

*Химия*

УДК 577.322.72

К. Р. ГРИГОРЯН

## ДЕНАТУРАЦИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ КОМПЛЕКСОВ МОЧЕВИНЫ С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

Методами УФ- и флуоресцентной спектроскопии изучена химическая денатурация сывороточного альбумина человека (САЧ) в водно-диметилсульфоксидных (ДМСО) растворах в присутствии мочевины при температуре  $60^{\circ}\text{C}$ . Показано, что образующиеся в растворе комплексы ДМСО–мочевина индуцируют денатурацию САЧ. Выдвинуто предположение о двустадийном характере денатурации САЧ в присутствии этих комплексов: первая стадия – разрыхление белковых глобул, вторая – полное разворачивание молекул белка. В системе САЧ–мочевина–ДМСО превалируют гидрофобные взаимодействия.

**Введение.** Химическая денатурация белков достигается, прежде всего, с помощью соединений, разрывающих водородные связи (6–8 *M* раствор мочевины, 4–6 *M* раствор гидрохлорида гуанидина), обработкой кислотами и щелочами, а также воздействием поверхностно активных веществ. Денатурация белка в их присутствии происходит по механизму «все или ничего» [1–3]. Мочевина, независимо от концентрации, обратимо связывается с белками, тем самым делает возможным изучение процесса свертывания белков. Авторы [4] показали, что при низких концентрациях мочевины ( $>2 M$ ), образуется расплавленная глобула с необычной гидратированной структурой и увеличивающимся радиусом Стокса.

Низкомолекулярные органические вещества, такие как спирты и кетоны, в зависимости от концентрации проявляют стабилизирующее/дестабилизирующее действие [5, 6] при денатурации сывороточных белков, в частности сывороточного альбумина человека (САЧ). Такими же свойствами обладают диалкилсульфоксиды [7, 8].

В настоящей работе изучена денатурация САЧ в водных растворах диметилсульфоксида (ДМСО) в присутствии мочевины.

**Материалы и методы.** В работе использовали САЧ (содержание жирных кислот менее 0,005%) и ДМСО фирмы “Sigma” (США), раствор хлорида натрия (“Ликвор”, Армения), мочевины марки ч.д.а. Концентрация САЧ составляла 0,4 *мг/мл*, которую определяли с помощью УФ-спектроскопии при  $\lambda=280 \text{ нм}$ . Значение молярного коэффициента поглощения ( $\epsilon_{\text{max}}$ ) принимали равным  $36500 M^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  [9]. Концентрация ДМСО варьировалась от 10 до 30%.

УФ-спектрометрические измерения проводили с помощью спектрометра Specord 50РС (Германия). Для поддержания постоянной температуры использовали циркулирующий термостат Lauda А100, входящий в комплектацию спектрометра. Использовали кюветы толщиной 1 см.

Флуоресцентные измерения проводили с помощью спектрофотометра Varian Cary Eclipse (Австралия). Спектры были зарегистрированы в интервале  $\lambda=300\text{--}450$  нм при длине волны возбуждения  $\lambda=295$  нм.

Графические зависимости анализировали с помощью компьютерной программы ORIGIN 8.0.

**Результаты и обсуждение.** Структура САЧ представляет собой одну длинную полипептидную цепь, состоящую из 586 аминокислотных остатков, уложенную в 3 связанных глобулярных сегмента, конформация которых фиксируется 17 дисульфидными связями. САЧ имеет максимальное поглощение в УФ-области при  $\lambda=280$  нм, что обусловлено наличием ароматических аминокислот триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe). Поглощение Phe при 250 нм обусловлено  $\pi\rightarrow\pi^*$ -переходом. Для Tyr наблюдаемое поглощение интенсивнее ( $274$  нм,  $\varepsilon_{\max}=1400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Спектр индольной боковой группы Trp имеет сложную природу. В достаточно узком интервале длин волн (от 240 до 290 нм) располагаются три или более электронных перехода,  $\varepsilon_{\max}\sim 5700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , так что поглощение САЧ при 280 нм можно отнести к Trp-остаткам. Этими же аминокислотными остатками обусловлена флуоресценция белков.

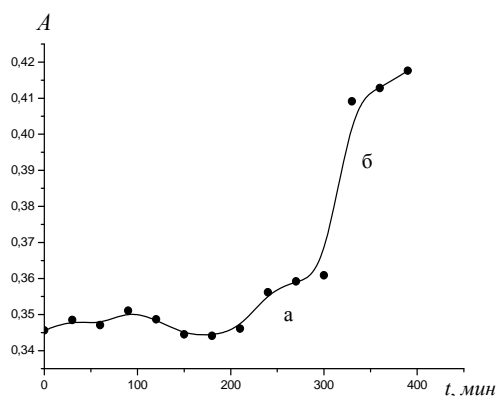


Рис. 1. УФ-профили химической денатурации САЧ (0,4 мг/мл) в присутствии мочевины (6 М) при 60°C.

