

УДК 577.346, 57.033, 577.151.042
EDN: HMTYQM

PACS: 61.80.Fe

Влияние дозы облучения электронным пучком на ферментативную активность пероксидазы хрена

Ю. Д. Иванов, И. Д. Шумов, В. С. Зиборов, А. Н. Аблеев, А. Ф. Козлов,
Д. Д. Жданов, С. В. Будник, Р. С. Чурюкин, А. М. Тереза, А. И. Арчаков

Методом спектрофотометрии изучен эффект воздействия электронного пучка на пероксидазу хрена (ПХ). Диапазон доз излучения варьировали от 0 до 40 кГр. Образцы 0,1 мкМ раствора фермента облучали в ускорителе электронов при энергии электронов 9,7 МэВ. Показано, что остаточная активность фермента зависит от поглощенной образцом ПХ дозы излучения. После поглощения дозы излучения от 3 до 5 кГр фермент сохранял около 50 % активности, а при дозе 40 кГр фермент полностью терял активность. Полученные результаты необходимо учитывать при разработке методов обработки пищевых продуктов и вакцинных материалов на базе электронных пучков. Полученные данные важны также при анализе возможных патологических факторов, возникающих при действии ионизирующих излучений, в том числе электронных пучков, на живые организмы.

Ключевые слова: электронный пучок, ускоритель электронов, пероксидаза хрена, ферментативная активность, спектрофотометрия.

DOI: 10.51368/1996-0948-2024-5-40-45

Введение

Ионизирующее излучение, к которому относятся гамма-лучи, рентгеновские лучи и

электронные пучки [1–3], нашло многочисленные применения в биотехнологии. Одним из таких применений является стерилизация

Иванов Юрий Дмитриевич^{1, 2}, зав. лаб., профессор, д.б.н.

E-mail: yurii.ivanov.nata@gmail.com

Шумов Иван Дмитриевич¹, н.с., к.б.н.

E-mail: shum230988@yandex.ru

Зиборов Вадим Серафимович^{1,2}, с.н.с., к.ф.-м.н.

E-mail: ziborov.vs@yandex.ru

Аблеев Александр Нариманович¹, вед. инженер.

E-mail: ableev@mail.ru

Козлов Андрей Федорович¹, вед. инженер.

E-mail: afkozlow@mail.ru

Жданов Дмитрий Дмитриевич¹, зав. лаб., д.б.н.

E-mail: zhdanovdd@mail.ru

Будник Сергей Васильевич³, ген. директор.

E-mail: sbudnik@teocortex.com

Чурюкин Роман Сергеевич³, гл. технолог, к.б.н.

E-mail: rchuryukin@teocortex.com

Тереза Анатолий Михайлович⁴, с.н.с., к.ф.-м.н.

E-mail: atereza@bk.ru

Арчаков Александр Иванович¹, научный руководитель, академик РАН, профессор, д.б.н.

E-mail: alexander.archakov@ibmc.msk.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича».

Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8.

² Объединенный институт высоких температур РАН.

Россия, 125412, Москва, ул. Ижорская, 13, стр. 2.

³ ООО "Теокортекс".

Россия, 108808, Москва, вн. тер. г. поселение Первомайское, квартал 328, д. 34, стр. 6.

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4.

Статья поступила в редакцию 24.06.2024

После доработки 10.07.2024

Принята к публикации 26.07.2024

© Иванов Ю. Д., Шумов И. Д., Зиборов В. С., Аблеев А. Н., Козлов А. Ф., Жданов Д. Д., Будник С. В., Чурюкин Р. С., Тереза А. М., Арчаков А. И., 2024

