

11. Haas E., Katchalski-Katzir E., Steinberg I. Z. Effect of the orientation of the donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization // *Biochemistry*.—1978.—17, N 24.— P. 5064—5070.
12. Клименко И. В. Поляризация флюоресценции и вязкость микроокружения остатков триптофана эукариотической тирозил-тРНК синтетазы // *Биополимеры и клетка*.—1992.—8, № 3.— С. 3—6.
13. Hudson E., Weber G. Synthesis and characterization of two fluorescent sulphydryl reagents // *Biochemistry*.—1973.—12, N 21.— P. 4154—4163.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 29.06.93

УДК 535.33:547.963

А. И. Иванов, Е. А. Короленко, Е. В. Королик, В. В. Сарнацкая,
Л. А. Мелешенко, В. Г. Николаев, Р. Г. Жбанков, К. фон Аллен

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ СТРУКТУРЫ АЛЬБУМИНА КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Методами ИК-спектроскопии и кругового дихроизма показано, что при хронической почечной недостаточности не происходит изменений во вторичной структуре сывороточного альбумина человека. Наблюдаемые различия спектров деконволюции сывороточного альбумина больных с ХПН, находившихся на программном хроническом гемодиализе от 0,5 до 5 лет, по сравнению со спектрами деконволюции альбумина здоровых доноров, вероятнее всего, обусловлены изменением микроокружения части боковых радикалов аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также аминокрупп лизиновых остатков в молекулах «уремического» альбумина.

Введение. Сывороточный альбумин человека (САЧ) обеспечивает гуморальный транспорт большого числа органических анионов эндо- и экзогенного происхождения. Это обусловлено наличием в молекуле САЧ по крайней мере пяти классов связывающих центров, специфичных к определенным химическим структурам [1].

Взаимодействие низкомолекулярных лигандов с молекулами альбумина сопровождается локальными конформационными перестройками вблизи аффинных центров САЧ. Последнее увеличивает сродство белка-переносчика к лиганду [2]. В свою очередь, диссоциация комплексов САЧ с транспортируемыми веществами на мембранах клеток-мишеней, по-видимому, также сопровождается конформационными изменениями молекул альбумина [3]. Подобные процессы интенсивно изучаются в модельных экспериментах по комплексообразованию САЧ с жирными кислотами, билирубином, лекарственными препаратами. Однако конформационная изменчивость молекул альбумина в условиях лигандной нагрузки *in vivo* исследована недостаточно. Особенно это относится к различным патологическим состояниям организма, сопровождающимся накоплением в его жидкостных средах липофильных продуктов метаболизма, активно взаимодействующих с транспортными белками. Здесь показано появление модифицированных форм САЧ с пониженной связывающей способностью [4]. Весьма значительные нарушения транспортной функции альбумина обнаружены у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН). Это объясняется накоплением в крови уремических больных различных ингибиторов, конкурентно блокирующих аффинные центры альбумина, либо изменяющих его конформацию [4]. Так, в работе Троицкого с соавт. [5] при изучении САЧ больных с ХПН методами дисперсии оптического вращения и изоэлектрического фокусирования продемонстрирована частичная деспирализация молекул «уремического» альбумина. Однако Сьехолм

© А. И. Иванов, Е. А. Короленко, Е. В. Королик, В. В. Сарнацкая, Л. А. Мелешенко,
В. Г. Николаев, Р. Г. Жбанков, К. фон Аллен, 1993

с соавт. [4] не обнаружили различий во вторичной структуре альбумина здоровых доноров и больных с ХПН. Изменения в изоэлектрических спектрах САЧ при уремии могут быть объяснены модификацией поверхностного заряда молекул альбумина прочносвязанными лигандами, а не структурными перестройками «уремического» САЧ [6]. Таким образом, вопрос о роли конформационных перестроек в нарушении транспортной функции альбумина при уремии остается в достаточной степени открытым.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ ИК-спектров и спектров кругового дихроизма (КД) препаратов САЧ, полученных из плазмы крови здоровых доноров, а также больных с ХПН, различное время находившихся на программном хроническом гемодиализе.

