



УДК 547.937+547.962.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОДИНАМИКИ И МЕХАНИЗМА
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИЛИРУБИНА
С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ В НЕЙТРАЛЬНЫХ
И СЛАБОЩЕЛОЧНЫХ СРЕДАХ

Шаповаленко Е. П., Колосов И. В.

*2-й Московский государственный медицинский институт им.
И. И. Пирогова*

Методом растворимости изучено взаимодействие билирубина с альбумином в нейтральных и слабощелочных средах при pH 5—9. На основе графических построений Скотчарда показано наличие двух типов мест связывания билирубина на молекуле альбумина: сильного связывания 1—2 молекул билирубина и слабого до 10—14 молекул. Исследована зависимость констант обоих типов взаимодействий от pH и температуры. Исходя из анализа вкладов энтропии и энтальпии в изменение свободной энергии в условиях равновесного связывания сделаны предположения о механизмах взаимодействия билирубина с альбумином. Подчеркивается значение слабого взаимодействия как основного резерва поглощения билирубина альбумином в плазме крови и источника свободного билирубина при вытеснении его из этих мест лекарственными препаратами и компонентами плазмы крови.

Исследования последних лет показали большое физиологическое значение взаимодействия билирубина с альбумином при различного рода желтухах [1, 2]. Сывороточный альбумин обратимо связывает и транспортирует билирубин в плазме крови, уменьшая его токсичность и проницаемость в ткани [3]. В связи с этим выяснение параметров и механизма данного взаимодействия представляет большой практический интерес.

Сведения о местах связывания билирубина на молекуле альбумина, полученные различными физико-химическими методами [4—12], противоречивы и подчас трудносопоставимы (см. табл. 1). Установлено, что первая молекула билирубина связана достаточно прочно, в то время как последующие (одна или две) проявляют меньшее сродство к альбумину [6, 7, 13], причем в устойчивости комплекса могут вносить вклад различные по механизму взаимодействия [4, 14, 15]. При исследовании механизма взаимодействия состояние свободного билирубина в растворе, а тем более в комплексе в большинстве случаев не рассматривалось.

В предыдущей работе [16] нами для изучения связывания билирубина с человеческим сывороточным альбумином в кислых средах был выбран метод растворимости. Большим достоинством этого метода явилась возможность исследования собственно состояния билирубина в растворе и некоторых закономерностей гидрофобного взаимодействия с альбумином. Дальнейшее применение метода в более широких условиях (при нейтральных и щелочных значениях pH (5—9), для больших концентраций белка (5—20 мкМ) и для соотношений билирубин—альбумин 1:2—60:1)

позволило выявить наличие по крайней мере двух классов мест связывания билирубина на альбумине: сильного и слабого. В связи с этим задачей данного исследования явилось выяснение параметров, природы сил и механизма обоих типов взаимодействия на основании исследования равновесия в зависимости от pH, концентраций реагентов, температуры.

Предварительно нами была изучена растворимость билирубина в водных растворах при pH 3—12. Зависимость растворимости от pH, отражающая состояние кислотно-основного равновесия в билирубине в водном растворе, характеризуется наличием трех скачков (рис. 1) и соответственно трех форм билирубина, ионизированных последовательно по функциональным COOH-группам остатков пропионовой кислоты, NH-группам пиррольных колец А и D, NH-группам пиррольных колец В и С:

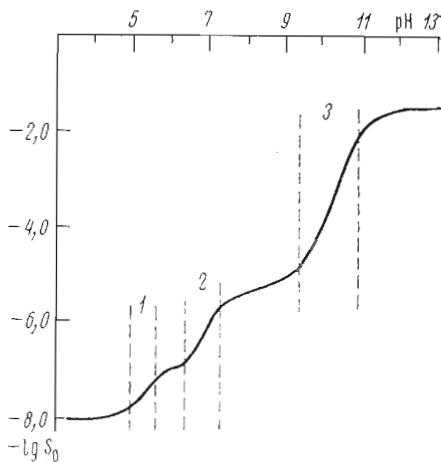


Рис. 1. pH-Зависимость растворимости ($\lg S$) различных форм билирубина в водном растворе. Область ионизации: 1 — COOH-групп, 2 — NH-групп пиррольных колец А и D, 3 — NH-групп пиррольных колец В и С

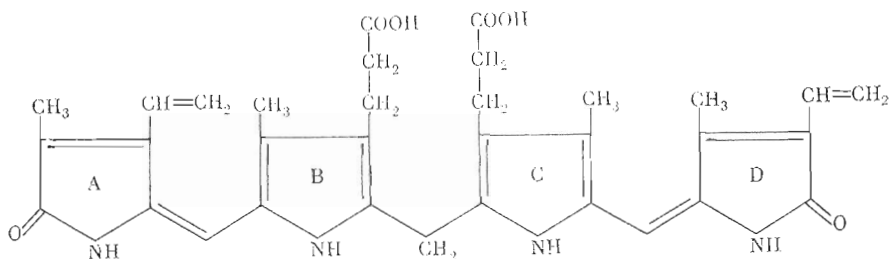
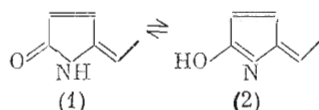


