

НАТАЛЬЯ ШАМИЛЬЕВНА ЛЕБЕДЕВА

доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории физической химии растворов макроциклических соединений, Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН (Иваново, Российская Федерация)
nsl@isc-ras.ru

ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА МАЛЬКОВА

кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории физической химии растворов макроциклических соединений, Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН (Иваново, Российская Федерация)
ema@isc-ras.ru

ЮРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ ГУБАРЕВ

кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории физической химии растворов макроциклических соединений, Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН (Иваново, Российская Федерация)
gua@isc-ras.ru

АНАТОЛИЙ ИВАНОВИЧ ВЬЮГИН

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической химии растворов макроциклических соединений, Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН (Иваново, Российская Федерация)
aiv@isc-ras.ru

**СОСТОЯНИЕ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В РАСТВОРАХ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИМЕТИЛФОРМАМИДА***

Взаимодействие между бычьим сывороточным альбумином (БСА) и диметилформамидом (ДМФА) было изучено с помощью флуоресцентной и спектроскопии отражения, вискозиметрии и калориметрии титрования. Было установлено, что ДМФА не образует комплексов с БСА. При концентрации ДМФА ниже 0,2 М БСА сохраняет нативную эллипсоидную конформацию, при концентрации ДМФА выше 0,25 М структура БСА переходит к форме закрученного статистического клубка.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, диметилформамид, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия отражения

Альбумин представляет собой самую большую фракцию белков плазмы крови человека – 55–65 %. Основная функция альбумина в организме человека – поддержание коллоидно-онкотического давления крови и транспорт билирубина, различных гормонов, жирных кислот, ионов металлов, лекарственных веществ и метаболитов. Физиологические свойства альбумина имеют огромное значение. В настоящее время проводится большое количество исследований, направленных на выявление зависимости между глобальными и локальными конформационными изменениями в белковой глобуле и способностью сывороточного альбумина крови связывать различного рода метаболиты [10], [14]. Например, нарушения углеводородного обмена при сахарном диабете обусловлены появлением в организме атипичных метаболитов, связываемых белком и вызывающих изменения его конформации [9]. Также показано, что состояние связывающих центров альбумина изменяется при сердечно-сосудистых заболеваниях (инфаркт миокарда, ИБС) [1], болезнях печени (гепатит, цирроз) [2], острых хирургических состояниях (перитонит) [2], оф-

тальмопатологии (катаракта, глаукома). Стойкие нарушения свойств альбуминовых центров выявлены при психических заболеваниях (некоторые формы шизофрении и депрессии) [12]. Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев метаболиты и лекарственные препараты являются водонерастворимыми соединениями. Поэтому *in-vitro* исследования проводят в присутствии органических растворителей: ДМСО, ДМФА, этанола [1], [7], [8]. При этом влиянием органических растворителей на состояние белка пренебрегают. Целью данной работы являлось изучение влияния смешанного растворителя вода – NaCl – ДМФА на состояние альбумина в растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Альбумин бычий, фракция V, для биохимии, рН 7,0 «Acros Organics» использовали без дополнительной очистки. NaCl (ЧДА) дважды перекристаллизован из водного раствора и высушен над вакуумом при комнатной температуре. Растворы альбумина были получены с использованием бидистиллированной воды. Концентрация

БСА в водном растворе NaCl (0,05 М) 0,08 % мас. ДМФА очищали с использованием стандартной методики [15].

Спектры флуоресценции и отражения регистрировали с помощью спектрофлуориметра Avantes AvaSpec-2048.

Кинематические вязкости водных растворов, содержащих альбумин, NaCl, ДМФА, определяли на капиллярном вискозиметре, сбор и анализ данных осуществлялся с помощью ПК. Надежность измерений проверяли на основании кинематической вязкости воды, которая при 298,15 К составила 0,8942 мПа × с, что согласуется с литературными данными [6].

