



УДК 577.112.4:57.044:546.732:612.398.12
ББК 28.0

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ КОБАЛЬТСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ОКИСЛИТЕЛЕЙ

В.Г. Зайцев, Е.А. Литус, А.В. Жданова

Было изучено влияние окислительной модификации бычьего сывороточного альбумина (БСА) *in vitro* на его способность связывать ионы кобальта. Обнаружено, что различные окислители вызывают разнонаправленное изменение кобальтсвязывающей способности (КСС) БСА. Реактивы Фентона, продуцирующие гидроксильные радикалы, в зависимости от состава снижали или не изменяли КСС БСА. Наоборот, обработка БСА физиологическим окислителем HOCl повышает КСС этого белка. Обсуждаются возможные причины таких отличий в действии различных окислителей.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, белки, окислительная модификация, реактив Фентона, гидроксильный радикал, гипохлорная кислота, кобальт.

Различные окислители, в частности, активные формы кислорода (АФК), играют важную роль в нормальном функционировании и развитии патологических изменений в живых организмах. Избыток АФК может вызывать повреждение самых разнообразных биологически активных молекул. Одними из важнейших мишеней воздействия АФК являются белки. В связи с разнообразным химическим строением, особенностями структурной организации белков процесс их окислительной модификации носит сложный и специфический характер [1]. Очевидно, что структурные изменения белковой молекулы приводят – в той или иной степени – к изменению ее функциональной активности. Однако взаимосвязь между количеством модифицированных участков молекулы белка и степенью потери функциональной активности не является прямо пропорциональной. Кроме того, следует учитывать, что различные виды химической модификации аминокислотных остатков в полипеп-

тидах могут оказывать неодинаковое воздействие на нативную конформацию и функциональную активность белков.

Целью нашей работы было изучить, как изменяется способность транспортного белка БСА связывать ионы кобальта после окислительной модификации *in vitro*.

Методы исследования. Функциональную активность БСА как транспортного белка определяли по его способности связывать ионы кобальта (Co^{2+}). Для определения КСС использовали колориметрический метод, предложенный D. Barr-Or с соавторами, для определения ишемически-модифицированного альбумина [4; 9] с некоторыми нашими модификациями [2]. Метод основан на том, что БСА при инкубации *in vitro* связывает определенное количество ионов кобальта. Концентрацию оставшихся несвязанными ионов Co^{2+} затем устанавливали по образованию окрашенного комплекса с дитиотрейтолом (ДТТ) [8]. Для определения КСС 60 мкл 2,5 мМ CoSO_4 смешивали с 600 мкл 0,85–0,90 % NaCl , затем добавляли 200 мкл исследуемого раствора БСА. После пятиминутной инкубации при комнатной температуре добавляли 250 мкл реактива, содержащего 7 мМ ДТТ, 25 мМ

HEPES/КОН, pH 7,4, и 0,85 % NaCl. Строго через 2 мин измеряли оптическую плотность на длине волны 495 нм против холостой пробы, содержащей дистиллированную воду вместо раствора белка и раствора соли кобальта. В качестве калибратора использовали растворы CoSO_4 с различной концентрацией. КСС выражали в ммоль связанного Co^{2+} /г белка. Аналитическая вариабельность, рассчитанная как коэффициент вариации, не превышала 3 %. Протокол может быть также использован для анализа биологических жидкостей, в этом случае вместо раствора БСА добавляют сыворотку или гепаринизированную плазму крови человека или животных.

Окислительную модификацию альбумина гипохлорной кислотой HOCl (в форме гипохлорита натрия), определение содержания в нативном и модифицированном БСА содержания карбонильных групп с 2,4-динитрофенилгидразином и хлораминовых групп с 5-тио-2-нитробензойной кислотой проводили так, как описано в статье C.L. Hawkins, M.J. Davies [6]. Содержание SH-групп определяли модифицированным методом Элмана [3]. Окисление сывороточного альбумина гидроксильным радикалом проводили с помощью системы Фентона, содержащей соль переходного металла (Fe^{2+} или Cu^{2+}), Na_4 -соль этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА) и пероксид водорода (H_2O_2). В качестве источников ионов железа использовали сульфат железа (II) или соль Мора, ионов меди – сульфат или ацетат меди (II). Все результаты после статистической обработки представлены в виде медианы с указанием ее 95%-го доверительного интервала (95 % ДИ).

Результаты и обсуждение. Поскольку известно, что различные окислители могут модифицировать разные аминокислотные остатки в белках, мы изучили влияние двух видов физиологических окислителей. Одним из них был HOCl, образующийся в организме при активации фагоцитирующих клеток, и гидроксильный радикал, синтезирующийся, в частности, в реакции Фентона. Реагент Фентона, использованный нами, содержал соли двухвалентной меди или железа и H_2O_2 , а также ЭДТА, способную усиливать продукцию гидроксильного радикала. Наши результаты показали, что природа окислителя существенным образом влияет на функциональную активность БСА (рис. 1).

