostało wytworzone więcej końcowych produktów glikacji. Przeprowadzone badania roztworów starzejących się potwierdzają, że próbki napromienione są na dalszych etapach starzenia niż odpowiadające im próbki kontrolne, pomimo wykonania pomiarów kalorymetrycznych po takim samym czasie przechowywania. Zmiany ujawniają się w kształcie profili DSC badanych próbek, więc można by domniemywać, że niektóre białka zawarte w badanych roztworach uległy najprawdopodobniej przemianom prowadzącym do zmiany ich konformacji.

Efekty związane z wiązaniem ligandów

W trakcie procesu starzenia w obszarze przejścia denaturacyjnego surowic wyraźnie zanika wkład od procesu denaturacji nieligandowanych albumin przy ok. 57 °C. Powszechnie znane jest, że albumina surowicy ludzkiej jest białkiem bardzo łatwo wiążącym się z różnymi ligandami [Minami et al. 2014, Gorobets et al. 2017, 2019, Musante et al. 2006]. Albumina jako frakcja białek występująca w surowicy w największej ilości będzie też w znacznym stopniu decydować o kształcie krzywej DSC surowicy. Albumina surowicy krwi ludzkiej związana z niektórymi ligandami może denaturować w wyższym zakresie temperatur, niż albumina nieligandowana, co omówiono w Rozdziale II.2.4 tej pracy. Dodatkowo albumina surowicy ludzkiej ma wysoką zdolność do reagowania z reaktywnymi formami tlenu (ROS). Badania roztworów buforowych albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA) przeprowadzone przez Gorobets et al. pokazały silną zależność obserwowanych kształtów profili DSC albuminy od stężenia ozonu. Wraz ze wzrostem utlenienia albuminy obserwowane [było na krzywych DSC znaczne zmniejszenie intensywności maksimum przejścia endotermicznego [Gorobets et al. 2017]. Liczne badania białek surowicy krwi z przyłączonymi ligandami wykazały, że przejście endotermiczne albuminy z ligandami przesuwają się w stronę wyższych temperatur (temperatura maksymalna przejścia rośnie) [Bohlooli et al. 2014, Arfat et al. 2014, Ajmal et al. 2017, Guglielmelli et al. 2018, Koslen et al. 2019, Gan et al. 2021].

Odnosząc się do wyników przedstawionych w niniejszej pracy, przesunięcie maksimum przejścia endotermicznego w kierunku wyższych temperatur podczas procesu starzenia można prawdopodobnie wiązać z faktem przyłączenia do albumin ligandów. Teorię tę potwierdza fakt, że udział denaturacji termicznej albumin niezwiązanych prawdopodobnie uległ zmniejszeniu, co zaobserwowano na krzywych DSC wodnych roztworów surowic jako spadek intensywności pików przy temperaturze ok. 57 °C. Jednocześnie, widoczny był wzrost intensywności maksimum przy temperaturze od ok. 70 – 80 °C, co może być pośrednio związane ze wzrostem wkładu od procesu denaturacji albumin z ligandami.

W badaniach spektrofotometrycznych procesów glikacji przeprowadzonych przez Arfat et al. na przykładzie immunoglobulin G widoczny jest wyraźny wzrost absorbancji w całym badanym zakresie długości fali. Im wyższe było stężenie glukozy, tym efekt był wyraźniejszy [Arfat et al. 2014]. Autorzy, podobnie do autorki niniejszej pracy

wnioskują, że podwyższenie absorpcji w zakresie od ok. 300 nm do 400 nm na widmach UV-VIS może być związane z agregacją białek lub ich fragmentów.

Efekty niskotemperaturowe

Ciekawym efektem pojawiającym się podczas przeprowadzonych badań kalorymetrycznych jest fakt, że dla części roztworów buforowych ekspozycyjnych na promieniowanie X (dawki 5 i 10 Gy) już po 2 tygodniach przechowywania ujawniało się w niskich temperaturach przejście egzotermiczne znacznie bardziej zaawansowane niż dla roztworów wodnych surowicy ekspozycyjnych na neutrony (dawka 5 Gy) mierzonych po tym samym czasie (Tabele IV.6 i IV.8).

Pogłębiające się niskotemperaturowe przejście egzotermiczne obserwowane na krzywych DSC podczas badań starzeniowych próbek surowicy krwi ludzkiej widoczne było na profilach wszystkich badanych próbek. Proces ten, widoczny w niskich temperaturach pod postacią przejścia egzotermicznego, ujawniał się zawsze na profilach DSC lecz dla niektórych próbek dopiero po 2 tygodniach przechowywania. Jest to związane z dużą rolą zmienności osobniczej badanych roztworów surowicy. Istotne jest, że przejście egzotermiczne w niskich temperaturach ujawniało się na krzywych DSC każdego badanego roztworu, chociaż w nieco odmiennym czasie dla poszczególnych badanych próbek. Zawsze jednak, w tym samym czasie od momentu ekspozycji, przejście egzotermiczne było bardziej intensywne dla próbek napromienionych w porównaniu z kontrolnymi.

Występowanie na profilach DSC przejścia egzotermicznego świadczy prawdopodobnie o przebiegającym w roztworze procesie agregacji pewnej frakcji białek. Wieloletnie badania DSC białek pokazały, że najczęściej przejście egzotermiczne pojawia się na ich krzywych DSC w wysokich temperaturach, za przejściem endotermicznym. Jest ono wówczas związane z agregacją rozfałdowanych w procesie denaturacji termicznej łańcuchów polipeptydowych białek [Privalov et al. 1974, Lohner et al. 1991, Tang et al. 2007, Michnik et al. 2010]. Niedawne publikacje dotyczące badań proteomu mózgu myszy ukazały na krzywych DSC podobne efekty do tych obserwowanych w niniejszej pracy – niskotemperaturowe przejście egzotermiczne [Tenchov et al. 2017, Abarova et al. 2017]. Trudno jednak domniemywać czy pochodzenie widocznego na krzywych DSC przejścia egzotermicznego jest podobne dla białek pochodzących z mózgu myszy i białek ludzkiej krwi. W przypadku badań surowicy krwi ludzkiej przejście egzotermiczne jest nieodwracalne po ogrzaniu próbki do 50 °C, natomiast po podgrzaniu do 45 °C dla preparatu mózgu myszy jest ono odwracalne

[Tenchov et al. 2017 Rys. 3]. Starzenie się badanych roztworów i/lub ich ekspozycji na promieniowanie jonizujące może prowadzić do osłabienia wiązań stabilizujących strukturę białek co jest kolejnym ważnym aspektem do rozważenia w kontekście występowania niskotemperaturowych procesów egzotermicznych. Zmiany struktury mogą prowadzić w kierunku nieuporządkowania, zmian stabilności termicznej i odmiennego zachowania termicznego białek zawartych w badanych roztworach.

V.5. Podsumowanie

Wyniki mikrokalorymetryczne potwierdzają podobieństwo biologicznych skutków oddziaływania promieniowania jonizującego na białka surowicy do procesów starzenia białek. Biorąc pod uwagę procesy glikacji, oksydacji, hydratacji, fragmentacji, sieciowania i inne, które normalnie będą zachodzić w roztworze surowicy, ocena efektu promieniowania może być trudna. Wspomniane procesy mogą przebiegać inaczej, lub w innym tempie, dla starzejących się surowic ludzkich, w porównaniu z surowicami ekspozycjami na promieniowanie jonizujące. Procesy oksydacji i glikacji są ze sobą ściśle powiązane, zachodzą równocześnie i mogą wpływać na siebie nawzajem. Napromieniowane próbki surowic wydają się starzeć szybciej niż próbki kontrolne, być może dlatego, że procesy związane z procesem starzenia mogą ulec przyspieszeniu po ekspozycji *in vitro* na promieniowanie rentgenowskie. Powstające w procesie radiolizy wody wolne rodniki i reaktywne formy tlenu mogą przyspieszyć intensywność procesu glikacji czy oksydacji. Zmiany obserwowane pomiędzy profilami DSC próbek surowic kontrolnych i napromieniowanych wyraźnie wskazują, że napromieniowana próbka surowicy starzeje się szybciej niż próbka kontrolna. Niezależnie od rodzaju promieniowania jonizującego wykorzystanego do napromienienia roztworów surowicy, zmiany widoczne na profilach DSC są takiej samej natury. Jednocześnie zmiany starzeniowe wzmagają się bardziej wraz z intensyfikacją wybranego czynnika – zastosowanie promieniowania o wyższym LET czy wzrost dawki wykorzystanego promieniowania.

Wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących pochodzenia widocznych zmian w kształcie profili DSC surowic jest jednak trudne i autorka może jedynie rozważyć ich przyczyny teoretycznie na podstawie zgromadzonej literatury.

VI. WNIOSKI

Bezpośredni wpływ promieniowania jonizującego na roztwory surowicy zaobserwowano na profilach DSC próbek poddanych działaniu promieniowania neutronowego o dawce 5 Gy, natomiast w przypadku promieni rentgenowskich dopiero przy dawkach promieniowania powyżej 30 Gy. Wydaje się, że obserwowane biochemiczne efekty działania promieniowania jonizującego wykazują duże podobieństwo do procesów starzeniowych. Podczas badań czasowych, zaobserwowano wyraźną tendencję do szybszego starzenia roztworów surowicy krwi ludzkiej w wyniku ich ekspozycji *in vitro* na promieniowanie jonizujące. Charakterystyczną cechą profili DSC zmienionych starzeniowo jest pojawienie się, przed przejściem endotermicznym, niskotemperaturowego przejścia egzotermicznego. Szybsze starzenie roztworów surowicy następuje niezależnie od rodzaju zastosowanego promieniowania jonizującego, czy zastosowanego rozpuszczalnika. Użycie wyższych dawek promieniowania, zarówno neutronowego jak i rentgenowskiego, wzmacnia wielkość efektów obserwowanych za pomocą techniki kalorymetrycznej, a także spektrofotometrii UV-VIS.

Przeprowadzone badania pozwalają domniemywać, że promieniowanie jonizujące wpływa bezpośrednio i pośrednio na konformację białek zawartych w roztworach. Napromienienie roztworów surowicy wzmacnia procesy, wskutek których przebiegają modyfikacje struktury białek zawartych w roztworach, np. zmiany oksydacyjne, glikacyjne, czy ogólnie – wiązania ligandów. Niemożliwe jest jednak jednoznaczne zinterpretowanie wielkości bezpośredniego wpływu promieniowania neutronowego na surowice, ponieważ nie było możliwości odseparowania efektów związanych z długim przebywaniem próbek w temperaturze pokojowej podczas ekspozycji.

Uzyskane wyniki mogą się przyczynić do wyjaśniania mechanizmów stojących za skutecznością radioterapii, co w perspektywie rozwoju radioterapii personalizowanej może okazać się szczególnie ważne, nie tylko pod względem wyboru dawki frakcyjnej ale również typu zastosowanego promieniowania jonizującego.

VII. LITERATURA

- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, Tenchov B. A novel DSC approach for evaluating protectant drugs efficacy against dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(11):2934-2941. doi:10.1016/j.bbadis.2017.07.033
- Ajmal MR, Chandel TI, Alam P, et al. Fibrillogenesis of human serum albumin in the presence of levodopa - spectroscopic, calorimetric and microscopic studies. *Int J Biol Macromol*. 2017;94(Pt A):301-308. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.10.025
- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(11):845-867. doi:10.1074/mcp.r200007-mcp200
- Antonova B, Naydenov E, Koynova R, Tumangelova-Yuzeir K, Tenchov B. Exothermic transitions in the heat capacity profiles of human cerebrospinal fluid. *Eur Biophys J*. 2020;49(3-4):231-238. doi:10.1007/s00249-020-01429-w
- Arfat MY, Ashraf JM, Arif Z, Moinuddin, Alam K. Fine characterization of glucosylated human IgG by biochemical and biophysical methods. *Int J Biol Macromol*. 2014;69:408-415. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.069
- Baccaro S, Bal O, Cemmi A, Di Sarcina I. The effect of gamma irradiation on rice protein aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry*. 2018;146:1-4. doi:10.1016/j.radphyschem.2018.01.011
- Balny C, Masson P, Heremans K. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1595(1-2):3-10. doi:10.1016/s0167-4838(01)00331-4
- Barceló F, Cerdà JJ, Gutiérrez A, et al. Characterization of monoclonal gammopathy of undetermined significance by calorimetric analysis of blood serum proteome. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120316. Published 2015 Mar 20. doi:10.1371/journal.pone.0120316
- Barceló F, Cerdà JJ, Gutiérrez A, et al. Characterization of monoclonal gammopathy of undetermined significance by calorimetric analysis of blood serum proteome. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120316. Published 2015 Mar 20. doi:10.1371/journal.pone.0120316
- Barth RF, Coderre JA, Vicente MG, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res*. 2005;11(11):3987-4002. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0035
- Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):797-803. doi:10.1016/s0891-5849(02)00780-3
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998;78(2):547-581. doi:10.1152/physrev.1998.78.2.547
- Benedict SH, Yenice KM, Followill D, et al. Stereotactic body radiation therapy: the report of AAPM Task Group 101 *Med Phys*. 2010;37(8):4078-4101. doi:10.1118/1.3438081
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33):20313-20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33):20313-20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313

- Bodiga VL, Eda SR, Veduruvalasa VD, et al. Attenuation of non-enzymatic thermal glycation of bovine serum albumin (BSA) using β -carotene. *Int J Biol Macromol.* 2013;56:41-48.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.01.030
- Bohlooli M, Moosavi-Movahedi AA, Ghaffari-Moghaddam M et al. Comparative study of thermal domains analyzing of glycated and non-glycated human serum albumin. *Thermochemica Acta.* 2014;594:24-30. doi:10.1016/j.tca.2014.08.034
- Boonyaratanakornkit BB, Park CB, Clark DS. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1595(1-2):235-249. doi:10.1016/s0167-4838(01)00347-8
- Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology, Elsevier Health Sciences, 2016.*
- Broszkiewicz R, Jaworski Z, Musiałowicz T, Smal Z, Szot Z. *Podręcznik ochrony radiologicznej. Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa 1963.*
- Bruschi M, Candiano G, Santucci L, Ghiggeri GM. Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(12):5473-5479.
doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.017
- Buchholz TA, Laramore GE, Griffin BR, Koh WJ, Griffin TW. The role of fast neutron radiation therapy in the management of advanced salivary gland malignant neoplasms. *Cancer.* 1992;69(11):2779-2788. doi:10.1002/1097-0142(19920601)69:11<2779::aid-cncr2820691125>3.0.co;2-n
- Cai W, Hong H, red. *Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools. IntechOpen; 2012. doi:10.5772/2679. ISBN 9789535103974*
- Chagovetz AA, Jensen RL, Recht L, Glantz M, Chagovetz AM. Preliminary use of differential scanning calorimetry of cerebrospinal fluid for the diagnosis of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011;105(3):499-506. doi:10.1007/s11060-011-0630-5
- Chaires JB, Garbett NC, Bennett Jenson A, Proteomic profiling method useful for condition diagnosis and monitoring, composition screening, and therapeutic monitoring. U.S. Provisional Application Ser. Nos. 2007 60/978,252 i 60/884,730.
- Chen J, Dai Q, Yang Q, et al. Therapeutic nucleus-access BNCT drug combined CD47-targeting gene editing in glioblastoma. *J Nanobiotechnology.* 2022;20(1):102. Published 2022 Mar 4.
doi:10.1186/s12951-022-01304-0
- Chen YW, Lee YY, Lin CF, et al. Compassionate Treatment of Brainstem Tumors with Boron Neutron Capture Therapy: A Case Series. *Life (Basel).* 2022;12(4):566. Published 2022 Apr 10.
doi:10.3390/life12040566
- Chudzik M, Maciążek-Jurczyk M, Pawełczak B, Sułkowska A. Spectroscopic Studies on the Molecular Ageing of Serum Albumin. *Molecules.* 2016;22(1):34. Published 2016 Dec 27.
doi:10.3390/molecules22010034
- Cieśla K, Eliasson AC. DSC studies of retrogradation and amylose–lipid complex transition taking place in gamma irradiated wheat starch. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 2007;265(1):399-405. doi:10.1016/j.nimb.2007.09.010