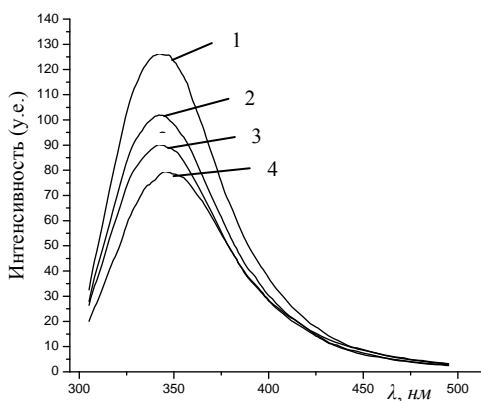


Рис. 2. Спектры флуоресценции САЧ (0,4 мг/мл) в присутствии мочевины (6 М): 1 – 0 мин, 2 – 60 мин, 3 – 180 мин, 4 – 270 мин.

На рис. 1 представлено изменение оптической плотности раствора САЧ в присутствии мочевины (6 М) при 60°C. Температурно-контролируемые преобразования конформации белков имеют важное регуляторное значение. При повышении температуры выше физиологически умеренного уровня (более 37°C) начинает проявляться хаотропное действие температуры на конформацию белка. Оно дестабилизирует структуру белковой глобулы и при достижении критической температуры в интервале 60–100°C денатурирует ее. Как видно из рис. 1, оптическая плотность раствора остается практи-

чески неизменной почти 200 мин, что говорит о стабильности структуры белка. После чего на кривой денатурации замечаются два перехода: а – слабый (240 мин) и б – резкий (360 мин), что указывает на то, что процесс денатурации нельзя описать механизмом «все или ничего». Во время денатурации вследствие разрыхления белковой глобулы образуются интермедиаты различной прочности, которые со временем подвергаются полной денатурации.

На рис. 2 приведены флуоресцентные спектры САЧ в присутствии мочевины. С увеличением времени наблюдается снижение интенсивности эмиссии Тгр и смещение сигнала в сторону высоких длин волн. Это свидетельствует о том, что в системе преобладают взаимодействия, обусловленные образованием водородных связей.

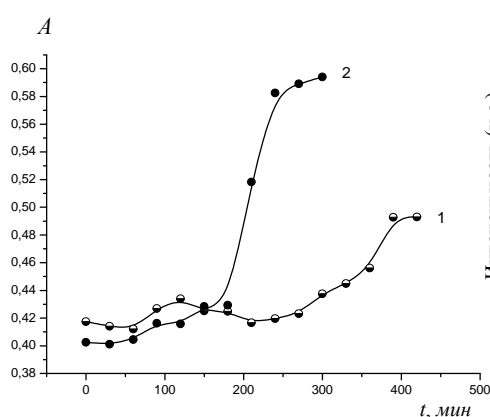


Рис. 3. УФ-профили химической денатурации САЧ (0,4 мг/мл) в присутствии мочевины (6 М) и ДМСО при 60<sup>0</sup>С: 1. ДМСО 10%; 2. 30%.

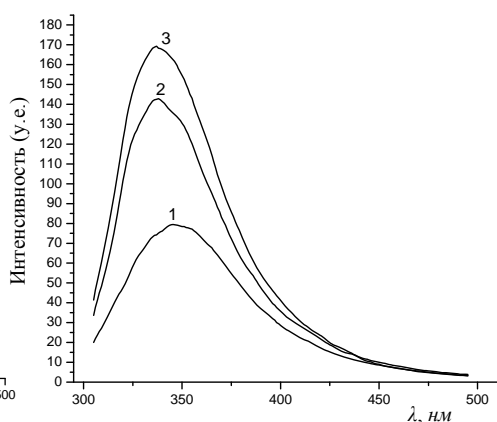


Рис. 4. Спектры флуоресценции САЧ (0,4 мг/мл) в присутствии мочевины (6 М) и ДМСО: 1. ДМСО – 0; 2. 10%; 3. 30%.

