Известия НАН Армении, Физика, т.58, №4, с.643–651 (2023) УДК 541.64 DOI:10.54503/0002-3035-2023-58.4-643

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ЭРИТРОЗИНОМ В ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА

М.А. ПАРСАДАНЯН^{*}, М.А. ШАГИНЯН, С.В. ГРИГОРЯН, М.С. МИКАЕЛЯН Г.А. ПОГОСЯН, В.П. КАЛАНТАРЯН, П.О. ВАРДЕВАНЯН

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

*e-mail: marine.parsadanyan@ysu.am

(Поступила в редакцию 17 июля 2023 г.)

Исследовано взаимодействие пищевого консерванта и красителя эритрозина В с бычьим сывороточным альбумином (БСА) под воздействием электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) с частотами 41.8 и 51.8 ГГц методом УФ-денатурации, а также спектроскопическими (поглощение, флуоресценция, круговой дихроизм (КД)) методами. Показано, что облучение ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц приводит к стабилизации комплекса БСА-эритрозин В. В то же время, параметры денатурации комплекса при облучении раствора БСА с частотой 41.8 ГГц, в пределах ошибки, не отличаются от таковых, полученных для необлученных образцов. Показано также, что под влиянием облучения частотой 51.8 ГГц, изменения конформации БСА не обнаруживается, в то время как в случае комплекса БСА-эритрозин В имеет место изменение конформации. При этом процесс комплексообразования является термодинамически выгодным и под влиянием ММ ЭМВ реализуется за счет дополнительных водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между БСА и эритрозином В.

1. Введение

Белки являются важной составляющей в процессе жизнедеятельности клетки, при этом, в большинстве случаев они становятся мишенями для разнообразных лекарственных препаратов и различных химических веществ, поступающих в организм тем или иным способом. Среди многочисленных белков особое место занимают сывороточные альбумины, которые являются основными растворимыми белками в плазме крови. Альбумины также вызывают большой интерес, благодаря их способности обратимо связываться с различными высоко- и низкомолекулярными веществами, которые они переносят по циркуляторной системе. Среди таких веществ могут быть и лекарственные препараты, и пищевые добавки, такие, как красители, консерванты и т.д. [1–4].

Одним из известных пищевых красителей и биодобавок является эритрозин В, который имеет красный цвет и широко используется в промышленности. Эритрозин (тетра-индо-флуоресцеин, динатриевая соль 3,6-дигидрокси-2,4,5,7-тетраиод-9-(2-карбоксифенил) ксантена) является органическим веществом с химической формулой C₂₀H₆I₄Na₂O₅ (структура приводится на рис.1) и производной



Рис.1. Химическая структура эритрозина В.

флуоресцеина. Использование этого вещества в пище в США не запрещено, в то время как в РФ не разрешено [5–7]. Эритрозин В растворяется в воде и имеет высокую фосфоресценцию [7]. Это вещество влияет на выделение и поглощение нейротрансмиттеров и приводит к хромосомным аберрациям при наличии экзогенной метаболической активации [8, 9]. При попадании в организм эритрозин прежде всего взаимодействует с альбумином как транспортный белок, поэтому и интересно изучить, будет ли подвергаться конформационным изменениям альбумин при взаимодействии с эритрозином [5–9].

Электромагнитные волны миллиметрового диапазона (MM ЭMB) (30–300 ГГц или 1–10 мм) на сегодняшний день являются важным физическим фактором антропогенного происхождения, поскольку их естественный фон на Земле невелик. По этой причине живые системы не обладают серьезными адаптационными средствами к этому фактору, который, в свою очередь, действует на живые объекты, находящиеся на любом уровне организации [10–12]. По сей день существует небольшое количество работ, посвященных влиянию MM ЭMB на биологические системы, находившиеся на различном уровне организации. Целью настоящей работы является выявление конформационных изменений комплексов вышеотмеченного лиганда с альбумином под влиянием электромагнитных волн миллиметрового диапазона. В работе проводится модельное исследование особенностей взаимодействия эритрозина В с БСА под воздействием MM ЭMB с частотами 41.8 и 51.8 ГГц.

2. Материалы и методы исследований

В экспериментах использованы 1% раствор БСА, эритрозин В («Sigma», США), физиологический раствор. Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрацию эритрозина В определяли спектрофотометрически, с использованием коэффициента экстинкции $\varepsilon_{535} = 107000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Измерения проводились в термостатируемых ячейках, с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см, объемом 3 мл и герметически закрывающимися крышками. Статистическая обработка данных произведена с помощью t-критерия Стьюдента.