одноразовых медицинских расходных материалов – таких, как устройства для забора крови [4]. Второе важное применение ионизирующего излучения — разработка вакцин. Инактивация вирусов ионизирующим излучением позволяет использовать этот вид обработки при разработке новых терапевтических средств, в том числе вакцин [5]. Гамма-излучение имеет высокую энергию, но его использование в производстве вакцин в настоящее время ограничено строгими правилами безопасности. Правила безопасности более просты в случае использования рентгеновского излучения. Интересно, что инактивация некоторых РНК-вирусов рентгеновскими лучами может быть достигнута без потери важных биологических свойств при энергии пучка 225 кэВ и токе 18 мА [6]. В этой связи еще одной областью применения рентгеновского излучения являются пищевые технологии, в которых рентгеновская обработка применяется для инактивации патогенов пищевого происхождения [7]. Использование электронных пучков представляет собой альтернативу как гамма-, так и рентгеновскому излучению. Электронно-лучевая обработка была предложена для инактивации патогенов в пищевых продуктах [2] и для стерилизации пищевой упаковки [8]. Также необходимо отметить применение технологий с использованием электронных пучков в разработке вакцин [9–11]. Такие устройства на базе ускорителей электронов, как ТТ100 (Бельгия) [12] и ТЕОCORTEX-10 МэВ (Россия) [13], позволяют генерировать электронные пучки мощностью от 6 до 10 МэВ. Преимущество электронно-лучевой обработки заключается в ее скорости [14]. Применительно к обработке пищевых продуктов следует также подчеркнуть важность ферментативных процессов: помимо прямого действия возбудителей, ферментативные процессы представляют собой еще один фактор, влияющий на срок хранения грибов [15], овощей и фруктов [16]. В этом отношении ферменты класса пероксидаз представляют собой важную группу гемсодержащих ферментов, которые катализируют окисление многочисленных органических и неорганических соединений пероксидом водорода и органическими пероксидами [16]. Эти ферменты участвуют в так называемых

ферментативных процессах подрумянивания, тем самым напрямую влияя на качество продуктов питания. Соответственно, влияние электронно-лучевой обработки на ферменты важно для разработки новых технологий обработки пищевых продуктов. В нашем настоящем исследовании мы сообщаем о влиянии обработки пучком электронов высокой энергии (~ 10 МэВ) на ферментативную активность пероксидазы хрена (ПХ). Фермент ПХ всесторонне охарактеризован [17–19], и потому представляет собой очень удобную модель для изучения ферментов класса пероксидаз. ПХ относится к гем-содержащим ферментам.

Цель настоящей работы — определение зависимости активности фермента ПХ от поглощенной образцом фермента дозы ускоренных электронов.

Материалы и методы

Постановка работы. В наших экспериментах для изучения влияния электронно-лучевой обработки на ферментативную активность ПХ мы использовали хорошо зарекомендовавший себя метод спектрофотометрии [20, 21]. В качестве субстрата ПХ использовали 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (АБТС). Показано, что доза поглощенного излучения (ускоренных электронов) 3 кГр значительно снижает ферментативную активность ПХ. В то же время, практически полная инактивация фермента достигается при значительно более высокой дозе излучения (40 кГр).

Реактивы и фермент. В работе использовали фермент ПХ из корней хрена и его субстрат АБТС, приобретенные в фирме Sigma (США). Пероксид водорода (H_2O_2 , ч.д.а.), лимонная кислота (ос.ч.) и однозамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4 , ч.д.а.) были приобретены в Реахим (Москва). Фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбекко (буфер ФСБ-Д, рН 7,4; 2 ммоль/л фосфат, 30 ммоль/л NaCl) готовили из смеси солей, приобретенных у компании Pierce (США). Все растворы, использованные в экспериментах, были приготовлены с использованием деионизированной ультрачистой воды (18,2 МОм·см), полученной с помощью установки Simplicity UV (Millipore, Франция).

Подготовка образцов фермента. Для описанных в работе экспериментов готовили аликвоты 0,1 мкмоль/л раствора ПХ в буфере ФСБ-Д объемом 1 мл, которые пипетировали в стерильные одноразовые полипропиленовые пробирки типа Эппендорф.

Облучение образцов фермента в ускорителе электронов. Экспериментальная установка, использованная для облучения образцов фермента ПХ электронным пучком, схематически показана на рисунке 1.

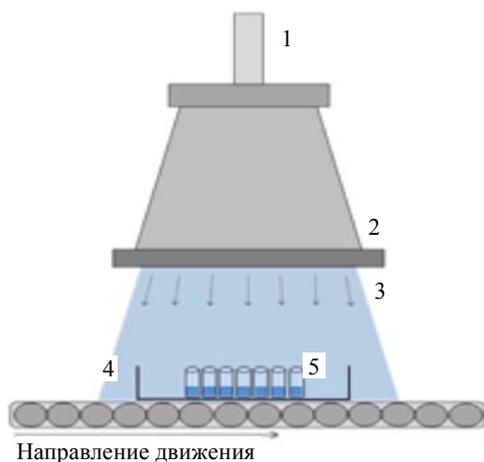


Рис. 1. Схематическое изображение экспериментальной установки на базе ускорителя электронов (ООО «Теокортекс»)

Ускоренные электроны проходят через окно ускорителя электронов (2) и через камеру (3) направляются на транспортный контейнер (4), в котором размещается облучаемый образец (5) (см. рис. 1). Образец перемещается в горизонтальном направлении с помощью конвейерной системы (6) (см. рис. 1). Поток излучения измеряется дозиметрами GEH V3000CP и CO PD (E) – 1/10/.

