

УДК 577.322.72

Физико-химическое исследование стабильности человеческого сывороточного альбумина в присутствии димексида

К.Р.Григорян

*Химический факультет ЕГУ
0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1*

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, термическая денатурация, димексид, электронная спектроскопия, денситометрия

Изучение механизма денатурации белковых молекул позволяет установить связь между структурой белка и его стабильностью и понять, какие факторы определяют стабильность нативной конформации молекулы белка. Медицинское значение проблемы денатурации и фолдинга белков выросло в последнее время в связи с установлением того факта, что причиной ряда смертельно опасных болезней человека и животных является агрегация белка, которая, в свою очередь, обусловлена неправильным фолдингом либо дестабилизацией белковых молекул [1]. Как известно, некоторые органические растворители (спирты, кетоны) при низких концентрациях стабилизируют структуру белков, в то время как высокие концентрации этих соединений вызывают дестабилизацию белков. Стабилизирующий эффект органических растворителей объясняется прямыми взаимодействиями молекул растворителя с белками, в то время как денатурирующий эффект этих растворителей при более высоких концентрациях приписывается разрушению гидрофобных взаимодействий между неполярными боковыми цепями в белках [2,3]. Однако такое объяснение механизма воздействия соразтворителя является не полным.

Изучение связывания лекарственных препаратов с белками плазмы крови является одной из наиболее важных задач фармакологии. Это объясняется тем, что лекарственные средства связываются с плазматическими белками в большей степени, чем с другими компонентами крови. Здесь определенную роль играет стабильность белка. Среди транспортных белков крови важная роль принадлежит сывороточному альбумину, доля которого составляет около 60% от суммарного количества белков крови. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) является глобулярным белком (мол. м. 66.462 тыс.), который состоит

из одной полипептидной цепи. ЧСА содержит 585 аминокислотных остатков. Макромолекула состоит из трех гомологичных доменов, свернутых в сердцеобразную форму. В молекуле имеется одна свободная меркапто-группа, которая может участвовать в образовании дисульфидов, что лежит в основе пускового механизма денатурации этого белка. Поверхность альбумина характеризуется почти равным количеством гидрофильных и гидрофобных групп в контакте с водным растворителем. Процесс денатурации сложен, так как каждый домен способен разворачиваться самостоятельно, независимо от состояния других [4].

Нами ведутся работы по изучению влияния диметилсульфоксида и его гомологов на стабильность биомакромолекул (ДНК, фосфолипидные липосомы, белки) [5,6]. В этой работе методами электронной спектроскопии и денситометрии изучено влияние димексида (диметилсульфоксида – ДМСО) на термическую денатурацию ЧСА.

Материал и методы

Сывороточный альбумин человека (содержание жирных кислот $< 0,005\%$) и ДМСО были приобретены из фирмы Sigma Chemical Co. (США). Для приготовления растворов альбумина использовали физраствор фирмы LIQVOR Pharmaceuticals (Армения). Во всех экспериментах для приготовления растворов белка использовалась бинарная смесь физраствора с ДМСО. Все эксперименты проводились с использованием одинаковых концентраций белка ($0,4 \text{ мг/мл}$). Концентрация белка в растворе определялась с помощью электронной спектроскопии, при $\lambda = 280 \text{ нм}$. Использовалось значение молярного коэффициента поглощения $\epsilon = 36.500 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$. Концентрация ДМСО варьировала от 5 до 50% (v/v).

Спектроскопические измерения. Спектры электронного поглощения (УФ-спектры) зарегистрированы с помощью спектрометра Spectord 50РС, оснащенного термостатом Lauda А100. Образцы были помещены в камеру спектрофотометра при 20°C и затем температуру медленно поднимали. Скорость сканирования температуры составляла 2°C в минуту. Использовали кюветы толщиной 1 см. УФ профили плавления альбумина нормированы (от 0 до 1) с помощью компьютерной программы ORIGIN 7.5.

