

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

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

### *DSC denaturation profiles of human blood serum exposed in vitro to ionising radiation.*

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 distilled 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-rays only 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.