Облучение растворов БСА проведено генератором Г4-141 («Исток», Фрязино, РФ) с рабочим интервалом частот 37.5–53.5 ГГц и плотностью потока мощности ≈ 5 мкВт/см² при мощности на выходе 8 мВт. Данное значение плотности потока мощности регистрировали на месте расположения образца. Мощность генератора на выходе измеряли термисторной головкой М5-49 и ваттметром М3-

10А («Исток», Фрязино, РФ). Частоту выходного сигнала контролировали волномером CH2-25 («Исток», Фрязино, РФ). Частота стабильности генератора в постоянном волновом режиме была равна ± 15 МГц. Облучение растворов образцов проводилось в дальней зоне пирамидальной антенны с апертурой 32 × 32 мм на расстоянии 250 мм от излучающей плоскости антенны. Электромагнитное поле было гомогенным. Образец облучали со стороны верхней части стеклянного контейнера с диаметром 6 см, где толщина раствора составляла 1 мм, что позволяло лучам полностью проникать в объем раствора. Облучение образца проводилось в чашках Петри, покрытых тонкой проницаемой оболочкой, что препятствует испарению воды в процессе облучения. Удельная скорость поглощения (SAR), рассчитанная по методу, описанному в работе [13], равняется 20 мкВт/кг, что делает невозможным любой термический эффект. С другой стороны, ложно-облучались контрольные растворы, с которыми сравнивали облученные образцы. С целью получения ложно-облученных контрольных образцов готовились растворы, которые находились в зоне облучения в течение 1-ого часа, при этом, генератор был включен, но выходная мощность приравнивалась нулю. Облучения проводились частотами 41.8 и 51.8 ГГц. Данный выбор обусловлен тем, что частоты 41.8–42.2 ГГц значительно воздействуют на биологические системы [14], а частота 51.8 ГГц является резонансной частотой для молекулярной структуры воды [15].

Исследования проводились методами УФ-денатурации, флуоресцентной и КД спектроскопии. Облученные и ложно-облученные (необлученные) комплексы БСА с эритрозином В помещались в ячейки UV–VIS спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 365 (США) и температуру растворов повышали в кюветах с помощью устройства, контролирующего температуру до 90°С со скоростью повышения 0.5°С/мин. Комплексы приготовляли, добавляя к раствору эритрозина В облученные и необлученные растворы БСА. Концентрационное соотношение эритрозин/БСА комплексов равно 1/10. Термическая денатурация начиналась от 50°С и продолжалась до 90°С. При каждом шаге (через каждую минуту) значения температуры и соответствующей абсорбции фиксировались на ПК. Значения поглощений фиксировали при длине волны $\lambda = 280$ нм. После получения всех данных, были построены кривые денатурации – зависимости степени денатурации $(1-\theta)$ от температуры T. Методология построения кривых денатурации описана в работе [16]. Из кривых денатурации определены параметры денатурации – температура денатурации T_m и ширина интервала денатурации ΔT . По изменениям этих значений можно судить о вариациях термостабильности комплексов.

Из кривых поглощения рассчитаны параметры связывания — константа связывания (K) и число мест связывания с лигандом (n). Параметры связывания рассчитаны согласно уравнению Скетчарда:

$$\frac{1}{C_{\text{free}}} \times \frac{C_{\text{bound}}}{C_{\text{BSA}}} = nK - K \frac{C_{\text{bound}}}{C_{\text{BSA}}},\tag{1}$$

где C_{bound} и C_{free} являются концентрациями связанного и свободного красителя соответственно, C_{BSA} – полная концентрация белка, K – константа связывания и n число мест связывания. Концентрации свободного и связанного красителя рассчитаны с помощью максимального поглощения при фиксированной длине волны.

Флуоресцентные измерения были проведены на спектрофлуориметре Cary

Eclipse (Австралия). Возбуждение образца проведено при длине волны 535 нм. Спектры флуоресценции регистрировались в интервале $520 \le \lambda \le 700$ нм. После регистрации спектра флуоресценции чистого лиганда его раствор титрировали необлученным и облученным растворами БСА, при концентрационных соотношениях лиганд/БСА = 1/2-1/10. Термодинамические параметры рассчитаны по следующим уравнениям:

$$\ln K_{SV} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \,. \tag{2}$$

Из уравнения (2) получены значения ΔH^0 и ΔS^0 , а значение ΔG^0 рассчитано из следующих уравнений:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0, \tag{3}$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{SV}. \tag{4}$$