Калориметрические измерения проводились с помощью дифференциального автоматического калориметра титрования [3]. ДМФА автоматически вводился с помощью дозатора в раствор альбумина с концентрацией 0,08 % мас. в воде с 0,05 М NaCl, находящегося в калориметрической ячейке. Также был проведен эксперимент для определения тепловых эффектов разбавления ДМФА при титровании их в воде с 0,05 М NaCl. Обработка экспериментальных данных осуществлялась в соответствии с методикой [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор в качестве среды смешанного растворителя вода – ДМФА, содержащего 0,05 моль/л NaCl, обусловлен высокой сольватирующей способностью ДМФА по отношению к ароматическим и алифатическим органическим соединениям, а также неограниченной растворимостью в воде. Добавление NaCl указанной концентрации нивелирует эффект полиэлектролитного набухания, как было показано в предыдущей работе [4]. Кроме того, ДМФА в отличие от ДМСО и этанола при одинаковом соотношении *органический растворитель: водный раствор белка* приводит к меньшему тушению флуоресценции БСА (рис. 1).

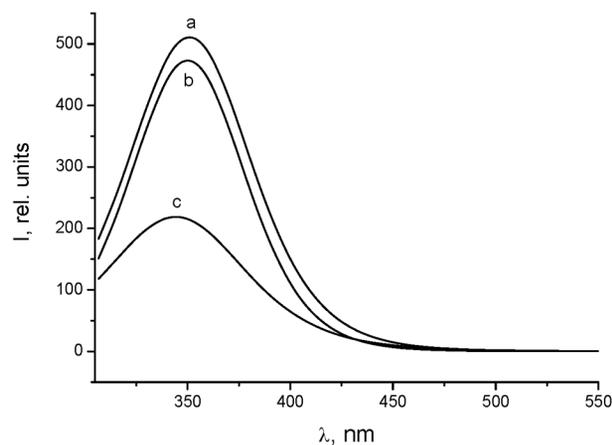


Рис. 1. Спектры флуоресценции ($\lambda_{ex} = 295$ нм) а) БСА в водном растворе 0,05 М NaCl; б) БСА в водно-органическом растворе 0,05 М и 0,06 М ДМФА; в) БСА в водно-органическом растворе 0,05 М и 0,06 М ДМСО

При длине волны накачки 295 нм флуоресценция белков обусловлена наличием триптофановых остатков, расположенных внутри субдоменов IV и IIА. Тушение флуоресценции свидетельствует об изменении конформационного состояния молекулы белка, при котором изменяется характер взаимодействия триптофановых остатков БСА с сольватным окружением [13]. Следует отметить, что отсутствие изменений в спектрах флуоресценции белка при добавлении ДМФА до концентрации 0,2 моль/л (рис. 2) свидетельствует об отсутствии влияния ДМФА на состояние триптофановых остатков молекулы альбумина. Однако на основании данных только флуоресцентной спектроскопии говорить о сохранении нативной конформации белка невозможно. Поэтому были проведены исследования гидродинамических свойств раствора белка с различным содержанием ДМФА (табл. 1, рис. 3) и оценены тепловые эффекты взаимодействия ДМФА с белком. Рассмотрим полученные данные. Увеличение концентрации ДМФА в воде и растворах белка приводит к увеличению кинематической вязкости растворов.

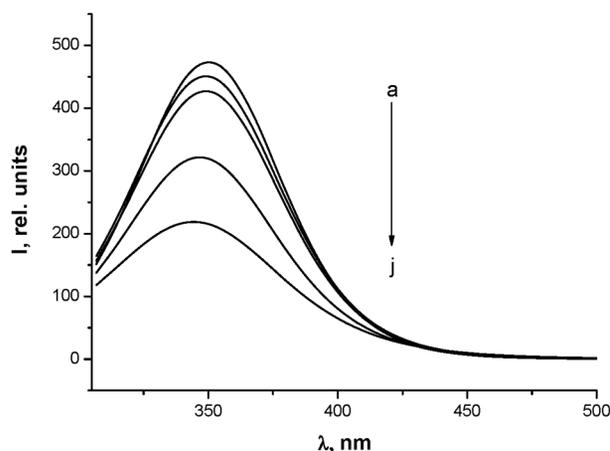


Рис. 2. Спектры флуоресценции ($\lambda_{ex} = 295$ нм) БСА в водном растворе 0,05 М NaCl при концентрациях ДМФА: 0, 0,13, 0,19, 0,25, 0,31 М

Для выделения эффекта влияния ДМФА на БСА была вычислена разница кинематической вязкости воды и растворов БСА при добавлении различного количества ДМФА ($\Delta v = v_b - v_{БСА}$) (таблица).