Материалы и методы. В работе использованы: полиэтиленгликоль (ПЭГ) 4000, акриламид («Мерк», Германия), метиленбисакриламид («Bio-Rad», США), QAE — сефадекс А-50 («Pharmacia», Швеция). Соли отечественного производства (классификация ч. д. а., х. ч.) использовали без дополнительной очистки.

Кровь здоровых доноров и больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности отбирали натощак в пластиковые пробирки. Уремические больные получали стандартную базовую терапию и находились на программном хроническом гемодиализе от полугода до 17 лет. Отбор крови больных проводили перед процедурами гемодиализа. Сыворотку крови хранили при -20°C не более двух недель. САЧ получали по методу [7]. Чистота препаратов, оцененная по электрофорезу с DS-Na, была не менее 95 %. Содержание димерных форм, согласно нативному электрофорезу в системе Девиса, не превышало 5—7 %. Неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК) в препаратах альбумина определяли по методике, описанной в работе [8].

Для получения ИК-спектров образцов САЧ использовали автоматизированную систему на основе инфракрасного спектрометра IR-810 «Jasko» и ПЭВМ типа IBM-PC/AT. Образцы белка запрессовывали в KBr-матрицу по методике [9]. Для более четкого выделения отдельных составляющих в сложном контуре полос поглощения проводили математическую обработку — получение высокоразрешенных спектров методом деконволюции [10].

Спектры КД растворов САЧ в дальней ультрафиолетовой области записывали на спектрометре «Jasko-20». Содержание различных элементов вторичной структуры рассчитывали по методу [11].

Результаты и обсуждение. В ИК-спектрах альбумина, как и других белков, наибольший интерес представляют области, где расположены полосы поглощения, обусловленные колебаниями пептидной группы, — амид I, II, III. Согласно имеющимся данным [12, 13], изменение соотношений интенсивностей компонент полос поглощения амид I и амид III свидетельствует о перераспределении вкладов различных элементов вторичной структуры в молекулах белка.

В спектрах деконволюции САЧ здоровых доноров (область $1700\text{—}1600\text{ см}^{-1}$) полоса поглощения амид I состоит из трех максимумов при 1684 , 1656 , 1615 см^{-1} и выступает в интервале частот $1644\text{—}1638\text{ см}^{-1}$ (рис. 1, кривая I). Наиболее интенсивная компонента при 1656 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями CO-групп полипептидной цепи в составе α -спирали и неупорядоченного клубка, а менее интенсивные компоненты при 1684 , $1644\text{—}1638$ и 1615 см^{-1} — колебаниями тех же групп в β -складчатом слое [13]. Полоса амид III, обусловленная колебаниями групп CNH, в спектрах деконволюции САЧ здоровых доноров имеет сложный характер (рис. 2, б, кривая I). Она состоит из компонент с максимумами при 1309 , 1282 , 1266 , 1241 , 1225 и 1205 см^{-1} . Наиболее интенсивные полосы поглощения при 1309 , 1266 и 1241 см^{-1} относят соответственно к α -спиральной конформации и неупорядоченному клубку, а слабые полосы поглощения при 1225 и 1205 см^{-1} — к β -структуре [12, 13]. Поскольку в спектрах деконволюции образцов САЧ здоровых доноров наиболее интенсивно представлены составляющие

компоненты полос амид I и амид III при 1656, 1309 и 1241 см^{-1} , можно говорить о преобладании в исследуемом белке α -спиральной конформации и неупорядоченного клубка при незначительной доле β -сложенчатого слоя.