- Cieśla K, Salmieri S, Lacroix M, Tien CL. Gamma irradiation influence on physical properties of milk proteins. *Radiation Physics and Chemistry*. 2004;71(1-2):95-99. doi:10.1016/j.radphyschem.2004.04.068
- Cieśla K, Vansant EF. Physico-chemical changes taking place in gamma irradiated bovine globulins studied by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2010;99(1):315-324. doi:10.1007/s10973-009-0155-8
- Cooper A, Nutley MA, Wadood A. Differential scanning microcalorimetry in Harding SE, Chowdhry BZ (Eds.) *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamic and calorimetry*, Oxford University Press, New York 2000.
- Cooper BF, Sideraki V, Wilson DK, et al. The role of divalent cations in structure and function of murine adenosine deaminase. *Protein Sci*. 1997;6(5):1031-1037. doi:10.1002/pro.5560060509
- Creagh AL, Koska J, Johnson PE, et al. Stability and oligosaccharide binding of the N1 cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* endoglucanase CenC. *Biochemistry*. 1998;37(10):3529-3537. doi:10.1021/bi971983o
- Dai Q, Yang Q, Bao X, Chen J, Han M, Wei Q. The Development of Boron Analysis and Imaging in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Mol Pharm*. 2022;19(2):363-377. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.1c00810
- Dale WM, Davies JV, Gilbert CW, Keene JP, Gray LH. The formation of hydrogen peroxide by alpha-radiation in the presence of the enzyme carboxypeptidase. *Biochem J*. 1952;51(2):268-270. doi:10.1042/bj0510268
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):169-176. doi:10.1016/s1471-4914(03)00031-5 Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):797-803. doi:10.1016/s0891-5849(02)00780-3
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):23-38. doi:10.1016/s0009-8981(03)00003-2
- Danailova A, Todinova S, Dimitrova K i in. Effect of autologous stem-cells transplantation of patients with multiple myeloma on the calorimetric markers of the serum proteome. Correlation with the immunological markers. *Thermochimica Acta*. 2017;655:351-357. doi:10.1016/j.tca.2017.08.001
- Dandé Á, Kocsis B, Lőrinczy D. Thermal analysis of synovial fluids in different stages of osteoarthritis and after bacterial infections. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2020;142(2):797-808. doi:10.1007/s10973-019-09222-4
- Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*. 2016 Apr 1;473(7):805-25. doi: 10.1042/BJ20151227. PMID: 27026395; PMCID: PMC4819570.
- Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 17;1703(2):93-109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007. PMID: 15680218.
- Delom F, Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci*. 2006;4:15. Published 2006 Jul 19. doi:10.1186/1477-5956-4-15

- Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*. 1990;29(31):7133-7155. doi:10.1021/bi00483a001
- Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 1998;21(10):1736-1742. doi:10.2337/diacare.21.10.1736
- Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 1998;21(10):1736-1742. doi:10.2337/diacare.21.10.1736
- Douglas JG, Koh WJ, Austin-Seymour M, Laramore GE. Treatment of salivary gland neoplasms with fast neutron radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(9):944-948. doi:10.1001/archotol.129.9.944
- Drzazga Z, Schisler I, Poprzącki S, Michnik A, Czuba M. Serum Autofluorescence and Biochemical Markers in Athlete's Response to Strength Effort in Normobaric Hypoxia: A Preliminary Study. *BioMed Research International*. 2019;2019:1-11. doi:10.1155/2019/5201351
- Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E, Kielboń A. Whole-body cryostimulation impact on blood serum thermal denaturation profiles of cross-country skiers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2019;138(6):4505-4511. doi:10.1007/s10973-019-08766-9
- Duch K, Michnik A, Pokora I, Sadowska-Krępa E. Modification of blood serum DSC profiles by sauna treatments in cross-country skiers during the exercise cycle. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2020;142(5):1927-1932. doi:10.1007/s10973-020-10162-7
- Ezzati AO, Studenski MT. Neutron dose in and out of 18MV photon fields. *Appl Radiat Isot*. 2017;122:186-192. doi:10.1016/j.apradiso.2017.01.046
- Fallon KE. The acute phase response and exercise: the ultramarathon as prototype exercise. *Clin J Sport Med*. 2001;11(1):38-43. doi:10.1097/00042752-200101000-00007
- Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D. New possibilities of application of DSC as a new clinical diagnostic method. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2017;133(1):579-589. doi:10.1007/s10973-017-6828-9
- Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2011;108(1):149-152. doi:10.1007/s10973-011-1800-6
- Fessas D, Iametti S, Schiraldi A, Bonomi F. Thermal unfolding of monomeric and dimeric beta-lactoglobulins. *Eur J Biochem*. 2001;268(20):5439-5448. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02484.x
- Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006;36(4):327-358. doi:10.2165/00007256-200636040-00004
- Fish DJ, Brewood GP, Kim JS, Garbett NC, Chaires JB, Benight AS. Statistical analysis of plasma thermograms measured by differential scanning calorimetry. *Biophys Chem*. 2010;152(1-3):184-190. doi:10.1016/j.bpc.2010.09.007
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-254. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x

- Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:143-154. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06643.x
- Frolov A, Hoffmann R. Identification and relative quantification of specific glycation sites in human serum albumin. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(6):2349-2356. doi:10.1007/s00216-010-3810-9
- Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J.* 1998;333 (Pt 3)(Pt 3):519-525. doi:10.1042/bj3330519
- Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J.* 1998;333 (Pt 3)(Pt 3):519-525. doi:10.1042/bj3330519
- Gabryś D, Kulik R, Trela K, Ślosarek K. Dosimetric comparison of liver tumour radiotherapy in all respiratory phases and in one phase using 4DCT. *Radiother Oncol.* 2011;100(3):360-364. doi:10.1016/j.radonc.2011.09.006
- Gan N, Sun Q, Suo Z, et al. How hydrophilic group affects drug-protein binding modes: Differences in interaction between sirtuins inhibitors Tenovin-1/Tenovin-6 and human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;201:114121. doi:10.1016/j.jpba.2021.114121
- Garber E, Demarest SJ. A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(3):751-757. doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.042
- Garbett NC, Brock GN. Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the evaluation of biological samples. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(5):981-989. doi:10.1016/j.bbagen.2015.10.004
- Garbett NC, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Chaires JB. Clinical application of plasma thermograms. Utility, practical approaches and considerations. *Methods.* 2015;76:41-50. doi:10.1016/j.ymeth.2014.10.030
- Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm CW, Jenson AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):186-191. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.001
- Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys J.* 2008;94(4):1377-1383. doi:10.1529/biophysj.107.119453
- Garidel P, Hoffmann C, Blume A. A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilisation. *Biophys Chem.* 2009;143(1-2):70-78. doi:10.1016/j.bpc.2009.04.004
- Garrison WM, Jayko ME, Bennett W. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Radiat Res.* 1962;16:483-502.
- Garrison WM. Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polipeptides and proteins. *Chem. Rev.* 1987;87:381-398.
- Golemis EA, Golemis E, Adams PD. *Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*, CSHL Press, New York 2005. ISBN 0879697237.