Денситометрические измерения. Плотность растворов ЧСА измерялась при 20°C с использованием денситометра DMA 4500, Anton Paar. Вибрирующая система денситометра обеспечивает точность измерения $5 \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$. Точность измерения температуры $\pm 0,01^\circ\text{C}$. Из данных денситометрических измерений можно рассчитать

кажущийся парциальный удельный объем белка, используя следующее уравнение [7]:

$$\phi = \frac{1}{\rho_0} \left[1 - \frac{\rho - \rho_0}{c} \right],$$

где ϕ – кажущийся парциальный удельный объем белка, ρ и ρ_0 – плотность раствора белка и растворителя соответственно, c – концентрация белка ($\text{г} \cdot \text{мл}^{-1}$). Парциальный удельный объем белка (ϕ°) определяется экстраполяцией ϕ до нулевой концентрации белка [8].

Результаты и обсуждение

Влияние ДМСО на термическую денатурацию альбумина было исследовано методом электронной спектроскопии в температурном интервале 20-90°C. На рис.1 приведены УФ профили плавления альбумина в отсутствие и присутствии ДМСО. Термическое развер-

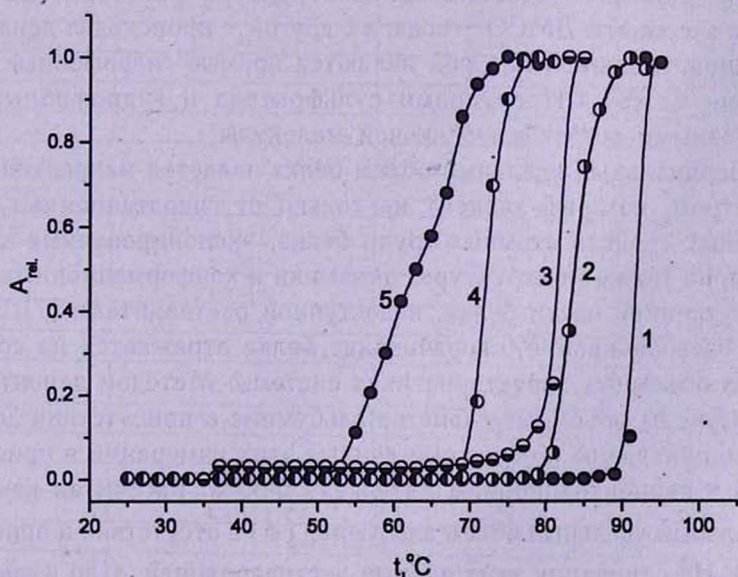


Рис.1. УФ профили термической денатурации ЧСА в присутствии ДМСО: ЧСА-0.4мг/мл, 1-ДМСО-5% (v/v); 2-ДМСО-15%; 3-ДМСО-0%; 4-ДМСО-25%; 5-ДМСО-35%

тивание альбумина описывается многоступенчатым механизмом по аппроксимационной модели Эйрига-Ламри [9]. Согласно этой модели, денатурация альбумина происходит поэтапно, в две стадии: обратимая и необратимая денатурация. Первый переход соответствует обратимой денатурации (превращение нативного белка в обратимое развернутое состояние) при 63.20°C. Второй переход – необратимой денатурации при 74.30°C. Как видно из графика, при низких концентрациях ДМСО (до 15 %) наблюдается сдвиг кривых плавления белка в сторону высоких температур. С увеличением концентрации ДМСО (15-35 %) кривые денатурации перемещаются в сторону низких температур, причем денатурация ЧСА начинается при более низких температурах, по сравнению с чистым альбумином. В квантохимических исследованиях Вайсмана и Берковица было показано, что в водных растворах в зависимости от концентрации ДМСО может действовать как космотроп (при низких концентрациях) или как хаотроп (при высоких концентрациях) [10]. При низких концентрациях ДМСО (от 2 до 10%) происходит структурирование воды за счет образования ассоциатов $\text{H}_2\text{O}-(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Молекулы сульфоксида перехватываются молекулами воды и не доходят до поверхности белка. В этом случае ДМСО действует как космотропный аддитив. При более высоких концентрациях ДМСО (от 15 до 50 %) действует как хаотропный аддитив. С одной стороны, меняется ассоциативная структура растворителя, разрушаются ассоциаты ДМСО – вода, а с другой – происходит денатурация альбумина, причиной которой являются прямые гидрофобные взаимодействия между CH_3 -группами сульфоксида и гидрофобными аминокислотными остатками белковой молекулы.