Согласно данным КД, вклады α -спиральных и неупорядоченных участков в молекулах донорского САЧ составляют 53 ± 4 и 40 ± 4 % соответственно. Последнее хорошо согласуется с литературными данными [2]. Все это свидетельствует о том, что использованный в данной

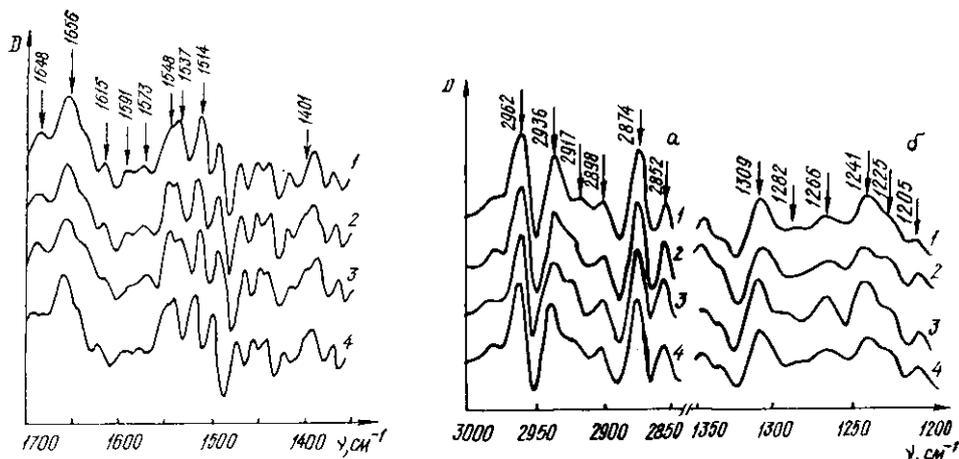


Рис. 1. ИК-спектры деконволюции сывороточного альбумина человека в области частот 1700—1350 см^{-1} : 1 — САЧ здорового донора; 2—4 — САЧ уремических больных (2 — до 1 года; 3 — от 1 до 5 лет; 4 — свыше 10 лет гемодиализа)

Рис. 2. ИК-спектры деконволюции сывороточного альбумина человека в области частот 3000—2850 см^{-1} (а) и 1350—1200 см^{-1} (б): 1 — САЧ здорового донора; 2—4 — САЧ уремических больных (2 — до 1 года; 3 — от 1 до 5 лет; 4 — свыше 10 лет гемодиализа)

работе метод выделения альбумина, а также подготовка образцов для ИК-спектроскопических исследований не приводят к существенной денатурации исследуемого белка.

На рис. 1, 2 (кривые 2—4) представлены спектры деконволюции препаратов САЧ, полученных у больных с ХПН, различное время находившихся на программном гемодиализе. Из рисунков видно, что в областях амид I и амид III ИК-спектров «уремических» альбуминов независимо от времени нахождения на гемодиализе положение максимумов компонент полос поглощения сохраняется. Не наблюдается также и существенных изменений в соотношении интенсивностей компонент. Это свидетельствует о неизменности вкладов различных элементов вторичной структуры в молекулах САЧ на терминальных стадиях ХПН. Сделанный вывод подтверждается идентичностью спектров КД препаратов САЧ здоровых доноров и уремиических больных (рис. 3).

Сравнительный анализ спектров деконволюции альбумина здоровых доноров и больных с ХПН позволил выявить их различия в спектральных интервалах 2950—2850, 1600—1500 и 1420—1350 см^{-1} . В спектрах деконволюции САЧ здоровых доноров и уремиических пациентов в области частот 2950—2850 см^{-1} сложная полоса поглощения, обусловленная валентными колебаниями групп СН , СН_2 , СН_3 [15], состоит из компонент при 2962, 2936, 2917, 2898, 2874, 2852 см^{-1} . В этом спектральном интервале для ИК-спектров «уремических» альбуминов характерно увеличение интенсивности компонент при 2917 и 2852 см^{-1} по сравнению со спектром САЧ здоровых доноров (рис. 2, а, кривые 1—4).