- Gorczyca R, Wiśniewski K, Pachocki K, Różycki Z. Ochrona radiologiczna w pracowni rentgenowskiej. Vademecum inspektora ochrony radiologicznej. Wydawnictwo EX – POLON, Warszawa 1997.
- Gorobets MG, Wasserman LA, Bychkova AV, Konstantinova ML, Plaschina IG, Rosenfeld MA. Study of Human Fibrinogen Oxidative Modification using Differential Scanning Calorimetry. Dokl Biochem Biophys. 2018;480(1):146-148. doi:10.1134/S1607672918030067
- Gorobets MG, Wasserman LA, Bychkova AV, Rosenfeld MA. Thermodynamic features of bovine and human serum albumins under ozone and hydrogen peroxide induced oxidation studied by differential scanning calorimetry. Chemical Physics. 2019;523:34-41. doi:10.1016/j.chemphys.2019.03.018
- Gregory R. Protein-Solvent Interactions, CRC Press, New York 1995. ISBN 9780824792398.
- Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, et al. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. Arch Biochem Biophys. 2003;413(1):53-66. doi:10.1016/s0003-9861(03)00091-2
- Grzebyk E, Piwowar A. Inhibitory actions of selected natural substances on formation of advanced glycation endproducts and advanced oxidation protein products. BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):381. Published 2016 Sep 29. doi:10.1186/s12906-016-1353-0
- Guglielmelli A, Rizzuti B, Guzzi R. Stereoselective and domain-specific effects of ibuprofen on the thermal stability of human serum albumin. Eur J Pharm Sci. 2018;112:122-131. doi:10.1016/j.ejps.2017.11.013
- Hadley J, Malik N, Meek K. Collagen as a model system to investigate the use of aspirin as an inhibitor of protein glycation and crosslinking. Micron. 2001;32(3):307-315. doi:10.1016/s0968-4328(00)00032-9
- Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000:558.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998;67:425-479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Humphries KM, Szweda PA, Szweda LI. Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage. Free Radic Res. 2006;40(12):1239-1243. doi:10.1080/10715760600913184
- Hung HC, Chang GG. Biphasic denaturation of human placental alkaline phosphatase in guanidinium chloride. Proteins. 1998;33(1):49-61. doi:10.1002/(sici)1097-0134(19981001)33:1<49::aid-prot5>3.0.co;2-g
- Hung HM, Chan OCM, Mak CH, Hung WM, Ng WT, Lee MCH. Dosimetric comparison of intensity modulated radiotherapy and intensity modulated proton therapy in the treatment of recurrent nasopharyngeal carcinoma. Med Dosim. 2022;47(1):14-19. doi:10.1016/j.meddos.2021.07.002
- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell. 1995;80(2):225-236. doi:10.1016/0092-8674(95)90405-0
- IAEA. Radiation biology: A handbook for teachers and students, Training course series 42. IAEA, Vienna, 2010.

- Imai H, Hayashi T, Negawa T, et al. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol.* 2002;52(2):135-140. doi:10.2170/jjphysiol.52.135
- Janiszewska M, Polaczek-Grelik K, Raczkowski M, Szafron B, Konefał A, Zipper W. Secondary radiation dose during high-energy total body irradiation. *Strahlenther Onkol.* 2014;190(5):459-466. doi:10.1007/s00066-014-0635-z
- Jayson GG, Scholes G, Weiss J. Formation of formylkynurenine by the action of x-rays on tryptophan in aqueous solution. *Biochem J.* 1954;57(3):386-390. doi:10.1042/bj0570386
- Jelesarov I, Bosshard HR. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit.* 1999;12(1):3-18. doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6
- Kalapurakal JA, Goldman S, Stellpflug W, et al. Phase I study of intraoperative radiotherapy with photon radiosurgery system in children with recurrent brain tumors: preliminary report of first dose level (10 Gy). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;65(3):800-808. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.01.006
- Kanygin V, Kichigin A, Zaboronok A, et al. In Vivo Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy for Spontaneous Tumors in Large Animals: Case Series. *Biology (Basel).* 2022;11(1):138. Published 2022 Jan 14. doi:10.3390/biology11010138
- Kędra-Królik K, Chmielewska I, Michnik A, Zarzycki P. Blood Serum Calorimetry Indicates the Chemotherapeutic Efficacy in Lung Cancer Treatment. *Sci Rep.* 2017;7(1):16796. Published 2017 Dec 1. doi:10.1038/s41598-017-17004-x
- Khurana I. *Medical Physiology for Undergraduate Students*, Elsevier Health Sciences, 2013, ISBN 8131236226.
- Kiełboń A, Michnik A, Polaczek Grelik K, Duch K, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry of human blood serum exposed in vitro to X-ray radiation. *Thermochimica Acta.* 2019;680:178358. doi:10.1016/j.tca.2019.178358
- Kikalishvili L, Ramishvili M, Nemsadze G i in. Thermal stability of blood plasma proteins of breast cancer patients, DSC study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2015;120(1):501-505. doi:10.1007/s10973-015-4426-2
- Kokot I, Piwowar A, Jędryka M, Kratz EM. Is There a Balance in Oxidative-Antioxidant Status in Blood Serum of Patients with Advanced Endometriosis?. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(7):1097. Published 2021 Jul 8. doi:10.3390/antiox10071097
- Koslen MM, Eskew MW, Pinkert V i in. Capture Reagent and Strategy for Retrieving Albumin-Bound Ligands from Plasma. *Advances in Biological Chemistry.* 2019;09(03):110-134. doi:10.4236/abc.2019.93009
- Kraj A, Drabik A, Silberring J, red. *Proteomika i metabolomika*. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego; 2010. doi:10.31338/uw.9788323533399. ISBN: 8323533474
- Krumova S, Rukova B, Todinova S i in. Calorimetric monitoring of the serum proteome in schizophrenia patients. *Thermochimica Acta.* 2013;572:59-64. doi:10.1016/j.tca.2013.09.015

- Krumova S, Todinova S, Danailova A i in. Calorimetric features of IgM gammopathies. Implication for patient's diagnosis and monitoring. *Thermochimica Acta*. 2015;615:23-29.
doi:10.1016/j.tca.2015.07.002
- Krumova S, Todinova S, Mavrov D i in. Intercriteria analysis of calorimetric data of blood serum proteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017;1861(2):409-417.
doi:10.1016/j.bbagen.2016.10.012
- Krupakar J, Swaminathan CP, Das PK, Surolia A, Podder SK. Calorimetric studies on the stability of the ribosome-inactivating protein abrin II: effects of pH and ligand binding. *Biochem J*. 1999;338 (Pt 2)(Pt 2):273-279.
- Kry SF, Howell RM, Salehpour M, Followill DS. Neutron spectra and dose equivalents calculated in tissue for high-energy radiation therapy. *Med Phys*. 2009;36(4):1244-1250. doi:10.1118/1.3089810
- Kurganov BI, Lyubarev AE, Sanchez-Ruiz JM, Shnyrov VL. Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys Chem*. 1997;69(2-3):125-135. doi:10.1016/s0301-4622(97)80552-2
- Ladbury JE, Doyle ML. *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. Wiley & Sons, Incorporated, John; 1997.
- Lamprecht M, Greilberger JF, Schwabegger G, Hofmann P, Oetl K. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(6):1611-1617. doi:10.1152/jappphysiol.01325.2007
- Laramore GE, Krall JM, Thomas FJ, Griffin TW, Maor MH, Hendrickson FR. Fast neutron radiotherapy for locally advanced prostate cancer: results of an RTOG randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1985;11(9):1621-1627. doi:10.1016/0360-3016(85)90214-7
- Leite AMM, Ronga MG, Giorgi M, et al. Secondary neutron dose contribution from pencil beam scanning, scattered and spatially fractionated proton therapy. *Phys Med Biol*. 2021;66(22):10.1088/1361-6560/ac3209. Published 2021 Nov 24. doi:10.1088/1361-6560/ac3209
- Leszczyński W, Ślosarek K, Szlag M. Comparison of dose distribution in IMRT and RapidArc technique in prostate radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2012;17(6):347-351.
doi:10.1016/j.rpor.2012.05.002
- Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2005;67(6):2089-2100. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x
- Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*. 2001;36(9):1495-1502. doi:10.1016/s0531-5565(01)00135-8
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996;41(10):2078-2086.
doi:10.1007/BF02093613
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996;41(10):2078-2086.
doi:10.1007/BF02093613