Таблица 1
Анализ литературных данных параметров взаимодействия билирубина с альбумином

Метод исследования	Условия			n *	Константа ассоциации, $K \cdot 10^{-3}$, M^{-1}	Лит-ра
	среда	pH	тем-ра, °C			
Круговой дихроизм »	Без солей 0,5 M NaCl	5,0	25	1	5,7±1,5	4,5
		8,5	24	1	6,7	
	Без солей	8,5	24	1	0,3	
		8,5	24	1	5-7	
		8,5	24	1	0,1-0,3	
Кинетический метод »	Трис-буфер Фосфатный буфер	8,2	37	1	0,02-0,03	6
		8,2	37	2	143	7
Кинетические измерения в потоке Флуоресценция	»	7,4	36	1	0,5	8
		7,4	36	1	27	8
Ультрацентрифугирование, диализ Равновесный диализ	»	7,4	25	1	29	9
		7,4	25	1	70	10
Экстракция в системе $CHCl_3-H_2O$	0,01 M KCl Без солей	7,4	4	10	6	1,5
		7,9	37	1	15	11
		8,5	24	1	2	6

* n — число мест связывания билирубина на молекуле альбумина.

Эти данные позволили рассчитать параметры кислотно-основного равновесия билирубина [17], в нашей работе они были необходимы для выяснения состояния билирубина в белковом комплексе. Наибольшее значение в дальнейшем будет иметь вторая константа ионизации билирубина, которая может отражать и диссоциацию ОН-групп, учитывая возможность таутомерного равновесия:



Поэтому в целом состояние билирубина в растворе помимо кислотно-основного равновесия должно быть охарактеризовано положением таутомерного равновесия, стереохимией молекулы и состоянием водородных связей. На основании спектроскопических данных [18—20] в настоящее время признано, что таутомерное равновесие для пиррольных колец А и D практически полностью смещено в сторону лактамной формы (1) за счет значительной стабилизации последней шестью водородными связями с участием групп NH, CO, COOH [21].

Расчет числа мест и констант взаимодействия билирубина с альбумином проводили по методу Скэтчарда [22], используя графические построения функции $\bar{n}/[B]$ от среднего координационного числа n , где $[B]$ — концентрация несвязанного билирубина. Графики Скэтчарда (рис. 2) для различных значений pH характеризуются наличием двух ниспадающих участков, соответствующих, по Скэтчарду, двум классам мест (или типам) связывания билирубина на молекуле альбумина: классу сильного сродства с присоединением 1—2 молекул билирубина и слабого сродства с числом мест 10—14. Общее уравнение, описывающее этот процесс, с учетом двух классов мест связывания имеет вид

$$\frac{\bar{n}}{[B]} = \frac{n_1 K_1}{1 + K_1 [B]} + \frac{n_2 K_2}{1 + K_2 [B]} \quad (1)$$

и является комбинацией двух уравнений Скэтчарда для одного и другого типа изотерм связывания. В формуле (1) n_i — число мест связывания, $n_i K_i$ — макроскопическая константа присоединения n_i молекул билирубина к молекуле белка, K_i — микроскопическая константа присоединения одной молекулы в каждом классе i . Эти параметры находили при экстраполяции прямолинейных участков графиков Скэтчарда с математической обработкой прямым методом наименьших квадратов, используя соотношения:

на первом участке кривой ($\bar{n} < n_1$):

$$\lim_{[B] \rightarrow 0} \frac{\bar{n}}{[B]} = n_1 K_1 + n_2 K_2 = A_1, \quad (2)$$

$$\lim_{[B] \rightarrow \infty} \bar{n} = n_1, \quad (3)$$

на втором участке кривой ($\bar{n} > n_1$):

$$\lim_{[B] \rightarrow 0} \frac{\bar{n} - n_1}{[B]} = n_2 K_2 = A_2, \quad (4)$$

$$\lim_{[B] \rightarrow \infty} \bar{n} = n_1 + n_2 = N. \quad (5)$$

Поскольку ошибка в определении величины A_1 оказалась в пределах A_2 , последней пренебрегали в уравнении (2) и проводили допущение $A_1 \approx n_1 K_1$ (6). Рассмотрение зависимости K и n от pH для каждого типа взаимодействия (рис. 3) показывает, что сильное взаимодействие (рис. 3а) отличается резкой pH-зависимостью константы ассоциации и скачкообразным изменением n от 1 до 2 в области pH 7,40—7,75. Увеличение сред-