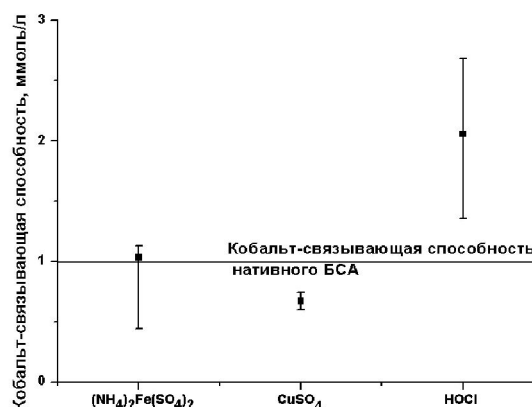


Рис. 1. КСС БСА после обработки гипохлоритом (HOCl, 3,62 мМ) и реагентом Фентона на основе солей меди (CuSO_4) и на основе солей Fe^{2+} [$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$]. Результаты представлены в процентах по отношению к КСС нативного БСА, принятой за 100 %. Результаты на данном и последующих рисунках представлены в виде медианы с указанием 95 % ДИ

Обработка БСА реагентом Фентона на основе сульфата меди статистически значимо ($p < 0,05$, критерий Манна – Уитни) снижала его КСС, что согласуется с опубликованными ранее данными [10]. Сюрпризом оказалось то, что замена соли меди на соль железа (II) приводила к исчезновению достоверных эффектов на КСС БСА. Особенно интересно, что при этом реактив Фентона на основе солей железа несколько стимулировал накопление продуктов перекисного окисления белков – карбонильных групп – в БСА, в то время как реактив Фентона на основе солей меди таких свойств не проявлял (см. рис. 2, а). Все варианты реактива Фентона вызывали некоторое снижение содержания SH-групп в молекуле БСА (см. рис. 3, а), по-видимому, за счет их окисления.

В отличие от реактива Фентона, HOCl вызывал в молекуле альбумина выраженное накопление карбонильных групп (см. рис. 2, б) и почти полное исчезновение SH-групп (см. рис. 3, б). Следовательно, под действием HOCl наблюдается более сильная окислительная модификация молекулы БСА. Однако это приводит не к снижению, а, наоборот, к повышению КСС БСА (см. рис. 1). Факт повышения КСС БСА после окисления HOCl не описан ранее в литературе и на первый взгляд может показаться мало объяснимым. Однако известно, что основной мишенью HOCl в белках является

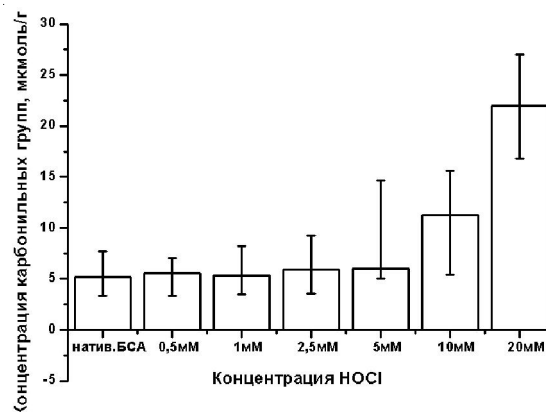
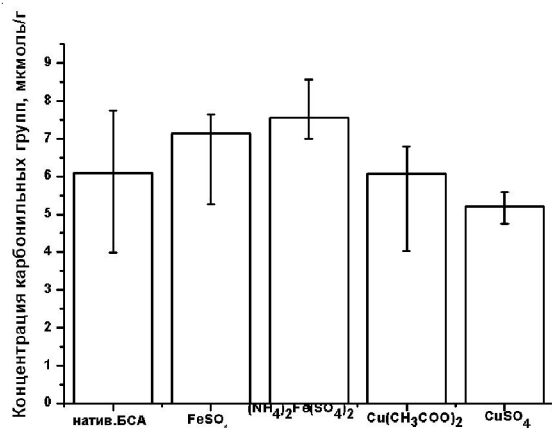


Рис. 2. Содержание карбонильных групп в БСА до и после обработки реактивами Фентона на основе различных солей меди и железа (а) и различными концентрациями гипохлорита (б)

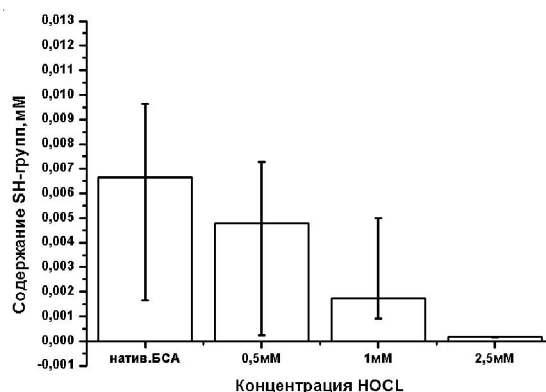
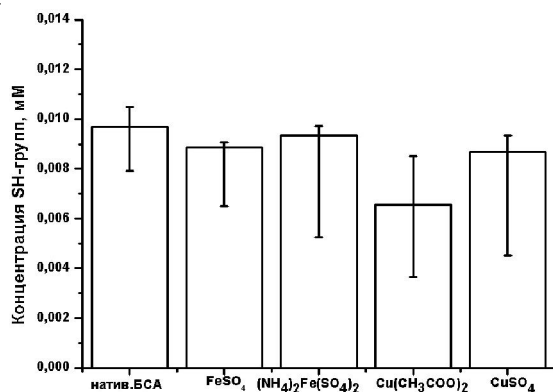