Изменение кинематической вязкости воды (v_b) и БСА ($v_{БСА}$) при изменении содержания ДМФА

С (ДМФА)	$v_b \pm 0,001$, мм ² /с	$N_{БСА} \pm 0,001$, мм ² /с	$\Delta v = v_{БСА} - v_b$
0,06	0,989	0,900	0,002
0,13	0,910	0,911	0,001
0,19	0,924	0,924	0
0,25	0,934	0,937	-0,002
0,31	0,935	0,945	0,10
0,39	0,941	0,960	0,19

Как видно из представленных на рис. 3 данных, добавление ДМФА в раствор БСА до концентрации 0,25 моль/л приводит к монотонному уменьшению $\Delta\nu$, что свидетельствует о приобретении молекулой белка эллипсоидной формы. Дальнейшее увеличение содержания ДМФА приводит к скачкообразному увеличению вязкости.

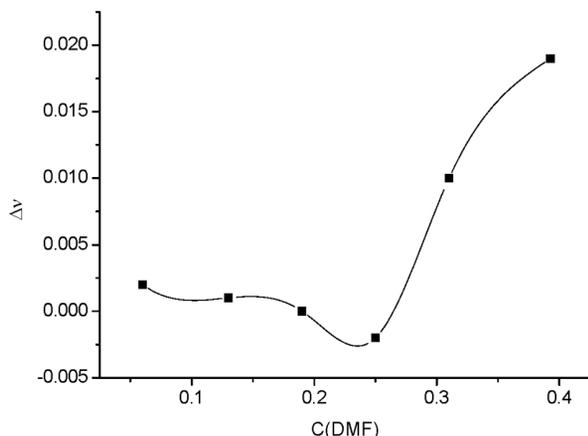


Рис. 3. Зависимость кинематической вязкости водного раствора БСА 0,05 М NaCl при изменении концентрации ДМФА

Это может являться следствием увеличения молекулярной массы образующегося полимерного комплекса или, что более вероятно, изменения формы альбумина от вытянутой к форме закрученного статистического клубка. Таким образом, при добавлении ДМФА в количестве 0,3 моль/л, как свидетельствуют результаты гидродинамических и спектральных исследований, БСА теряет нативную конформацию. Как было сказано ранее, увеличение вязкости раствора белка при добавлении ДМФА может быть связано с увеличением молекулярной массы за счет комплексообразования белка с ДМФА или с конформационными изменениями белковой молекулы. Для уточнения характера взаимодействия БСА с ДМФА в H_2O было проведено калориметрическое титрование раствора белка диметилформамидом. До достижения концентрации ДМФА 0,25 моль/л калориметрическая кривая имеет монотонный характер без четких точек переги-

ба, что свидетельствует об отсутствии процессов образования термодинамически устойчивых комплексов белка с ДМФА. Наличие флуктуации экспериментальных точек связано с тем, что тепловой эффект холостого опыта разведения ДМФА в воде значительно превышает тепловой эффект взаимодействия ДМФА с белком, что приводит к погрешности определения теплового эффекта взаимодействия.

Изменение в спектрах отражения дает дополнительную информацию о состоянии молекул БСА в растворе. Как видно на рис. 4, интенсивность спектра отражения БСА в области 400 нм увеличивается при добавлении ДМФА в концентрации до 0,25 моль/л. При дальнейшем добавлении ДМФА происходит уменьшение интенсивности пика в спектре отражения. Таким образом, исходя из данных, полученных из гидродинамических характеристик растворов белка и спектров отражения, можно сделать вывод о том, что при добавлении ДМФА менее 0,2 моль/л белок существует в растворе в форме вытянутого эллипса, близкой к нативной конформации, о чем свидетельствуют уменьшение $\Delta\nu$ и увеличение интенсивности пиков на спектрах отражения.