Измерения кругового дихроизма (КД) проведены на спектрофотометре OlisTM DSM20 КД (США). Спектры КД растворов БСА регистрировали в интервале $200 \le \lambda \le 350$ нм. После регистрации спектров раствора, облученного и необлученного БСА раствор белка титрировали раствором эритрозина В. Концентрационное соотношение лиганд/БСА варьировало от 1/10 до 1/2.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.2 приведены кривые денатурации комплексов БСА с эритрозином В, и как видно, по сравнению с необлученным комплексом, облучение раствора БСА приводит к стабилизации всего комплекса, что отражается сдвигом кривой денатурации к более высоким температурам. При этом следует отметить, что при облучении белка частотой 41.8 ГГц сдвиг температуры денатурации (T_m) небольшой и составляет около 1°С, в то время как при облучении частотой 51.8 ГГц (резонансной для воды частотой) разница температур денатурации составляет около 3°С. В табл.1 приведены значения параметров денатурации – температуры денатурации и ширины интервала денатурации (ΔT). Из данных, приведенных в табл.1, выявляется, что значение ширины интервала денатурации при облучении комплекса частотой 41.8 ГГц практически не меняется, по сравнению с таковой без облучения. При облучении же комплекса БСА-эритрозин В частотой 51.8



Рис.2. Кривые денатурации комплексов БСА-эритрозин В без облучения ММ ЭМВ (1), при облучении ММ ЭМВ частотой 41.8 ГГц (2) и при облучении ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц (3).

	БСА- эритрозин В	БСА-эритрозин В, ча- стота 41.8 ГГц	БСА-эритрозин В, частота 51.8 ГГц
$T_{\rm m}$ (°C)	74.5 ± 0.5	75.3 ± 0.5	77.5 ± 0.4
ΔT (°C)	6.6 ± 0.1	6.5 ± 0.2	7.1 ± 0.1

Табл.1. Значения параметров денатурации комплексов БСАэритрозин В при облучении ММ ЭМВ и без облучения

ГГц, значение ΔT увеличивается почти на 4°C градуса. Это свидетельствует о том, что облучение частотой 51.8 ГГц приводит к большей стабилизации комплекса БСА-эритрозин В и соответственно обе параметры денатурации повышаются.

Проведены также исследования поглощения методом абсорбционной спектроскопии. Поскольку из кривых денатурации выявлено, что облучение ММ ЭМВ частотой 41.8 ГГц не приводит ко значительным изменениям, то далее частота 41.8 ГГц не рассматривается (при всех методах исследования). Получены спектры поглощения при титровании раствора эритрозина В раствором облученного (рис.3а) и необлученного БСА (рис.3b).



Рис.3. Спектры поглощения эритрозина В при добавлении раствора (а) облученного БСА и (b) необлученного БСА.

Как видно из приведенного рисунка, при взаимодействии эритрозина В с БСА на спектрах поглощения появляется изобестическая точка, что свидетельствует о том, что эритрозин В находится в двух состояниях – свободном и связанном [6]. При титровании раствора эритрозина В раствором необлученного БСА, спектры поглощения сдвигаются в длинноволновую область, при этом, максимум поглощения чистого эритрозина В регистрируется при длине волны 527 нм, а связанного – при 538 нм. При этом, максимумы поглощения в ходе титрирования уменьшаются. При облучении же раствора БСА ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц наблюдается сдвиг максимума спектров поглощения в длинноволновую область до 549 нм. В данном случае максимумы спектров поглощения понижаются больше, по сравнению с необлученным образцом.

	$K, M^{-1}, \times 10^5$	n
БСА-эритрозин В	3.2 ± 0.1	5
БСА-эритрозин В с облучением	4.2 ± 0.2	6

Табл.2. Значения параметров связывания эритрозина В с БСА без облучения и под воздействием облучения ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц

В табл.2 приведены значения константы связывания и мест связывания без облучения и под влиянием облучения ММ ЭМВ. Из данных, представленных в табл.2 видно, что сродство эритрозина В с БСА достаточно велико, при этом, облучение ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц приводит к увеличению значения данного параметра. Однако следует отметить, что в работах [5, 6] рассчитаны значения этого параметра и имеет место некоторый диссонанс. В работе [17] выявлены два способа связывания эритрозина В с БСА. Спектры поглощения эритрозина В при добавлении раствора (а) облученного БСА и (b) необлученного БСА.