На рис. 3 представлены УФ-профили химической денатурации САЧ в присутствии мочевины (6 М) и ДМСО (10% и 30%) при 60<sup>0</sup>С. Сравнительный анализ показывает, что добавление ДМСО практически не меняет ход зависимостей (см. рис. 1). Экстремум на кривой при 100 мин остается, а части (а) и (б) с повышением концентрации ДМСО (30%) сливаются. На основе ИК-спектроскопических исследований и *Ab-initio* теоретических расчетов выявлено образование различных молекулярных комплексов мочевины с ДМСО [10]. Так как ДМСО (до 30%) при 60<sup>0</sup>С в отсутствие мочевины не денатурирует САЧ, то причиной интенсивной денатурации САЧ в присутствии ДМСО можно считать наличие комплексов мочевины–ДМСО. В присутствии этих комплексов в спектрах флуоресценции наблюдается смещение сигнала в сторону коротких волн (рис. 4). Причем с увеличением концентрации ДМСО до 30% смещение становится более ощутимым: при 10%  $\Delta\lambda \approx 8$  нм, а при 30%  $\Delta\lambda \approx 12$  нм.

Таким образом, можно сказать, что денатурация САЧ в присутствии комплексов мочевины с ДМСО происходит по двустадийной модели: первая стадия – разрыхление белковой глобулы, вторая стадия – полное разворачивание молекул белка. При денатурации в системе САЧ–мочевина–ДМСО преобладают гидрофобные взаимодействия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Sutkowska A., Bojko B., Rownicka J., Pentak D. and Sutkowski W.** J. Molec. Struct., 2003, v. 651, p. 237–243.
2. **Ahmad B., Khursheed K., Hag S. and Khan R.** Biochem. and Biophys. Res. Commun., 2004, v. 314, p. 166–173.
3. **Tjernberg A., Markova N., Griffiths W., Hallén D.** J. Biomolec. Screen., 2006, v. 11, № 2, p. 131–137.
4. **Muraldihara B. and Prakash V.** Current Science, 1997, v. 72, № 11, p. 831–834.
5. **Michnik A., Drzazga S.** J. Therm. Anal. and Calorim., 2007, v. 88, p. 449–454.
6. **Shan-Yang L., Yen-Shan W., Mei-Jane L., Shung –Li W.** Europ. J. Pharm. Biopharm., 2004, v. 57, p. 457–464.
7. **Григорян К.Р.** Ученые записки ЕГУ. Химия и биология, 2009, №3, с. 3–5.
8. **Григорян К., Маркарян Ш., Азнаурян М.** Проблемы криобиол., 2009, т. 19, № 1, с. 3–9.
9. **Singh A. and Darshi M.** New J. Chem., 2004, v. 28, p. 120–126.
10. **Markaryan S., Gabrielyan L., Grigoryan K.** J. Solut. Chem., 2004, v. 33, № 8, p. 1005.

Կ. Ռ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

### ՄԱՐԳՈՒ ՇԻՃՈՒԿԱՅԻՆ ԱԼԲՈՒՄԻՆԻ ԲՆԱՓՈԽՈՒՄԸ ՄԻՋԱՆՅՈՒԹ–ԳԻՍԵԹԻԼՍՈՒԼՖՕՔՍԻԴ ԿՈՄՊԼԵՔՍԵՐԻ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

Ա մ փ ո փ ո մ

Էլեկտրոնային կլանման և ֆլուորեսցենտային մեթոդներով ուսումնասիրվել է մարդու շիճուկային արբումինի (ՄՇԱ) քիմիական բնափոխումը ջուր–դիմեթիլսուլֆօքսիդային (ԳՍՍՕ) լուծույթներում միզանյութի ներկայությամբ  $60^{\circ}\text{C}$  ջերմաստիճանում: Ցույց է տրվել, որ լուծույթում առաջացող ԳՍՍՕ–միզանյութ կոմպլեքսները հարուցում են ՄՇԱ-ի բնափոխում: Առաջ է քաշվել ենթադրություն, որ ՄՇԱ-ի բնափոխումը իրականանում է երկու փուլով. առաջինը՝ սպիտակուցային գլոբուլների խարխուլում, երկրորդը՝ սպիտակուցի մոլեկուլի ամբողջական քանդում: ՄՇԱ–միզանյութ–ԳՍՍՕ համակարգում գերիշխում են հիդրոֆոբ փոխազդեցությունները:

K. R. GRIGORYAN

### DENATURATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN AT THE PRESENCE OF UREA–DIMETHYLSULFOXID COMPLEXES

Summary

Human serum albumin (HSA) chemical denaturation at  $60^{\circ}\text{C}$  in aqueous-dimethylsulfoxide (DMSO) solutions at the presence of urea has been investigated by the Uv/vis spectroscopy method. It has been shown that DMSO–urea complexes, which have been formed in the solution, induce the HSA denaturation. A suggestion has been made that the HSA denaturation has two stages at the presence of these complexes: the first stage – protein globule loosening and the second – full unfolding of protein molecule. In the HSA–urea–DMSO system predominate hydrophobic interactions.