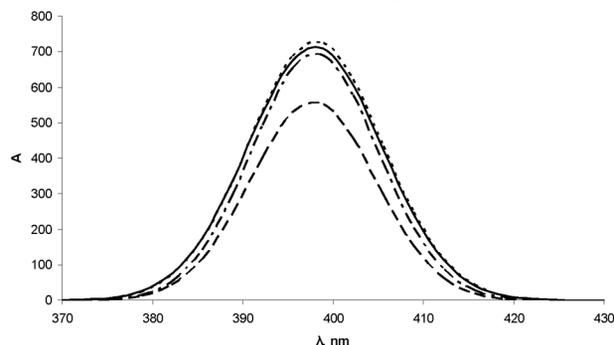


Рис. 4. Спектры отражения БСА, содержащая: 0 М ДМФА (пунктирная линия), 0,13 М ДМФА (штрихпунктирная линия), 0,19 М ДМФА (пунктирная линия) и 0,25 М ДМФА (сплошная линия)

При добавлении ДМФА свыше 0,25 моль/л белок приобретает форму закрученного статистического клубка, что приводит к скачкообразному увеличению $\Delta\nu$ и уменьшению интенсивности спектров отражения.

* Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований № 12-03-97524_p_центр_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Filippov A., Artamonova M., Rudakova M., Gimatdinov R., Skirda V. Self-diffusion in a hyaluronic acid-albumin-water system as studied by NMR // *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2012. Vol. 50. P. 114–119.
2. Gruzunov Y., Zaks I., Moroz V., Dobretsov G., Komarova M., Meshcheriakov G. Serum albumin: properties and functions and their evaluation in emergencies // *Anesteziologija i reanimatologija*. 2004. № 6. P. 68.
3. Lebedeva N., Michailovsky K., V'yugin A. A differential automatic titration calorimeter // *Russian J. of Phys. Chem. A*. 2001. Vol. 75. № 6. P. 1031–1033.
4. Lebedeva N., Popova T., Kozbial M., Wszelaka-Rylik M., Gubarev Y., Gierycz P. Influence of complex formation with tetraantraquinoporphyrines and tetrasulphophthalocyanine on thermal stability of bovine serum albumin // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2011. Vol. 15. № 04. P. 223–229.
5. Bhagavan N. V. et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction // *Clinical Chemistry*. 2003. Vol. 49. № 4. P. 581–585.
6. CRC Handbook of Chemistry and Physics. N. Y.: CRC Press, 2003.

7. Ding F., Li N., Han B., Liu F., Zhang L., Sun Y. The binding of CI Acid Red 2 to human serum albumin: determination of binding mechanism and binding site using fluorescence spectroscopy // *Dyes and Pigments*. 2009. Vol. 83. № 2. P. 249–257.
8. Durmus M., Yaman H., Göl C., Ahsen V., Nyokong T. Water-soluble quaternized mercaptopyrindine-substituted zinc-phthalocyanines: synthesis, photophysical, photochemical and bovine serum albumin binding properties // *Dyes and Pigments*. 2011. Vol. 91. № 2. P. 153–163.
9. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes // *Diabetes & metabolism*. 2012. Vol. 38. № 2. P. 171–178.
10. Jain S., Kumar C. V., Kalonia D. S. Protein/Peptide Interactions as Probed by Tryptophan Fluorescence: Serum Albumins and Enkephalin Metabolites // *Pharmaceutical research*. 1992. Vol. 9. № 8. P. 990–992.
11. Schwarz F., Reinisch T., Hinz H., Surolia A. Recommendations on measurement and analysis of results obtained on biological substances using isothermal titration calorimetry // *Pure and Applied Chemistry*. 2008. Vol. 80. № 9. P. 2025–2040.
12. Schwarz M. J. et al. Blood cerebrospinal fluid barrier impairment as indicator for an immune process in schizophrenia // *Neuroscience letters*. 1998. Vol. 253. № 3. P. 201–203.
13. Valeur B., Berberan-Santos M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2013.
14. Xue L., Zou F., Zhao Y., Huang X., Qu Y. Nitrile group as infrared probe for the characterization of the conformation of bovine serum albumin solubilized in reverse micelles // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012. Vol. 97. P. 858–863.
15. Weissberger A., Proskauer A., Riddick J., Toops E. *Organic solvents. Physical properties and methods of purification*. N. Y.: Interscience publishers Inc., 1955.