Рис. 3. Содержание SH-групп в БСА до и после обработки реактивами Фентона на основе различных солей меди и железа (а) и различными концентрациями гипохлорита (б)

ϵ -NH₂-группа лизина [7]. При этом происходит образование хлораминовых групп [8] и исчезновение положительного заряда у остатка лизина. В свое время было установлено, что обработка сывороточного альбумина рядом синтетических соединений, специфически взаимодействующих с ϵ -NH₂-группой лизина, приводит к повышению КСС [5]. В нашем исследовании мы показали, что обработка БСА HOCl вызывает концентрационно-зависимое накопление хлораминовых групп (рис. 4). Это позволяет полагать, что блокирование ϵ -NH₂-групп лизина под действием HOCl и изменение общего заряда белка в ходе окисления вызывает такие конформационные изменения в молекуле БСА, которые усиливают его способность связывать ионы кобальта.

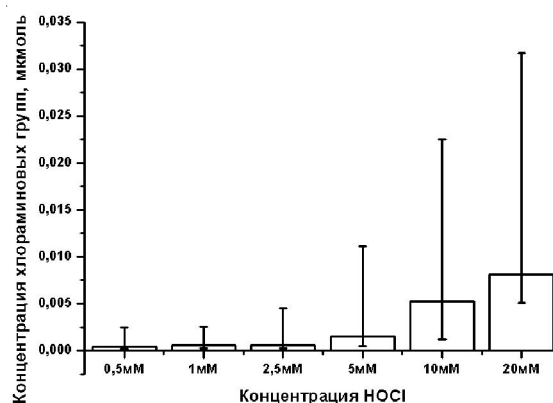


Рис. 4. Содержание хлораминовых групп в БСА после обработки гипохлорной кислотой в различных концентрациях. В нативном БСА хлораминовые группы отсутствовали

Таким образом, мы показали, что эффекты различных окислителей могут быть разнонаправлены. Их влияние на КСС БСА различно, что, вероятно, связано с отличающимися механизмами действия конкретных окислителей и с различиями в их основных мишенях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е. Е. Дубинина. – СПб. : Мед. пресса, 2006. – 400 с.
2. Литус, Е. А. Разработка протокола определения кобальтсвязывающей способности сыворотки у пациентов с возможной ишемией миокарда / Е. А. Литус, В. Г. Зайцев, О. В. Островский // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 9. – С. 51.
3. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов, И. С. Поротов // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
4. Bar-Or, D. A novel assay for cobalt albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report / D. Bar-Or, E. Lau,

- J. V. Winkler // J. Emerg. Med. – 2000. – V. 19, № 4. – P. 311–315.
5. Coddington, A. The effect of chemical modification on the uptake of cobalt ions by human serum albumin / A. Coddington, D. J. Perkins // Biochem. J. – 1958. – V. 69, № 4. – P. 45.
6. Hawkins, C. L. Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation / C. L. Hawkins, M. J. Davies // Biochem. J. – 1998. – V. 332, Pt. 3. – P. 617–625.
7. On the action of hypochlorite on human serum albumin / J. Arnhold, S. Hammerschmidt, M. Wagner, S. Mueller [et al.] // Biomed. Biochim. Acta. – 1990. – V. 49, № 10. – P. 991–997.
8. Rapid and accurate colorimetric determination of nickel and cobalt in protein solutions: U.S. Patent 6,020,204 / D. V. DerVartanian, M. R. Chenoweth. – 2000.
9. Reduction in the cobalt binding capacity of human albumin with myocardial ischemia / D. Bar-Or, E. Lau, N. Rao, N. Bampos [et al.] // Ann. Emerg. Med. – 1999. – V. 34. – P. 56.
10. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin / D. Roy, J. Quiles, D. C. Gaze, P. Collinson [et al.] // Heart. – 2006. – V. 92, № 1. – P. 113–114.

DIFFERENT CHANGES OF THE SERUM ALBUMIN COBALT-BINDING CAPACITY INDUCED BY VARIOUS OXIDANTS

V.G. Zaitsev, E.A. Litus, A.V. Zhdanova

Impact of *in vitro* oxidative modification of the bovine serum albumin (BSA) on its cobalt-binding capacity (CoBC) was studied. We found various oxidants differently changed CoBC of BSA. The Fenton's reagents producing hydroxyl radical decreased or not alter CoBC of BSA depending on composition of ones. In contrast, treatment of BSA by hypochlorous acid, a physiological oxidant, elevated CoBC of this protein. Probable causes of different effects produced by various oxidants is discussed.

Key words: serum albumin, proteins, oxidative modification, Fenton's reagent, hydroxyl radical, hypochlorous acid, cobalt.