Для изучения влияния облучения электронным пучком на ПХ образцы раствора фермента помещали в транспортный контейнер экспериментальной установки внутри камеры ускорителя электронов (ООО «Теокортекс»). Энергия электронов в электронном пучке составляла 9,7 МэВ, а ширина развертки пучка — 60 см. Дозу излучения, поглощенную каждым образцом фермента, варьировали от 3 до 40 кГр. Контрольные образцы фермента (поглощенная доза излучения 0 кГр) помещали в контрольную комнату, изолированную специальным защитным материалом, что, в свою очередь, позволяло достичь уровня радиационного фона, разрешенного общепринятыми нормами безопасности. После облуче-

ния электронным пучком образцы ферментов подвергали спектрофотометрическому анализу с целью определения ферментативной активности ПХ.

Определение активности фермента в образцах. Активность ПХ в отношении субстрата АБТС определяли с использованием методики, разработанной Sanders et al. [20], как описано в нашей предыдущей работе [21]. Вкратце, проводили мониторинг поглощения 0,3 ммоль/л раствора АБТС, содержащего 2,5 ммоль/л H_2O_2 , в фосфатно-цитратном буфере (51 ммоль/л фосфат, 24 ммоль/л лимонной кислоты, pH 5,0) [20]. Использование фосфатно-цитратного буфера при спектрофотометрическом определении активности ПХ рекомендовано в [22]. Измерения проводили при длине волны 405 нм в течение пяти минут с помощью спектрофотометра 8453 (Agilent Deutschland GmbH, ФРГ) при температуре 25 °С в кварцевой кювете объемом 3 мл с длиной оптического пути 1 см.

Результаты и их обсуждение

После облучения исследуемых образцов ПХ электронным пучком измеряли активность ПХ по отношению к ее субстрату АБТС и сравнивали с активностью необлученного фермента. Принимая активность необлученного фермента равной 100 %, рассчитывали остаточную активность ПХ в облученных образцах. На рисунке 2 представлена зависимость остаточной ферментативной активности ПХ от поглощенной дозы излучения.

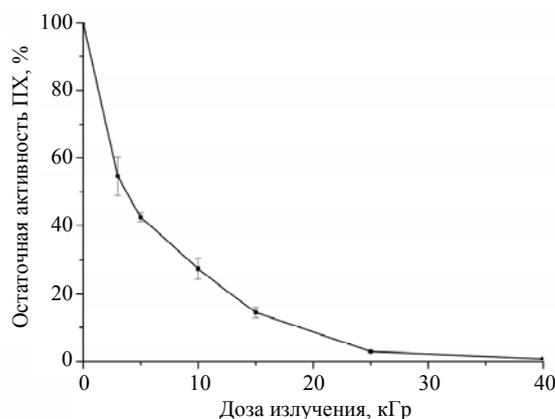


Рис. 2. Зависимость остаточной ферментативной активности ПХ в образцах после их облучения электронным пучком в ускорителе электронов ООО «Теокортекс». Поглощенная доза излучения составляла от 0 (контрольные образцы) до 40 кГр