- Lyubarev AE, Kurganov BI, Burlakova AA, Orlov VN. Irreversible thermal denaturation of uridine phosphorylase from *Escherichia coli* K-12. *Biophys Chem.* 1998;70(3):247-257. doi:10.1016/s0301-4622(97)00133-6
- Maciążek-Jurczyk M, Janas K, Pożycka J, et al. Human Serum Albumin Aggregation/Fibrillation and its Abilities to Drugs Binding. *Molecules.* 2020;25(3):618. Published 2020 Jan 31. doi:10.3390/molecules25030618
- Maciążek-Jurczyk M, Szkudlarek A, Chudzik M, Pożycka J, Sułkowska A. Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018;188:675-683. doi:10.1016/j.saa.2017.05.023
- Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(7):911-922. doi:10.1016/s0891-5849(01)00667-0
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108(8):652-659. doi:10.1016/s0002-9343(00)00412-5
- Mehdi M, Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in different psoriasis stages. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2012;111(3):1801-1804. doi:10.1007/s10973-012-2468-2
- Mekdash H, Shahine B, Jalbout W, Chehab C, Abdel Khalek H, Youssef B. A simple technique for an accurate shielding of the lungs during total body irradiation. *Tech Innov Patient Support Radiat Oncol.* 2017;3-4:13-18. Published 2017 Aug 17. doi:10.1016/j.tipsro.2017.07.001
- Michnik A, Drzazga Z, Michalik K i in. Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2009;102(1):57-60. doi:10.1007/s10973-009-0602-6
- Michnik A, Drzazga Z, Poprzęcki S, Czuba M, Kempa K, Sadowska-Krępa E. DSC serum profiles of sportsmen. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2013;113(1):365-370. doi:10.1007/s10973-013-3130-3
- Michnik A, Drzazga Z, Schisler I, Poprzęcki S, Czuba M. Diversity in athlete's response to strength effort in normobaric hypoxia. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2018;134(1):633-641. doi:10.1007/s10973-018-7067-4
- Michnik A, Drzazga Z. Thermal denaturation of mixtures of human serum proteins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2010;101(2):513-518. doi:10.1007/s10973-010-0826-5
- Michnik A, Kiełboń A, Duch K, Sadowska-Krępa E, Pokora I. Comparison of human blood serum DSC profiles in aqueous and PBS buffer solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2021A. doi:10.1007/s10973-021-11008-6
- Michnik A, Michalik K, Drzazga Z. Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin. *J Photochem Photobiol B.* 2008;90(3):170-178. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.12.007
- Michnik A, Michalik K, Kluczevska A, Drzazga Z. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2006;84(1):113-117. doi:10.1007/s10973-005-7170-1

- Michnik A, Pokora I, Duch K, Sadowska-Krępa E. Differential scanning calorimetry reveals that whole-body cryostimulation in cross-country skiers can modify their response to physical effort. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2020. doi:10.1007/s10973-020-09285-8
- Michnik A, Polaczek-Grelik K, Leśniak P, Drzazga Z. Effects of low-dose ionizing radiation on α , β -globulins solutions studied by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2012;111(3):1845-1852. doi:10.1007/s10973-012-2687-6
- Michnik A, Polaczek-Grelik K, Staś M, Sadowska-Krępa E, Gibińska J, Drzazga Z. Delayed effects of neutron radiation on human serum. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2016;126(1):37-45. doi:10.1007/s10973-016-5255-7
- Michnik A, Sadowska-Krępa E, Domaszewski P, Duch K, Pokora I. Blood serum DSC analysis of well-trained men response to CrossFit training and green tea extract supplementation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2017;130(3):1253-1262. doi:10.1007/s10973-017-6346-9
- Michnik A, Sadowska-Krępa E, Kielboń A, Duch K, Bańkowski S. Blood serum denaturation profile examined by differential scanning calorimetry reflects the effort put into ultramarathon by amateur long-distance runners. *J Therm Biol*. 2021B;99:103013. doi:10.1016/j.jtherbio.2021.103013
- Michnik A. DSC study of the association of ethanol with human serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2007;87(1):91-96. doi:10.1007/s10973-006-7825-6
- Milardi D, La Rosa C, Grasso D. Extended theoretical analysis of irreversible protein thermal unfolding. *Biophys Chem*. 1994;52(3):183-189. doi:10.1016/0301-4622(94)00033-g
- Milardi D, Rosa CL, Grasso D. Theoretical basis for differential scanning calorimetric analysis of multimeric proteins. *Biophys Chem*. 1996;62(1-3):95-108. doi:10.1016/s0301-4622(96)02191-6
- Milardi D, Rosa CL, Grasso D. Theoretical basis for differential scanning calorimetric analysis of multimeric proteins. *Biophys Chem*. 1996;62(1-3):95-108. doi:10.1016/s0301-4622(96)02191-6
- Minami T, Terada T, Takahashi T, et al. Comparative studies on the heterogeneity of plasma-derived and recombinant human albumins in laboratory use. *Int J Biol Macromol*. 2014;69:79-87. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.010
- Mitrasinovic S, Zhang M, Appelboom G, et al. Milestones in stereotactic radiosurgery for the central nervous system. *J Clin Neurosci*. 2019;59:12-19. doi:10.1016/j.jocn.2018.09.029
- Monaselidze J, Kalandadze Y, Topuridze I, Gadabadze M. Thermodynamic properties of serum and plasma of patients sick with cancer. *High Temp High Press*. 1997;29:677-81.
- Monti Hughes A. Importance of radiobiological studies for the advancement of boron neutron capture therapy (BNCT). *Expert Rev Mol Med*. 2022;24:e14. Published 2022 Mar 31. doi:10.1017/erm.2022.7
- Musante L, Bruschi M, Candiano G, et al. Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(2):668-673. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.079
- Nussinov R. *Computational Protein-Protein Interactions*. CRC Press, Boca Raton 2009. ISBN 9781420070071.
- Park SY, Kwak YS. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *J Exerc Rehabil*. 2016;12(2):113-117. Published 2016 Apr 26. doi:10.12965/jer.1632598.299

- Petropoulos I, Friguet B. Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1269-1276. doi:10.1080/10715760600917144
- Pîrnău A, Mic M, Neamțu S, Floare CG, Bogdan M. Calorimetric and spectroscopic studies of the interaction between zidovudine and human serum albumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2018;191:226-232. doi:10.1016/j.saa.2017.10.032
- Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(2):188-192. doi:10.1016/j.diabres.2006.12.007
- Plotnikov VV, Brandts JM, Lin LN, Brandts JF. A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal Biochem.* 1997;250(2):237-244. doi:10.1006/abio.1997.2236
- Polaczek-Grelik K, Karaczyn B, Konefał A. Nuclear reactions in linear medical accelerators and their exposure consequences. *Applied Radiation and Isotopes.* 2012;70(10):2332-2339. doi:10.1016/j.apradiso.2012.06.021
- Polaczek-Grelik K, Orlef A, Dybek M, Konefał A, Zipper W. Linear accelerator therapeutic dose-induced radioactivity dependence. *Appl Radiat Isot.* 2010;68(4-5):763-766. doi:10.1016/j.apradiso.2009.09.051
- Porra L, Seppälä T, Wendland L, et al. Accelerator-based boron neutron capture therapy facility at the Helsinki University Hospital. *Acta Oncol.* 2022;61(2):269-273. doi:10.1080/0284186X.2021.1979646
- Possanzini M, Greco C. Stereotactic radiotherapy in metastatic breast cancer. *Breast.* 2018;41:57-66. doi:10.1016/j.breast.2018.06.011
- Privalov PL, Potekhin SA. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* 1986;131:4-51. doi:10.1016/0076-6879(86)31033-4
- Privalov PL. Intermediate states in protein folding. *J Mol Biol.* 1996;258(5):707-725. doi:10.1006/jmbi.1996.0280
- Privalov PL. Thermodynamics of protein folding. *The Journal of Chemical Thermodynamics.* 1997;29(4):447-474. doi:10.1006/jcht.1996.0178
- Rahimi A, Timmerman R. New techniques for irradiating early stage breast cancer: stereotactic partial breast irradiation. *Seminars in Radiation Oncology.* 2017;27(3):279-288. doi:10.1016/j.semradonc.2017.02.007
- Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics.* 2005;5(13):3262-3277. doi:10.1002/pmic.200401245
- Red. Józwiak Z, Bartosz G. *Biofizyka.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012, ISBN 978-83-01-14461-6.
- Red. Pruszyński B, Cieszanowski A. *Radiologia. Diagnostyka obrazowa RTG, TK, USG i MR.* PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa 2014, ISBN 978-83-2004-772-1.
- Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furduliu CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(2):260-292. doi:10.1089/ars.2013.5489

- Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):221-226. doi:10.1007/s00726-003-0012-
- Reza DM, Akbar MM, Parviz N, Ghourchian, Hedayat-Olah, Shahrokh S. Inhibition of human hemoglobin autoxidation by sodium n-dodecyl sulphate. *J Biochem Mol Biol*. 2002;35(4):364-370. doi:10.5483/bmbrep.2002.35.4.364
- Rhoades R, Bell DR. *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine*, Lippincott Williams & Wilkins, 2009 ISBN 0781768527.
- Romero-Expósito M, Domingo C, Sánchez-Doblado F, Ortega-Gelabert O, Gallego S. Experimental evaluation of neutron dose in radiotherapy patients: Which dose?. *Med Phys*. 2016;43(1):360. doi:10.1118/1.4938578
- Royer CA. Insights into the role of hydration in protein structure and stability obtained through hydrostatic pressure studies. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(8):1167-1173. doi:10.1590/s0100-879x2005000800003
- Royer CA. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1595(1-2):201-209. doi:10.1016/s0167-4838(01)00344-2
- Sánchez-Ruiz JM, López-Lacomba JL, Cortijo M, Mateo PL. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry*. 1988;27(5):1648-1652. doi:10.1021/bi00405a039
- Sanchez-Ruiz JM. Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys J*. 1992;61(4):921-935. doi:10.1016/S0006-3495(92)81899-4
- Schaefer JV, Sedlák E, Kast F, Nemergut M, Plückthun A. Modification of the kinetic stability of immunoglobulin G by solvent additives. *MAbs*. 2018;10(4):607-623. doi:10.1080/19420862.2018.1450126
- Shrake A, Ross PD. Biphasic denaturation of human albumin due to ligand redistribution during unfolding. *J Biol Chem*. 1988;263(30):15392-15399.
- Shrake A, Ross PD. Ligand-induced biphasic protein denaturation. *J Biol Chem*. 1990;265(9):5055-5059.
- Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*. 2003;278(1):311-318. doi:10.1074/jbc.M206279200
- Smeller L. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1595(1-2):11-29. doi:10.1016/s0167-4838(01)00332-6
- Smeltzer CC, Lukinova NI, Towcimak ND, et al. Effect of gamma irradiation on the structural stability and functional activity of plasma-derived IgG. *Biologicals*. 2015;43(4):242-249. doi:10.1016/j.biologicals.2015.04.003
- Smith BR, Hyer DE, Hill PM, Culberson WS. Secondary Neutron Dose From a Dynamic Collimation System During Intracranial Pencil Beam Scanning Proton Therapy: A Monte Carlo Investigation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2019;103(1):241-250. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.08.012

- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10540-10543. doi:10.1073/pnas.88.23.10540
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10540-10543. doi:10.1073/pnas.88.23.10540
- Soetens O, De Craene JO, Andre B. Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43949-43957.
- Spurný F, Johansson L, Säterberg A, Bednár J, Turek K. The contribution of secondary heavy particles to the absorbed dose from high-energy photon beams. *Phys Med Biol*. 1996;41(12):2643-2656. doi:10.1088/0031-9155/41/12/005
- Stadler N, Lindner RA, Davies MJ. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(5):949-954. doi:10.1161/01.ATV.0000124892.90999.cb
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 2006;40(12):1250-1258. doi:10.1080/10715760600918142
- Staniforth RA, Bigotti MG, Cutruzzolà F, Allocatelli CT, Brunori M. Unfolding of apomyoglobin from *Aplysia limacina*: the effect of salt and pH on the cooperativity of folding. *J Mol Biol*. 1998;275(1):133-148. doi:10.1006/jmbi.1997.1409
- Suzuki S, Kodera Y, Saito T, et al. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Sci Rep*. 2016;6:38299. Published 2016 Dec 8. doi:10.1038/srep38299
- Szkudlarek A, Pentak D, Ploch A, Pożycka J, Maciążek-Jurczyk M. In Vitro Investigation of the Interaction of Tolbutamide and Losartan with Human Serum Albumin in Hyperglycemia States. *Molecules*. 2017;22(12):2249. Published 2017 Dec 17. doi:10.3390/molecules22122249
- Szkudlarek A, Pożycka J, Kulig K, Owczarzy A, Rogóż W, Maciążek-Jurczyk M. Changes in Glycated Human Serum Albumin Binding Affinity for Losartan in the Presence of Fatty Acids In Vitro Spectroscopic Analysis. *Molecules*. 2022;27(2):401. Published 2022 Jan 8. doi:10.3390/molecules27020401
- Szkudlarek A, Wilk M, Maciążek-Jurczyk M. In Vitro Investigations of Acetohexamide Binding to Glycated Serum Albumin in the Presence of Fatty Acid. *Molecules*. 2020;25(10):2340. Published 2020 May 17. doi:10.3390/molecules25102340
- Szweda PA, Friguier B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(1):29-36. doi:10.1016/s0891-5849(02)00837-7
- Tenchov B, Abarova S, Koynova R, Traikov L, Tancheva L. Low-temperature exothermic transitions in brain proteome of mice, effect of scopolamine. *Thermochimica Acta*. 2017;650:26-32. doi:10.1016/j.tca.2017.01.012
- Tenchov B, Koynova R, Antonova B i in. Blood plasma thermal behavior and protein oxidation as indicators of multiple sclerosis clinical status and plasma exchange therapy progression. *Thermochimica Acta*. 2019;671:193-199. doi:10.1016/j.tca.2018.12.001

- Thornalley PJ, Rabbani N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry--a user's perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(2):818-829. doi:10.1016/j.bbagen.2013.03.025
- Todinova S, Krumova S, Danailova A, et al. Calorimetric markers for monitoring of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia patients. *Eur Biophys J*. 2018;47(5):549-559. doi:10.1007/s00249-018-1277-3
- Todinova S, Krumova S, Gartcheva L, Robeerst C, Taneva SG. Microcalorimetry of blood serum proteome: a modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal Chem*. 2011;83(20):7992-7998. doi:10.1021/ac202055m
- Todinova S, Krumova S, Kurtev P, et al. Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(12):1879-1885. doi:10.1016/j.bbagen.2012.08.001
- Tsai AM, van Zanten JH, Betenbaugh MJ. II. Electrostatic effect in the aggregation of heat-denatured RNase A and implications for protein additive design. *Biotechnol Bioeng*. 1998;59(3):281-285.
- Velazquez-Campoy A, Vega S, Sanchez-Gracia O, et al. Thermal liquid biopsy for monitoring melanoma patients under surveillance during treatment: A pilot study. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018;1862(8):1701-1710. doi:10.1016/j.bbagen.2018.04.020
- Waksman G. *Proteomics and Protein-Protein Interactions: Biology, Chemistry, Bioinformatics, and Drug Design (Protein Reviews)*. Springer Science & Business Media, Singapore 2006. ISBN 9780387245324.
- Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 1999;185(2):129-188. doi:10.1016/s0378-5173(99)00152-0
- Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 1999;185(2):129-188. doi:10.1016/s0378-5173(99)00152-0
- Wiegand N, Búcs G, Dandé Á, Lőrinczy D. Investigation of protein content of synovial fluids with DSC in different arthritides. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2019;138(6):4497-4503. doi:10.1007/s10973-019-08151-6
- Wulf J, Hädinger U, Oppitz U, Thiele W, Flentje M. Stereotactic boost irradiation for targets in the abdomen and pelvis. *Radiother Oncol*. 2004;70(1):31-36. doi:10.1016/j.radonc.2003.10.013
- Yoo S, Wu QJ, Lee WR, Yin FF. Radiotherapy treatment plans with RapidArc for prostate cancer involving seminal vesicles and lymph nodes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76(3):935-942. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.07.1677
- Zapf I, Fekecs T, Ferencz A i in. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochimica Acta*. 2011;524(1-2):88-91. doi:10.1016/j.tca.2011.06.019