Область частот 1600—1500 см^{-1} (полоса амид II) в ИК-спектрах белков обусловлена деформационными колебаниями групп NH полипептидного остова, а также колебаниями боковых радикалов некоторых

аминокислотных остатков [13]. В спектрах деконволюции исследованных образцов САЧ она состоит из пяти компонент при 1591, 1573, 1548, 1537, 1514 см^{-1} . В ИК-спектрах «уремических» альбуминов наблюдается увеличение относительной интенсивности полосы поглощения при 1548 см^{-1} . Кроме того, в спектрах деконволюции САЧ уремических больных увеличивается относительная интенсивность компоненты при 1401 см^{-1} , обусловленная симметричными колебаниями групп COO^- [13] (рис. 1, кривые 1—4).

Рассмотренные особенности ИК-спектров «уремических» альбуминов могут быть обусловлены как структурными перестройками молекул

САЧ, так и дополнительным вкладом в указанные спектральные интервалы собственного поглощения связанных с альбумином низкомолекулярных лигандов. Среди большого числа различных эндогенных метаболитов, концентрация которых в крови при ХПН значительно

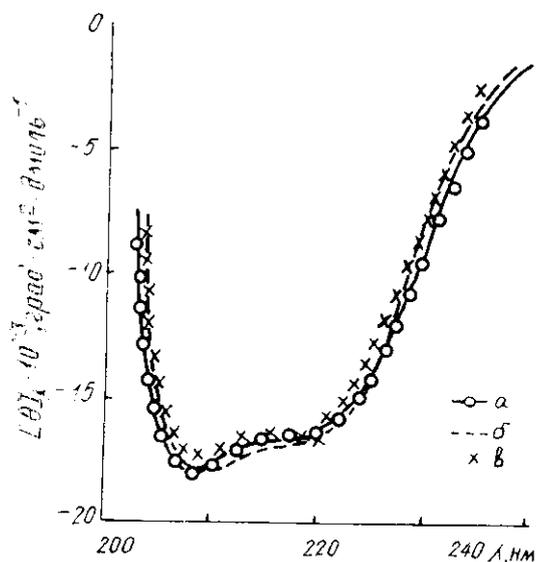


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма сывороточного альбумина человека в 100 мМ NaCl/50 мМ фосфатного буфера, pH 7,4 (концентрация белка 0,07 мг/мл, длина оптического пути кюветы 0,1 см): а — САЧ здорового донора; б — САЧ уремического больного, находившегося на гемодиализе до 1 года; σ — то же от 1 до 5 лет

но возрастает, особого внимания заслуживают 3-карбоксиметил-4-метил-5-пропил-2-фурановая кислота (КМПФ) [16], НЭЖК [17] и индоксилсульфат [18]. Эти соединения обладают высоким сродством к молекулам альбумина, и их комплексы с белком не подвергаются значительному разрушению в процессе выделения САЧ из плазмы крови. Присутствуя в препаратах «уремических» альбуминов, перечисленные лиганды могут вносить собственный вклад в рассмотренные выше полосы поглощения ИК-спектров. Так, НЭЖК и КМПФ, имея в структуре карбоксильные, а также метильные и метиленовые группы, способны поглощать в спектральных интервалах 1420—1350, 2970—2850 см^{-1} [19], а индольное кольцо индоксилсульфата — в области частот 1550—1530 см^{-1} [14]. Однако, согласно литературным данным [16], концентрация КМПФ в плазме крови больных с ХПН не превышает 200—230 мкмоль/л, концентрация индоксилсульфата составляет в среднем 150 мкмоль/л [20]. Таким образом, при концентрации САЧ 500—600 мкмоль/л [4] в уремической плазме крови одна молекула КМПФ приходится на три, а индоксилсульфата — на четыре молекулы альбумина. При таких соотношениях собственное поглощение указанных лигандов не может вносить существенного вклада в спектры деконволюции образцов САЧ уремических больных. Количество молей НЭЖК на моль белка в полученных препаратах САЧ варьировало в пределах 0,43—1,11 моль/моль для здоровых доноров и 0,40—1,35 моль/моль для уремических больных. Следовательно, собственное поглощение жирных кислот также не может быть ответственным за наблюдаемые изменения в ИК-спектрах «уремических» альбуминов в интервале частот 1420—1350 и 2970—2850 см^{-1} .