График зависимости, изображенный на рисунке 2, показывает, что поглощение дозы излучения от 3 до 5 кГр приводило к потере ферментом около 50 % первоначальной активности. В пределах изученного нами диапазона доз излучения, мы обнаружили, что чем больше доза, тем ниже значение остаточной активности фермента. Увеличение дозы приводило к дальнейшему снижению ферментативной активности ПХ. Так, при дозе 10 кГр фермент сохранял только 30 % активности, а при дозе 15 кГр остаточная активность составляла менее 20 %. Тем не менее, следует подчеркнуть, что полная потеря ферментом активности наблюдалась только при дозе 40 кГр. Влияние ионизирующего излучения на активность ПХ зависит от вида излучения и поглощенной дозы излучения. В наших экспериментах мы изучили влияние на ферментативную активность ПХ значительных (≥ 3 кГр) доз излучения при воздействии на фермент электронного пучка с энергией электронов ~ 10 МэВ. Установлено, что в изученном диапазоне поглощенных доз излучения ферментативная активность ПХ снижается с увеличением дозы. Однако ситуация может быть иной при более низких дозах излучения. Ранее Дубровский и др. изучали влияние относительно низких (от 10^{-6} до 10^2 Гр) доз излучения на ферментативную активность ПХ и дипептидил-дипептидазы [23]. Эти авторы обнаружили, что, помимо поглощенной дозы излучения, эффект воздействия излучения на фермент зависит от типа и энергии излучения, а также от типа фермента. В случае ПХ эти авторы наблюдали небольшой активирующий эффект низких ($\sim 10^{-5}$ Гр) доз излучения плазменного фокуса с энергией < 100 кэВ, а дипептидил-дипептидаза активировалась также гамма-излучением источника ^{137}Cs – в отличие от ПХ, активность которой подавлялась этим излучением [23]. Константиновичи и др. сообщили о значительном (на ~ 50 %) возрастании активности ПХ после воздействия на этот фермент низких (0,05 Гр) доз гамма-излучения [24]. При этом более высокие ($> 0,2$ Гр) дозы излучения снижали активность ПХ. Радиационно-индуцированное снижение активности ферментов эти авторы объяснили дезорганизацией структуры фермента и деградацией его аминокислотных остатков [24].

Активность фермента связана со структурой его активного центра. Это означает, что при дозах излучения > 10 кГр и выше наблюдается разрушение активного центра фермента, а значит, и структуры фермента.

Заключение

Методом спектрофотометрии изучено влияние эффектов облучения ПХ электронным пучком с энергией ~ 10 МэВ. Установлено, что активность фермента снижается с увеличением поглощенной дозы излучения. Было замечено, что активность фермента снижалась до 50 % при значениях поглощенной дозы 3–5 кГр. При дозе 15 кГр и выше мы наблюдали десятикратное и более снижение активности фермента, которая снижалась практически до 0 при дозе 40 кГр. Полученные результаты важны для правильной интерпретации данных, полученных при работе с ферментами в биотехнологических устройствах. Результаты нашей работы могут быть полезны при разработке новых методов обработки пищевых продуктов, вакцин, а также норм безопасности для персонала, работающего вблизи ускорителей электронов.

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 23-15-00471,
<https://rscf.ru/project/23-15-00471/>*

ЛИТЕРАТУРА

1. Feng K., Divers E., Ma Y., Li J. / Appl. Environmental Microbiol. 2011. Vol. 77. P. 3507–3517.
2. Lung H.-M., Cheng Y.-C., Chang Y.-H., Huang H.-W., Yang B. B., Wang C.-Y. / Trends Food Sci. Technol. 2015. Vol. 44. № 1. P. 66–78.
3. Farkas J. / Int. J. Food Microbiol. 1998. Vol. 44. P. 189–204.
4. Fifield L. S., Pharr M., Staack D., Pillai S., Nichols L., McCoy J., Faucette T., Bisel T. T., Huang M., Hasan M. K., Perkins L., Cooley S. K., Murphy M. K. / Radiation Phys. Chem. 2021. Vol. 180. P. 109282.
5. Liu K.-K., Shan C.-X. / Light Sci. Appl. 2023. Vol. 12. P. 72.
6. Afrough B., Eakins J., Durley-White S., Dowall S., Findlay-Wilson S., Graham V., Lewandowski K., Carter D. P., Hewson R. / Sci. Rep. 2020. Vol. 10. P. 21431.
7. Cho G.-L., Ha J.-W. / Food Control. 2019. Vol. 96. P. 343–350.