Для подтверждения вышесказанного, проведены также исследования по методу флуоресцентной спектроскопии. Получены спектры флуоресценции (спектры флуоресценции не приводятся), на основании которых построены кривые Штерна–Вольмера (рис.4) и определено значение K_{SV} (табл.3). Из значений K_{SV}

	БСА-эритрозин В, л/моль, ×10 ³	БСА-эритрозин В при облучении ча- стотой 51.8 ГГц, л/моль, ×10 ³
25°C	8.7	9.0
35°C	4.9	5.1
45°C	2.7	3.2

Табл.3. Значения коэффициента Штерна-Вольмера

становится очевидным, что облучение ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц приводит к возрастанию этого параметра, что свидетельствует о том, что интенсивность флуоресценции эритрозина В уменьшается при взаимодействии с БСА. При облучении раствора БСА уменьшение интенсивности флуоресценции больше, как это



Рис.4. Кривые Штерна–Вольмера при температурах $l - 25^{\circ}$ С, $2 - 35^{\circ}$ С и кривая $3 - 45^{\circ}$ С. Кривые соответствуют (а) образцу без облучения ММ ЭМВ и (b) – влиянию облучения ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц.

видно из значения K_{SV} . Кривые Штерна–Вольмера построены при трех температурах, чтобы, во-первых, определить термодинамические параметры и, во-вторых, убедиться, что образуется комплекс, т.е. тушение статическое. Термодинамические параметры рассчитаны как в [2]. На основании полученных данных, приведенных в табл.3, построены кривые зависимости $\ln K_{SV}$ от 1/T(рис.5, кривые *I* и *2*).



Рис.5. Зависимости $\ln K_{SV}$ от 1/T: кривая 1 соответствует образцу без облучения, а кривая 2 – влиянию облучения ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц.

Значения термодинамических параметров обобщены в табл.4, которые свидетельствуют о том, что изменение энтальпии – ΔH^0 отрицательное при облучении ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц, что означает, что возможно образуются и возникают дополнительные водородные связи и ван-дер-ваальсовые взаимодействия между БСА и эритрозином В, вследствие облучения ММ ЭМВ. С другой стороны, значения изменений ΔS^0 почти не меняются. Изменение свободной энергии Гиббса – ΔG^0 отрицательное и в отсутствие и в присутствии ММ ЭМВ. Последний факт свидетельствует о том, что комплексообразование термодинамически выгодный процесс.

	БСА-эритрозин В	БСА-эритрозин В с облучением
ΔH^0 , кДж/моль	-46.3	-40.75
ΔG^0 , кДж/моль	-21.7	-21.92
ΔS^0 , Дж/(мольК)	-79.8	-79.9

Табл.4. Значения термодинамических параметров комплексов БСА-эритрозин В без облучения и под влиянием облучения ММ ЭМВ, частотой 51.8 ГГц

Для того, чтобы выявить, происходят ли конформационные изменения молекулы БСА при облучении ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц, проведены исследования методом КД спектроскопии (рис.6). Как видно из приведенного рисунка в случае отсутствия облучения спектры КД совпадают, что свидетельствует о том, что эритрозин В взаимодействует с БСА практически без конформационных изменений БСА, в то время как под влиянием облучения ММ ЭМВ частотой 51.8 ГГц спектр КД комплекса БСА-эритрозин В измненяется. Мы полагаем, что если само облучение не меняет конформацию БСА (рис.6а, кривая *1*), то связывание эритрозина В с облученным БСА ММ ЭМВ приводит к конформационному изменению белка.



Рис.6. Спектры КД БСА (кривая 1) и комплекса БСА-эритрозин В (кривая 2) при концентрационном соотношении лиганд/БСА – 1/2: (а) облученный БСА с эритрозином В с частотой 51.8 ГГц и (b) спектры КД необлученного БСА и его комплекса с эритрозином В.

4. Заключение

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что облучение ММ ЭМВ резонансной для молекулярной структуры воды частотой 51.8 ГГц приводит к тому, что комплекс БСА-эритрозин В стабилизируется, что сопровождается конформационными изменениями комплекса. Исследования методом УФ-денатурации показывают, что облучение ММ ЭМВ приводит к стабилизации комплекса БСА-эритрозин В, однако, параметры денатурации при облучении раствора БСА частотой 41.8 ГГц в пределах ошибки не отличаются от таковых без облучения. Это дает основание полагать, что значительному изменению подвергаются параметры денатурации комплекса при облучении раствора БСА частотой 51.8 ГГц. Из значений констант связывания также выявляется, что БСА связывается с эритрозином В с большим сродством, поскольку значение константы связывания возрастает в результате облучения частотой 51.8 ГГц. Флуоресцентные исследования показывают, что процесс связывания БСА с эритрозином В является термодинамически выгодным, при этом, облучение ММ ЭМВ с частотой 51.8 ГГц приводит к образованию и возникновению дополнительных водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Спектры КД свидетельствуют о том, что облучение БСА частотой 51.8 ГГц не влияет на конформацию белка. Этот результат находится в соответствии с нашими предыдущими данными, поскольку резонансная для воды частота влияет на структуру белка опосредовано, через воду [10]. При этом, облучение приводит к конформационным изменениям белка только в комплексе с эритрозином В.