Таким образом, обнаруженные особенности спектров деконволюции САЧ больных с ХПН обусловлены конформационными перестройками молекул «уремических» альбуминов. Поскольку их вторичная структу-

ра остается такой же, как и у белка здоровых доноров, причиной выявленных различий могут быть изменения в глобулярной упаковке молекул САЧ при уремии.

Следует отметить, что ИК-спектроскопия используется в основном для изучения вторичной структуры белков [13]. В связи с этим четко интерпретированными могут быть лишь изменения в полосах амид I и амид III. Изменения, обнаруженные нами в других спектральных интервалах ИК-спектров САЧ, достоверны лишь по отношению к определенным химическим группировкам молекул альбумина. Так, наблюдается увеличение относительных интенсивностей полос поглощения при 2917, 2852 и 1401 см^{-1} в спектрах деконволюции «уремических» САЧ, вероятнее всего, обусловлено изменением микроокружения части боковых радикалов аспарагиновой и глутаминовой кислот, имеющих в структуре карбоксильную группу и цепочку CH_2 -групп.

Поскольку известно [4], что из 100 карбоксильных групп молекулы САЧ около 40 скрыты внутри глобулы, в то время как остальные находятся на поверхности белка, можно предположить существование конформационных изменений молекул «уремических» альбуминов, приводящих к перераспределению остатков между «скрытым» и поверхностным пулами аспарагиновой и глутаминовой кислот. Это сказывается на изменении поглощения в соответствующих областях ИК-спектров, где проявляются колебания COO^- и CH_2 -групп.

Как указывалось выше, в ИК-спектрах «уремических» альбуминов происходит и относительное увеличение интенсивности компоненты при 1548 см^{-1} . В спектральном интервале 1550—1485 см^{-1} проявляются характеристические колебания аминокислот, содержащих группу NH_3^+ [15], а также колебания индольного кольца триптофанового остатка [13]. Так как молекула САЧ содержит один триптофановый остаток, его вклад в поглощение в данном спектральном интервале незначителен. Наиболее логично предположить, что наблюдаемое увеличение относительной интенсивности компоненты при 1548 см^{-1} в спектрах деконволюции «уремических» альбуминов обусловлено изменением поглощения групп NH_3^+ лизиновых остатков.

Обнаруженные изменения в спектрах деконволюции «уремических» альбуминов характерны для образцов, находившихся на программном гемодиализе от 0,5 до 5 лет. Спектры деконволюции уремических больных, находившихся на гемодиализе свыше 10 лет, практически не отличались от таковых САЧ здоровых доноров.

Таким образом, на основании данных ИК-спектроскопии и КД показано, что в препаратах альбумина, полученных из крови больных с терминальными стадиями хронической почечной недостаточности, сохраняется соотношение различных элементов вторичной структуры, характерное для альбумина здоровых доноров. Выявленные спектральные изменения дают основание для вывода о наличии особенностей в глобулярной упаковке молекул САЧ уремических больных, находившихся от полугода до 5 лет на программном гемодиализе. Эти особенности проявляются в измененном микроокружении части боковых радикалов лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Резюме. Методами ІЧ-спектроскопії та кругового дихроїзму показано, що за хронічної ниркової недостатності (ХНН) не відбувається змін у вторинній структурі сироваткового альбуміну людини (САЛ). Спостережені розбіжності спектрів деконволюції САЛ хворих на ХНН, які знаходилися на програмному хронічному гемодіалізі від 0,5 до 5 років, порівняно зі спектрами деконволюції альбуміну здорових донорів, скоріш за все, обумовлені змінами мікрооточення частини бічних радикалів аспарагінової і глутамінової кислот, а також аміногруп лізинових залишків у молекулах «уремічного» альбуміна.