8. Wang Z., Liang Z., Wei R., Wang H., Cheng F., Liu Y., Meng S. / *Virologica Sinica*. 2022. Vol. 37. P. 823–830.
9. Teichmann T., Dincklage L., Schaap L. L., Schreuder D., Blüthner R., Winkler F., Schopf S., König U., Zimmermann B., Mattausch G. / *J. Phys.: Conf. Ser.* 2023. Vol. 2443. P. 012017.
10. Fertey J., Bayer L., Kähl S., Haji R. M., Burger-Kentischer A., Thoma M., Standfest B., Schönfelder J., Portillo Casado J., Rögner F.-H., Baums C. G., Grunwald T., Ulbert S. / *Vaccines*. 2020. Vol. 8. P. 113.
11. Bhatia S. S., Pillai S. D. / *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 845514.
12. Abs M., Jongben Y., Poncelet E., Bol J.-L. / *Radiation Phys Chem.* 2004. Vol. 71. P. 285–288.
13. Cherkashina N. I., Pavlenko V. I., Abrosimov V. M., Gavrish V. M., Trofimov V. I., Budnik S. V., Churyukin R. S. / *Acta Astronautica*. 2021. Vol. 184. P. 59–69.
14. <https://ebeamservices.com/blog/gamma-vs-e-beam-vs-x-ray-a-comparison/> (дата обращения: 06.06.2024).
15. Fernandes A., Antonio A. L., Oliveira M. B. P. P., Martins A., Ferreira I. C. F. R. / *Food Chem.* 2012. Vol. 135. № 2. P. 641–650.
16. Yao Y., Zhang B., Pang H., Wang Y., Fu H., Chen X., Wang Y. / *Food Chem.* 2023. Vol. 398. P. 133875.
17. Davies P. F., Rennke H. G., Cotran R. S. / *J. Cell Sci.* 1979. Vol. 49. P. 69–86.
18. Welinder K. G. / *Eur. J. Biochem.* 1979. Vol. 96. P. 483–502.
19. Tams J. W., Welinder K. G. / *Anal. Biochem.* 1995. Vol. 228. P. 48–55.
20. Sanders S. A., Bray R. C., Smith A. T. / *Eur. J. Biochem.* 1994. Vol. 224. P. 1029–1037.
21. Ivanov Y. D., Pleshakova T. O., Shumov I. D., Kozlov A. F., Ivanova I. A., Valueva A. A., Tatur V. Y., Smelev M. V., Ivanova N. D., Ziborov V. S. / *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. P. 9022.
22. Drozd M., Pietrzak M., Parzuchowski P. G., Malinowska E. / *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol. 408. P. 8505–8513.
23. Dubrovsky V., Gazaryan I. G., Gribkov V. A., Ivanov Y. P., Kost O. A., Orlova M. A., Troshina N. N. / *J. Russ. Laser Res.* 2003. Vol. 24. № 4. P. 289–300.
24. Constantinovici M., Oancea D., Zaharescu T. / *Radiation Phys. Chem.* 2009. Vol. 78. P. 33–36.

PACS: 61.80.Fe

Effect of electron beam irradiation dose on the enzymatic activity of horseradish peroxidase

Yu. D. Ivanov¹, I. D. Shumov¹, V. S. Ziborov^{1,2}, A. N. Ableev¹, A. F. Kozlov¹, D. D. Zhdanov¹, S. V. Budnik³, R. S. Churyukin³, A. M. Tereza⁴ and A. I. Archakov¹

¹ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC)
Bd. 8, 10 Pogodinskaya st., Moscow, 119121, Russia

² Joint Institute for High Temperatures of Russian Academy of Sciences (JIHT)
Bd. 2, 13 Izhorskaya st., Moscow, 125412, Russia

³ ООО «Теокоптекс»
Bd. 6, 34, block 328, ext. ter. Pervomaiskoe settlement, Moscow, 108808, Russia

⁴ Semenov Research Center of Chemical Physics
Bd. 1, 4 Kosygina st., Moscow, 119991, Russia

Received 24.06.2024; revised 10.07.2024; accepted 26.07.2024

The effect of electron beam irradiation on horseradish peroxidase (HRP) has been studied by spectrophotometry. The range of radiation doses has been varied between 0 and 40 kGy. Samples of 0.1 μM enzyme solution have been irradiated in an electron accelerator at an electron energy of 9.7 MeV. The residual activity of the enzyme was shown to depend on the radiation dose absorbed by the HRP sample. After absorption of 3 to 5 kGy radiation dose, the enzyme retained about 50% activity, while at 40 kGy the enzyme has been found to completely lose its activity. The results obtained herein should be taken into consideration in the development of methods of food processing and vaccine material treatment employing electron beam radiation.