VIII. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek II.1. Przykład profilu DSC przedstawiającego endotermiczny proces denaturacji termicznej wybranego białka oraz przejście egzotermiczne w zakresie wysokotemperaturowym [Cooper 2001].....	15
Rysunek II.2. Graficzne przedstawienie wyznaczenia wybranych parametrów termodynamicznych, gdzie Cp^{den} - zmiana pojemności cieplnej towarzyszącej denaturacji białka, $\langle Cp_{P,D}(T) \rangle$ - cząstkowa molowa pojemność cieplna białka zdenaturowanego ($\langle Cp_D(T) \rangle$), $\langle Cp_{P,N}(T) \rangle$ - cząstkowa molowa pojemność cieplna białka natywnego ($\langle Cp_N(T) \rangle$), - wewnętrzna nadmiarowa pojemność cieplna (ΔCp), - nadmiarowa pojemność cieplna przejścia (ΔCp) [Jelesarov et al. 1999].....	16
Rysunek II.3. Zestawienie profili DSC uzyskanych dla poszczególnych białek w roztworach buforowych (PBS) [Suplement Garbett et al. 2009].....	22
Rysunek II.4. Profil DSC roztworu buforowego osocza krwi ludzkiej (linia przerywana, kolor czarny) oraz profile DSC poszczególnych białek wchodzących w skład ludzkiego osocza (linia ciągła, różne kolory) [Garbett et al. 2009].....	24
Rysunek II.5. Zestawienie uśrednionych krzywych DSC roztworu wodnego (linia ciągła, niebieska) oraz buforowego (linia kropkowana, czarna) surowicy krwi ludzkiej [Michnik et al. 2021A].....	25
Rysunek II.6: Rysunek A przedstawia profil DSC IgG1 z wyszczególnionymi wkładami procesów denaturacji domen pokazane za pomocą dekonwolucji uzyskanej krzywej DSC. Rysunek B przedstawia zestawienie krzywych DSC wykonanych dla roztworów 4 podklas immunoglobulin G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) [Garber et al. 2007].....	27
Rysunek II.7. Zestawienie profili DSC albuminy krwi ludzkiej (HSA), albuminy z Tenovinem 1 oraz albuminy z Tenovinem 6. Żółtą linią jest zaznaczone położenie maksimum lokalnego dla krzywej DSC albuminy bez ligandów [Gan et al. 2021].....	30
Rysunek II.8. Krzywa przeżywalności komórek ekspozowanych na promieniowanie X lub promieniowanie neutronowe [Gasińska 2001].....	34
Rysunek II.9. Pośrednie i bezpośrednie działanie promieniowania jonizującego na przykładzie nici DNA [Hall et al. 2000].....	35
Rysunek III.1. Surowica krwi ludzkiej.....	37
Rysunek III.2. Roztwory surowicy krwi ludzkiej jednego ochotnika (próbka napromieniana oraz kontrolna).....	38
Rysunek III.3. Proces ekspozycji roztworu surowicy na promieniowanie neutronowe z wykorzystaniem źródła Californ-252.....	39
Rysunek III.4. Proces ekspozycji roztworu surowicy na promieniowanie X z wykorzystaniem akceleratora medycznego.....	40

Rysunek III.5. Rozkład dawki w fiołce zawierającej próbkę – zrzuty ekranu z systemu planowania leczenia w dwóch płaszczyznach (A – przekrój czołowy, B – przekrój poprzeczny).....	41
Rysunek III.6. Kształt pola napromieniania dopasowany za pomocą kolimatora MLC – zrzut ekranu z systemu planowania leczenia.....	41
Rysunek III.7. Mikrokalorymetr VP-DSC (A) oraz urządzenie ThermoVac służące do odgazowywania cieczy (B).....	42
Rysunek III.8. Zestaw potrzebny do prawidłowego nałożenia próbki: a) lejek, b) strzykawka z pierścieniem do wyrównywania poziomu cieczy w odprowadzeniach kapilarnych (Rys. III.9), c) strzykawka Hamilton z igłą odpowiedniej długości o tępej końcówce do nakładania próbek.....	43
Rysunek III.9. Schemat budowy mikrokalorymetru z dwoma niewyjmowalnymi komorami (1, 2) umieszczonymi w osłonie termicznej (9). Najważniejsze elementy budowy aparatu to: elementy grzewcze główne (3, 4) i pomocnicze (18, 19), krystaliczny czujnik do pomiaru różnicy temperatur między dwoma komorami (8), czujniki temperaturowe (12), miernik efektu cieplnego (7), urządzenie chłodząco – grzewcze (10) sterowane przez regulator (11). Schemat został zaczerpnięty z pracy Plotnikov et al. 1997, gdzie można znaleźć pozostałe oznaczenia elementów.....	43
Rysunek III.10. Spektrofotometr Jasco V-530.....	44
Rysunek III.11 Krzywe DSC (po dwa skany) po odjęciu linii instrumentalnej bufor-bufor oraz po normalizacji na 1 gram białka.....	45
Rysunek III.12 Krzywe DSC zarejestrowane po dwa skany dla trzech próbek: wyjściowej (czarny), kontrolnej (niebieski) oraz napromienionej (czerwony), gdzie linie grube reprezentują pierwsze skany, cieńsze natomiast drugie skany.....	45
Rysunek III.13 Proces wyznaczania linii bazowej za pomocą narzędzi dostępnych w programie Origin 5.0 z nakładką firmy MicroCal.....	46
Rysunek III.14 Pierwszy skan roztworu surowicy po odjęciu linii bazowej.....	46
Rysunek III.15. Mikrokuwety kwarcowe – referencyjna wypełniona wodą i pomiarowa wypełniona roztworem surowicy krwi ludzkiej.....	47
Rysunek IV.1 Profile DSC (surowe dane) surowicy pochodzącej od tego samego ochotnika w dwóch rozpuszczalnikach: wodzie (A) oraz buforze (B), gdzie: krzywa czarna – pierwszy skan, krzywa zielona – drugi skan, krzywa cyjanowa – rozpuszczalnik.....	50
Rysunek IV.2 Profile DSC (po normalizacji stężeniowej) dla przykładowych roztworów surowicy krwi ludzkiej: wodnych (A) oraz buforowych (B).....	51
Rysunek IV.3. Porównanie profili DSC (po odjęciu linii bazowej liniowej) surowicy pochodzącej od tego samego ochotnika w dwóch rozpuszczalnikach: wodzie (niebieski) oraz buforze (zielony).....	53
Rysunek IV.4 Profile DSC dla dwóch fenotypów haptoglobiny w roztworze wodnym, gdzie: – typ 1-1, – typ 2-2.....	55
Rysunek IV.5 A, B. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 5 Gy promieniowania neutronowego przykładowych	

roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona. Rysunki przedstawiają krzywe DSC roztworów wodnych surowicy krwi pobranej od dwóch osób: (Rys A – osoba pierwsza, Rys B – osoba druga). Rysunek 1 A – napromienianie próbki trwało 23 h 51 min. przy temperaturze 18 °C. Rysunek 1 B – napromienianie próbki trwało 26 h 30 min. przy temperaturze 21 °C.....	56
Rysunek IV.6.Zestawienie uśrednionych krzywych DSC (n = 5) zarejestrowanych bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 5 Gy promieniowania neutronowego roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbki wyjściowe, – próbki kontrolne, – próbki napromienione. Zacięziony obszar na krzywej wyjściowej reprezentuje odchylenie standardowe.....	58
Rysunek IV.7.Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 13 Gy promieniowania neutronowego przykładowego roztworu surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 13 Gy. Napromienianie trwało 69 godz. 6 min. przy temperaturze 21 C.....	59
Rysunek IV.8.A, B. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 5 Gy oraz 10 Gy promieniowania X przykładowych roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona. Rysunki przedstawiają krzywe DSC roztworów wodnych surowicy krwi pobranej od dwóch osób (Rys A – osoba pierwsza, Rys B – osoba druga).....	61
Rysunek IV.9.A, B, C, D. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawkami 5 Gy oraz 10 Gy promieniowania X przykładowych roztworów buforowych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 5 Gy, – próbka napromieniona dawką 10 Gy. Rysunki przedstawiają krzywe DSC roztworów buforowych surowicy krwi pobranej od dwóch osób (Rys A, B – osoba pierwsza, Rys C, D – osoba druga). Rysunek IV.9 B jest powiększeniem fragmentu Rysunku IV.9 A, natomiast Rysunek IV.9 D jest powiększeniem fragmentu Rysunku IV.9 C.....	62
Rysunek IV.10.A, B. Uśrednione zestawienie krzywych DSC (n = 7) zarejestrowanych bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania promieniowaniem X dawką 10 Gy roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbki wyjściowe, – próbki kontrolne, – próbki napromienione (A). Rysunek 10 B jest powiększeniem fragmentu rysunku 10 A.....	63
Rysunek IV.11.A, B. Krzywe DSC zarejestrowane bezpośrednio po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawkami: A) - 10 Gy, 30 Gy, B) - 70 Gy, 120 Gy roztworów surowicy krwi ludzkiej pochodzącej od jednej osoby, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna, – próbka napromieniona dawką 10 Gy, – próbka napromieniona dawką 30 Gy, – próbka napromieniona dawką 70Gy, – próbka napromieniona dawką 120 Gy.....	65
Rysunek IV.12. A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego buforowego (A) oraz wodnego (B) roztworu surowicy, gdzie: – świeży roztwór buforowy, – świeży roztwór	

wodny, – roztwór buforowy lub wodny po 1 dniu, – roztwór buforowy lub wodny 1 tydzień od sporządzenia roztworu.....	67
Rysunek IV.13.Porównanie zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego wodnego oraz buforowego roztworu surowicy, gdzie: – świeży roztwór buforowy, – roztwór buforowy po 2 tygodniach, – świeży roztwór wodny, – roztwór wodny po 2 tygodniach.....	68
Rysunek IV.14.Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego wodnego roztworu surowicy, gdzie: – świeży roztwór (próbka wyjściowa), – 3 tygodnie, – 4 tygodnie od sporządzenia roztworu.....	69
Rysunek IV.15.A, B, C, D. Ilustracja zmian czasowych obserwowanych na profilach DSC dla dwóch przykładowych wodnych roztworów surowicy: A, B – roztwór z pierwszej grupy surowic (napromienianie próbki trwało 26 h 30 min. przy temperaturze 21 °C); C, D – roztwór z drugiej grupy surowic (napromienianie próbki trwało 26 h 7 min. przy temperaturze 19 °C), gdzie: – próbka wyjściowa, – pomiar po 1 dniu, – pomiar po 1 tygodniu.....	70
Rysunek IV.16.A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC wybranego wodnego roztworu surowicy: kontrolnego (A) oraz eksponowanego na promieniowanie neutronowe dawką 5 Gy (B), gdzie: – próbka wyjściowa, – pomiar po 3 tygodniach, – pomiar po 4 tygodniach. Napromienianie trwało 23 godz. 51 min. przy temperaturze 18 C.....	72
Rysunek IV.17.Usrednione krzywe DSC zarejestrowane 3 tygodnie po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania neutronami dawką 5 Gy roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbki wyjściowe, – próbki kontrolne, – próbki napromienione. Zacięniowany obszar na krzywych DSC to odchylenie standardowe.....	73
Rysunek IV.18.Średnie (\pm błąd standardowy) wartości egzotermicznego efektu cieplnego towarzyszącego procesowi agregacji (A) ujawniającemu się na krzywych DSC roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej w niskotemperaturowym zakresie temperatur: (– wartości A próbki kontrolne, – wartości A próbki napromienione dawką 5 Gy). (punkty reprezentujące wyznaczone średnie połączono tylko dla wygody śledzenia zmian).....	78
Rysunek IV.19.Krzywe DSC zarejestrowane tydzień po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawką 13 Gy promieniowania neutronowego przykładowego roztworu surowicy krwi ludzkiej, gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna , – próbka napromieniona dawką 13 Gy. Napromienianie trwało 69 godz. 6 min. przy temperaturze 21 °C.....	78
Rysunek IV.20.A, B, C. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla przykładowego wodnego roztworu surowicy eksponowanego na promieniowanie X mierzonego po 1 tygodniu (A), 2 tygodniach (B), 3 tygodniach (C), gdzie: – próbka wyjściowa, – próbka kontrolna , – próbka napromieniona dawką 5 Gy, – próbka napromieniona dawką 10 Gy.....	80
Rysunek IV.21.A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC zarejestrowanych 3 tygodnie po przeprowadzonym eksperymencie napromieniania dawkami: A) - 10 Gy, 30 Gy, B) - 70 Gy, 120 Gy roztworów wodnych surowicy krwi ludzkiej pochodzącej od jednej osoby, gdzie: – próbka	

wyjściowa, – próbka kontrolna , – próbka napromieniona dawką 10 Gy, – próbka napromieniona dawką 30 Gy, – próbka napromieniona dawką 70 Gy, – próbka napromieniona dawką 120 Gy....81

Rysunek IV.22.A, B. Ilustracja zmian czasowych na profilach DSC dla reprezentatywnego buforowego roztworu surowicy: kontrolnego (A) oraz eksponowanego na promieniowanie X dawką 10 Gy (B), gdzie: – próbka wyjściowa, – pomiar po 1 dniu, – pomiar po 1 tygodniu.....82

Rysunek IV.23 A, B. Widma absorpcyjne dwóch roztworów buforowych surowicy pochodzącej od dwóch ochotników (A i B), gdzie: ● próbka kontrolna, ● próbka napromieniona dawką 5 Gy, ● próbka napromieniona dawką 10 Gy, ○ próbka kontrolna po tygodniu przechowywania, ○ próbka napromieniona dawką 5 Gy po tygodniu przechowywania, ○ próbka napromieniona dawką 10 Gy po tygodniu przechowywania, ▲ próbka kontrolna po 2 tygodniach, ▲ próbka napromieniona dawką 5 Gy po 2 tygodniach, ▲ próbka napromieniona dawką 10 Gy po 2 tygodniach.....86

IX. SPIS TABEL

Tabela IV.1. Czas ekspozycji próbek surowicy na promieniowanie X w zależności od zadanej dawki.....	42
Tabela V.1. Uśrednione wartości (\pm odchylenie standardowe) temperatur oraz nadmiarowej pojemności cieplnej odpowiadających maksimum lokalnym widocznym na profilach DSC surowicy krwi ludzkiej w roztworze wodnym (n = 26).....	56
Tabela V.2. Uśrednione wartości (\pm odchylenie standardowe) temperatur oraz nadmiarowej pojemności cieplnej odpowiadającej maksimum lokalnym widocznym na profilach DSC surowicy krwi ludzkiej w roztworze buforowym (n = 12).....	57
Tabela V.3. Uśrednione wartości (\pm odchylenie standardowe) zmian entalpii (ΔH) oraz szerokości połówkowej (HHW) przejścia endotermicznego w rozpuszczalniku wodnym oraz buforowym.....	57
Tabela V.4. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC wodnych roztworów surowicy (n = 5): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) dawką 5 Gy promieniowania neutronowego.....	62
Tabela V.5. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC buforowych roztworów surowicy (n = 7): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) dawką 10 Gy promieniowania rentgenowskiego.....	67
Tabela V.6. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC wodnych roztworów surowicy (n = 6): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) dawką 5 Gy promieniowania neutronowego.....	78
Tabela V.7 Wynik wykonanego testu post hoc Scheffego, z zaznaczeniem kolorem czerwonym wartości statystycznie istotnych.....	81
Tabela V.8. Średnie (\pm odchylenie standardowe) wartości parametrów termodynamicznych przejścia endo- i egzotermicznego na krzywych DSC buforowych roztworów surowicy (n = 6): wyjściowych, kontrolnych (k) oraz napromienionych (n) dawką 10 Gy promieniowania rentgenowskiego.....	88