Summary. After IR and CD spectroscopy investigations there were not observed any differences between secondary structures of blood albumins from healthy donors and

uremic patients. Some special features of deconvolved IR spectra of albumin from patients with short terms of hemodialysis could be a result of change in microenvironment of part from side chains of aspartic, glutamic acids and lysine in «uremic» albumin molecules.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krag-Hansen U.* Structure and ligand binding properties of human serum albumin // *Dan. Med. Bull.*—1990.—37, N 1.—P. 57—84.
2. *Honore B.* Conformational changes in human serum albumin induced by ligand binding // *Pharmacol. Toxicol.*—1990.—66, N 2.—P. 1—26.
3. *Reed R. G., Burrington C. M.* The albumin receptor effect may be due to a surface-induced conformational change in albumin // *J. Biol. Chem.*—1989.—264, N 17.—P. 9867—9872.
4. *Ландау М. А.* Молекулярная природа отдельных физиологических процессов.—М.: Наука, 1985.—260 с.
5. *Троицкий Г. В., Шареева Т. К., Ажицкий Г. Ю. и др.* Тиол-дисульфидный обмен как механизм образования минорных фракций альбумина с рН 5,2—7,4 при патологиях / *Укр. биохим. журн.*—1986.—58, № 6.—С. 12—22.
6. *Candiano G., Chiggeri G. M., Delfino G. et al.* Isoelectric focusing in low-denaturing media: visualization in renal disease of variation of the isoelectric point of albumin not related to a remarkable conformational variation // *J. Chromat.*—1986.—374, N 1.—P. 279—288.
7. *Vasileva A., Jakad M., Hasko F.* Application of ion-exchange chromatography for the production of human albumin // *J. Chromat.*—1981.—216.—P. 279—284.
8. *Прохоров М. Ю., Тиунов М. П.* Простой колориметрический метод определения свободных жирных кислот // *Лаб. дело.*—1977.—№ 9.—С. 535—536.
9. *Жбанков Р. Г.* ИК спектры целлюлозы и ее производных.—Минск: Наука и техника, 1964.—338 с.
10. *Kauppinen J. K., Moffatt D. F., Mantsch H. H. et al.* Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands // *Appl. Spectr.*—1981.—35, N 3.—P. 271—276.
11. *Бологина И. А., Чехов В. О., Лугаускас И. Ю., Птицин О. Б.* Определение вторичной структуры белков из спектров кругового дихроизма // *Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 4.—С. 902—909.
12. *Susi H., Byler D. M.* Protein structure by fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1983.—115, N 1.—P. 391—397.
13. *Jakobsen R. J., Wasacz F. M.* Infrared spectra-structure correlation and adsorption behavior for helix proteins // *Appl. Spectr.*—1990.—44, N 9.—P. 1478—1490.
14. *Foster J. F.* Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin // *Albumin structure, functions and uses.*—Oxford: Pergamon press, 1977.—P. 53—84.
15. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул.—М.: Ин. лит., 1963.—590 с.
16. *Mabuchi H., Nakahashi H.* Determination of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, a major endogenous ligand substance in uremic serum, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // *J. Chromat.*—1987.—45, N 1.—P. 110—117.
17. *Zini R., Morin V., Salvadori C.* Tianeptine binding to human plasma proteins and plasma from patients with hepatic cirrhosis of renal failure // *Br. J. Clin. Pharm.*—1990.—29, N 1.—P. 9—18.
18. *Niwa T., Takeda N., Tatematsu A. et al.* Accumulation of indoxylsulfate an inhibitor of drug-binding in uremic serum as demonstrated by internal-surface phase liquid chromatography // *Clin. Chem.*—1988.—34.—P. 2264—2267.
19. *Doumenq P., Guiliano M., Bertrand J. C. et al.* GC/FT/IR analysis of fatty acid methyl esters // *Appl. Spectr.*—1990.—44, N 8.—P. 1355—1359.

Ин-т физики им. Б. И. Степанова АН Беларуси, Минск
Ин-т биоорг. химии АН Беларуси, Минск
Ин-т эксперим. патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р. Е. Кавецкого АН Украины, Киев

Получено 17.06.93