The data obtained are also important in the analysis of possible pathological factors arising from the action of ionizing radiation, including electron beams, on living organisms.

Keywords: electron beam; electron accelerator; horseradish peroxidase; enzymatic activity, spectrophotometry.

REFERENCES

1. Feng K., Divers E., Ma Y. and Li J. *Appl. Environmental Microbiol.* **77**, 3507–3517 (2011).
2. Lung H.-M., Cheng Y.-C., Chang Y.-H., Huang H.-W., Yang B. B. and Wang C.-Y., *Trends Food Sci. Technol.* **44** (1), 66–78 (2015).
3. Farkas J., *Int. J. Food Microbiol.* **44**, 189–204 (1998).
4. Fifield L. S., Pharr M., Staack D., Pillai S., Nichols L., McCoy J., Faucette T., Bisel T. T., Huang M., Hasan M. K., Perkins L., Cooley S. K. and Murphy M. K., *Radiation Phys. Chem.* **180**, 109282 (2021).
5. Liu K.-K. and Shan C.-X., *Light Sci. Appl.* **12**, 72 (2023).
6. Afrough B., Eakins J., Durley-White S., Dowall S., Findlay-Wilson S., Graham V., Lewandowski K., Carter D. and Hewson R., *Sci. Rep.* **10**, 21431 (2020).
7. Cho G.-L. and Ha J.-W., *Food Control* **96**, 343–350 (2019).
8. Wang Z., Liang Z., Wei R., Wang H., Cheng F., Liu Y. and Meng S., *Virologica Sinica* **37**, 823–830 (2022).
9. Teichmann T., Dincklage L., Schaap L. L., Schreuder D., Blüthner R., Winkler F., Schopf S., König U., Zimmermann B. and Mattausch G., *J. Phys.: Conf. Ser.* **2443**, 012017 (2023).
10. Fertey J., Bayer L., Kahl S., Haji R. M., Burger-Kentischer A., Thoma M., Standfest B., Schönfelder J., Portillo Casado J., Rögner F.-H., Baums C. G., Grunwald T. and Ulbert S., *Vaccines* **8**, 113 (2020).
11. Bhatia S. S. and Pillai S. D., *Front. Immunol.* **13**, 845514 (2022).
12. Abs M., Jongen Y., Poncelet E. and Bol J.-L., *Radiation Phys Chem.* **71**, 285–288 (2004).
13. Cherkashina N. I., Pavlenko V. I., Abrosimov V. M., Gavrish V. M., Trofimov V. I., Budnik S. V. and Churyukin R. S., *Acta Astronautica* **184**, 59–69 (2021).
14. <https://ebeamservices.com/blog/gamma-vs-e-beam-vs-x-ray-a-comparison/> (retrieved: 06.06.2024).
15. Fernandes A., Antonio A. L., Oliveira M. B. P. P., Martins A. and Ferreira I. C. F. R., *Food Chem.* **135** (2), 641–650 (2012).
16. Yao Y., Zhang B., Pang H., Wang Y., Fu H., Chen X. and Wang Y., *Food Chem.* **398**, 133875 (2023).
17. Davies F., Rennke H. G. and Cotran R. S., *J. Cell Sci.* **49**, 69–86 (1979).
18. Welinder K. G., *Eur. J. Biochem.* **96**, 483–502 (1979).
19. Tams J. W. and Welinder K. G., *Anal. Biochem.* **228**, 48–55 (1995).
20. Sanders S. A., Bray R. C. and Smith A. T., *Eur. J. Biochem.* **224**, 1029–1037 (1994).
21. Ivanov Y. D., Pleshakova T. O., Shumov I. D., Kozlov A. F., Ivanova I. A., Valueva A. A., Tatur V. Y., Smelev M. V., Ivanova N. D. and Ziborov V. S., *Sci. Rep.* **10**, 9022 (2020).
22. Drozd M., Pietrzak M., Parzuchowski G. and Malinowska E., *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 8505–8513 (2016).
23. Dubrovsky V., Gazaryan I. G., Gribkov V. A., Ivanov Y., Kost O. A., Orlova M. A. and Troshina N. N., *J. Russ. Laser Res.* **24** (4), 289–300 (2003).
24. Constantinovici M., Oancea D. and Zaharescu T., *Radiation Phys. Chem.* **78**, 33–36 (2009).