ЛИТЕРАТУРА

- Z.-Y. Tian, L.-N. Song, Y. Zhao, F.-L. Zang, Z.-H. Zhao, N.-H. Chen, X.-J. Xu, C.-J. Wang. Molecules, 20, 16491 (2015).
- P.O. Vardevanyan, M.A. Shahinyan, N.H. Petrosyan, Y.S. Mamasakhlisov. J. Cont. Physics (Arm Acad Sci), 56, 60 (2021).
- 3. S. Roy. J Pharmacology Toxicological Studies, 4, 7 (2016).
- 4. G. Zhang, L. Wang, J. Pan. Agric Food Chem., 60, 2721 (2012).

- 5. L. Ganesan, P. Buchwald. J. Mol. Recognit., 26, 181 (2013).
- 6. N.V. Sablin, M.A. Gerasimova, E.V. Nemtseva. Russ. Phys. J., 58, 1797 (2016).
- 7. L.C. Pravinata, Y. You, R.D. Ludescher. Biophysical J., 88, 3551 (2005).
- 8. V.M.K. Mathavan, B.K. Boh, S. Tayyab. Ind. J. Biochem. Biophys., 46, 325 (2009).
- 9. M. Hagivara, E. Watanabe, J.C. Barrett, T. Tsutsui. Mut Res, 603, 111 (2006).
- M.A. Shahinyan, A.P. Antonyan, V.P. Kalantaryan, M.S. Mikaelyan, P.O. Vardevanyan. J. Electromagnetic Waves Applications, 33, 2317 (2019).
- P.O. Vardevanyan, M.A. Shahinyan, M.A. Parsadanyan, S.V. Grigoryan, V.P. Kalantaryan. J. Cont. Physics (Arm Acad Sci), 58, 198 (2023).
- V. Kalantaryan, R. Martirosyan, Y. Babayan, V. Petrosyan. Comp. Struct. Biotech. J., 21, 3437 (2023).
- 13. A.B. Gapeyev, E.N. Mikhalik, N.K. Chemeris. Bioelectromagnetics, 29, 197 (2008).
- Y.G. Shckorbatov, N.N. Grigoryeva, V.G. Shakhbazov, V.A. Grabina, A.M. Bogoslavsky. Bioelectromagnetics, 19, 414 (1998).
- 15. P.O. Vardevanyan, M.A. Shahinyan, A.V. Vardanyan, S.V. Grigoryan. Proc The YSU: Chem Biol Sci., 55, 136 (2021).
- M.A. Shahinyan, A.P. Antonyan, M.S. Mikaelyan, P.O. Vardevanyan. Biophys. Rev. Lett., 10, 201 (2015).
- 17. Y. Zhang, H. Gerner. J. Photochem. Photobiol., 85, 677 (2009).

INTERACTION OF SERUM ALBUMIN WITH ERYTHROSINE B UNDER THE EFFECT OF MILLIMETER RANGE ELECTROMAGNETIC WAVES

M.A. PARSADANYAN, M.A. SHAHINYAN, S.V. GRIGORYAN, M.S. MIKAELYAN, G.H. POGHOSYAN, V.P. KALANTARYAN, P.O. VAREDEVANYAN

The interaction of food conservator and dye erythrosine B with bovine serum albumin (BSA) under the effect of millimeter range electromagnetic waves (MM EMW) with frequencies 41.8 and 51.8 GHz has been studied by the UV-denaturation and spectroscopic (absorption, fluorescence, CD) methods. It was shown that the irradiation by MM EMW with the frequency 51.8 GHz results in stabilization of the complex BSA-erythrosine B. At the same time, denaturation parameters of the complex at the irradiation of BSA solution with the frequency 41.8 GHz, in error framework, do not differ from those, obtained for non-irradiated samples. It was also revealed that under the effect of the irradiation by 51.8 GHz frequency there is no conformational change of BSA, while in the case of the complex BSA-erythrosine B a change of the protein conformation takes place. Though, the complex-formation process is thermodynamically beneficial and implemented due to the additional hydrogen bonds and vander-Waals interaction between BSA and erythrosine B under the effect of MM EMW.