Парциальный удельный объем белка является макроскопическим параметром, который зависит не только от гидратационных/сольватационных свойств атомных групп белка, экспонированных к растворителю, но также от структуры, динамики и конформационных изменений внутренней части белка, недоступной растворителю [7]. Поэтому любое разворачивание/сворачивание белка отражается на соответствующих объемных характеристиках системы. Методом денситометрии нами изучены объемные свойства альбумина в присутствии ДМСО. В таблице приведены полученные данные этих измерений в присутствии ДМСО в концентрационном интервале 0-50%. Рассчитан кажущийся парциальный удельный объем альбумина (ϕ) в отсутствие и присутствии ДМСО. На основании этих данных экстраполяцией ϕ до нулевой концентрации белка рассчитан парциальный удельный объем альбумина (ϕ^0). Из приведенной на рис.2 зависимости ϕ^0 альбумина от концентрации ДМСО видно, что при низких концентрациях ДМСО парциальный удельный объем белка уменьшается, а при высоких – увеличивается.

Таблица

Плотность растворов ЧСА в присутствии ДМСО и кажущиеся парциальные удельные объемы ЧСА

ДМСО-0%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
0.99707	0.99710	0.0001	0.720
	0.99711	0.0002	0.816
	0.99713	0.0003	0.804
	0.99716	0.0004	0.782
ДМСО-5%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
1.0039	1.00446	0.002	0.729
	1.00488	0.004	0.754
	1.00540	0.006	0.748
	1.00586	0.008	0.752
ДМСО-10%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
1.011	1.01157	0.002	0.701
	1.01187	0.004	0.768
	1.01248	0.006	0.741
	1.01289	0.008	0.749
ДМСО-15%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
1.01804	1.0182	0.00055	0.694
	1.0183	0.00102	0.731
	1.01874	0.00165	0.565
	1.01865	0.00201	0.685
ДМСО-25%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
1.03385	1.03412	0.001	0.809
	1.03459	0.003	0.752
	1.03495	0.005	0.756
	1.03519	0.006	0.756
ДМСО-35%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
1.04929	1.04962	0.002	0.796
	1.05008	0.004	0.763
	1.05049	0.006	0.757
	1.05073	0.008	0.778
ДМСО-50%			
ρ_0 , г/см ³	ρ , г/см ³	C, г/см ³	ϕ , см ³ /г
1.07043	1.07069	0.002	0.792
	1.07087	0.003	0.815
	0.07136	0.005	0.767
	1.07157	0.007	0.766

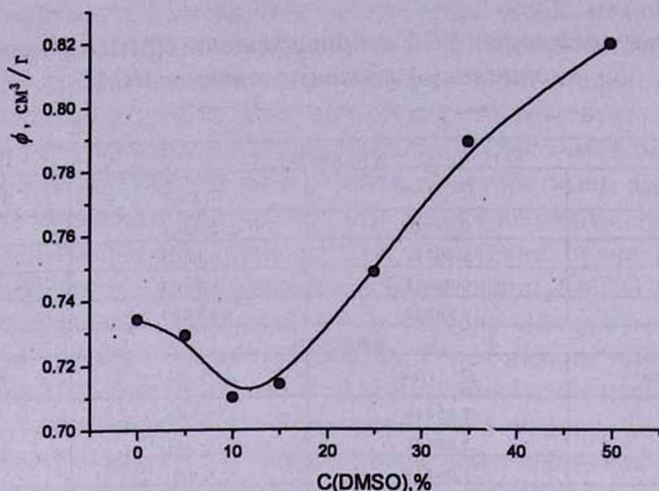


Рис.2. Концентрационная зависимость парциального удельного объема ЧСА от концентрации ДМСО: ЧСА– 0.4мг/мл, ДМСО–5-50%