Lebedeva N. Sh., G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of RAS (Ivanovo, Russian Federation)
Mal'kova E. A., G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of RAS (Ivanovo, Russian Federation)
Gubarev Yu. A., G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of RAS (Ivanovo, Russian Federation)
V'yugin A. I., G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of RAS (Ivanovo, Russian Federation)

DEPENDENCE OF BOVINE SERUM ALBUMINE STATE IN SOLUTIONS WITH DIFFERENT DIMETHYLFORMAMIDE CONCENTRATION

The interaction between bovine serum albumin (BSA) and dimethylformamide (DMF) was studied by means of fluorescence and reflection spectroscopy, viscometry and isothermal titration calorimetry. It was found out that DMF does not form stable complexes with BSA. If the concentration of DMF is below 0,2 M, then BSA keeps its native form and exists in solutions in stretched ellipse forms, if the DMF concentration is above 0,25 M, then BSA shapes into statistical coil form.

Key words: bovine serum albumin, dimethylformamide, fluorescence spectroscopy, reflection spectroscopy

REFERENCES

1. Filippov A., Artamonova M., Rudakova M., Gimatdinov R., Skirda V. Self-diffusion in a hyaluronic acid-albumin-water system as studied by NMR // *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2012. Vol. 50. P. 114–119.
2. Gryzunov Y., Zaks I., Moroz V., Dobretsov G., Komarova M., Meshcheriakov G. Serum albumin: properties and functions and their evaluation in emergencies // *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2004. № 6. P. 68.
3. Lebedeva N., Michailovsky K., V'yugin A. A differential automatic titration calorimeter // *Russian J. of Phys. Chem. A*. 2001. Vol. 75. № 6. P. 1031–1033.
4. Lebedeva N., Popova T., Kozbial M., Wszelaka-Rylik M., Gubarev Y., Gierycz P. Influence of complex formation with tetraaquaquinoporphyrines and tetrasulphophthalocyanine on thermal stability of bovine serum albumin // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2011. Vol. 15. № 04. P. 223–229.
5. Bhagavan N. V. et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction // *Clinical Chemistry*. 2003. Vol. 49. № 4. P. 581–585.
6. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. N. Y.: CRC Press, 2003.
7. Ding F., Li N., Han B., Liu F., Zhang L., Sun Y. The binding of CI Acid Red 2 to human serum albumin: determination of binding mechanism and binding site using fluorescence spectroscopy // *Dyes and Pigments*. 2009. Vol. 83. № 2. P. 249–257.
8. Durmus M., Yaman H., Göl C., Ahsen V., Nyokong T. Water-soluble quaternized mercaptopyrindine-substituted zinc-phthalocyanines: synthesis, photophysical, photochemical and bovine serum albumin binding properties // *Dyes and Pigments*. 2011. Vol. 91. № 2. P. 153–163.
9. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes // *Diabetes & metabolism*. 2012. Vol. 38. № 2. P. 171–178.
10. Jain S., Kumar C. V., Kalonia D. S. Protein peptide Interactions as Probed by Tryptophan Fluorescence: Serum Albumins and Enkephalin Metabolites // *Pharmaceutical research*. 1992. Vol. 9. № 8. P. 990–992.
11. Schwarz F., Reinisch T., Hinz H., Surolia A. Recommendations on measurement and analysis of results obtained on biological substances using isothermal titration calorimetry // *Pure and Applied Chemistry*. 2008. Vol. 80. № 9. P. 2025–2040.
12. Schwarz M. J. et al. Blood cerebrospinal fluid barrier impairment as indicator for an immune process in schizophrenia // *Neuroscience letters*. 1998. Vol. 253. № 3. P. 201–203.
13. Valeur B., Berberan-Santos M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2013.
14. Xue L., Zou F., Zhao Y., Huang X., Qu Y. Nitrile group as infrared probe for the characterization of the conformation of bovine serum albumin solubilized in reverse micelles // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012. Vol. 97. P. 858–863.
15. Weissberger A., Proskauer A., Riddick J., Toops E. *Organic solvents. Physical properties and methods of purification*. N. Y.: Interscience publishers Inc., 1955.

Поступила в редакцию 30.05.2014