Это говорит о том, что при низких концентрациях ДМСО компактность макромолекулы увеличивается вследствие перестраивания молекул воды на поверхности белка. А при высоких концентрациях ДМСО молекула белка становится менее компактной, так как две метильные группы сульфоксида вступают в прямые гидрофобные взаимодействия с неполярными участками на поверхности белка. Исследования предпочтительных взаимодействий на основании денситометрических измерений показали, что ДМСО отторгается от поверхности полярных протеинов (лизозим, рибонуклеаза А) при низких концентрациях, но связывается с поверхностью белка при высоких концентрациях. С менее полярными белками (химотрипсиноген, β -лактоглобулин) имеет место гидрофобное связывание [11].

Таким образом, из спектроскопических и денситометрических исследований влияния димексида (диметилсульфоксид) на термическую стабильность человеческого сывороточного альбумина можно заключить, что при низких концентрациях (до 15%) ДМСО действует как стабилизатор белка, а при высоких (от 15 до 50 %) – как денатурант.

Поступила 08.04.08

Մարդու շիճուկային արբումինի կայունության ֆիզիկաքիմիական ուսումնասիրությունը դիմեքսիդի ներկայությամբ

Կ.Ռ. Գրիգորյան

Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի և խտաչափության մեթոդներով ուսումնասիրվել է դիմեքսիդի (դիմեթիլսուլֆօքսիդ-ԴՄՍՕ) ազդեցությունը մարդու շիճուկային արբումինի թերմիկ կայունության վրա: Յույց է տրվել, որ ԴՄՍՕ-ի ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում (մինչև 15%) դիտվում է արբումինի կծկված վիճակի կայունացում, իսկ բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում (15-50%) սպիտակուցը ենթարկվում է դենատուրացիայի:

Physicochemical study of human serum albumin stability at presence of Dimexide

K.R. Grigoryan

The influence of Dimexide (dimethylsulphoxide-DMSO) on the thermal stability of human serum albumin (HSA) has been investigated by UV/vis spectroscopy and densitometry methods. It has been shown that low concentrations of DMSO (up to 15 %) stabilize the folded state of HSA. At higher DMSO concentrations (15÷ 50 %) protein undergoes denaturation.

Լիտերատուրա

1. Arakawa T., Ejima D., Kita Y., Tsumoto K., *Biochim. et Biophys. Acta*, 2006, 1764, p.1677-1687.
2. Michnik A., Drzazga S. *Journ. Therm. Analys. and Calorimetry*, 2007, 88, 2, p.449-454.
3. Shan-Yang Lin, Yen-Shan WEI, Mei-Jane Li, Shun-Li Wang *Europ. J. Pharm. and Biopharm.*, 2004, 57, p.457-464.
4. Peters T. *All about Albumin Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: San Diego, CA, 1996.
5. Markarian S., Asatryan A., Grigoryan K., Sargsyan H. *Biopolymers*, 2006, 8, p. 1-5.
6. Bonora S., Markarian S., Trincherio A., Grigorian K. *Thermochim. Acta*, 2005, 433, p.19-26.
7. Taulier N., Chalikian T. J. *Mol. Biol.*, 2001, 314, p.873-889.
8. Timasheff S., Xie G. *Biophys. Chem.*, 2003, 105, p.421-448.
9. Pico G.A. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 1997, 20, p.63-73.
10. Vaisman I.I. and Barkowitz M.L. *J.Am.Chem.Soc.*, 1992, 114, p.7889-7896.
11. Kita Y., Arakawa T., Lin T., Timasheff N. *Biochemistry*, 1994, 33, p.15178-15189.