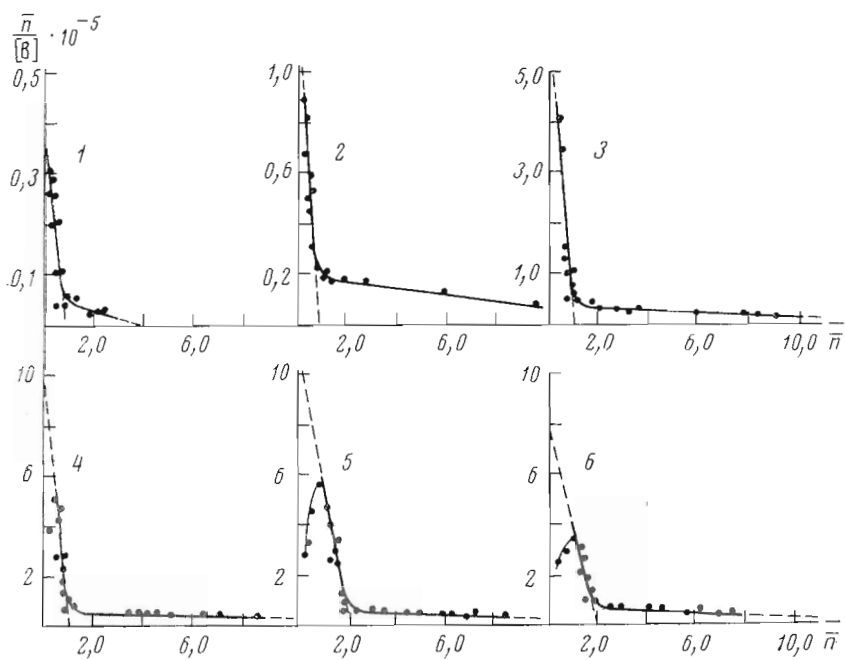


Рис. 2. Графики Скэтчарда системы билирубин — альбумин при pH 5,5 (1), 5,8 (2), 6,4 (3), 7,0 (4), 8,0 (5), 9,0 (6)

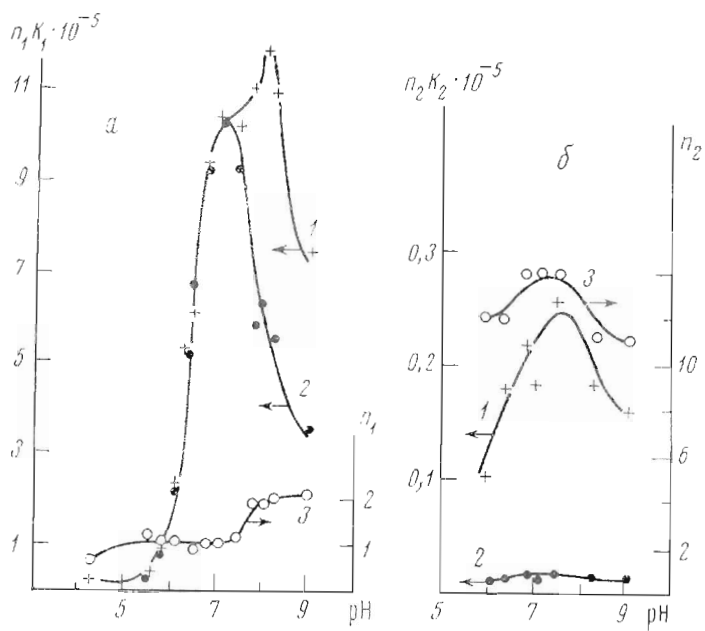


Рис. 3. pH-Зависимость физико-химических параметров сильного (а) и слабого (б) взаимодействий. 1 — nK — макроскопическая константа взаимодействия, 2 — K — микроскопическая константа, 3 — n — число мест связывания

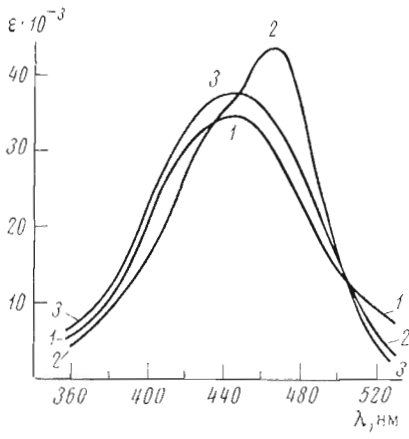


Рис. 4

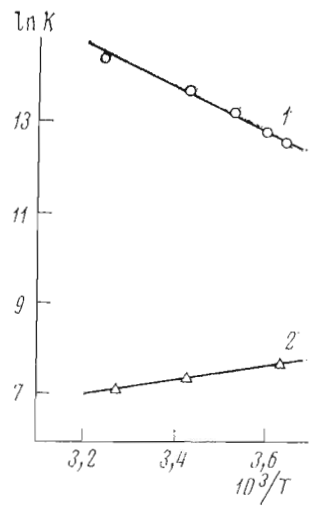


Рис. 6

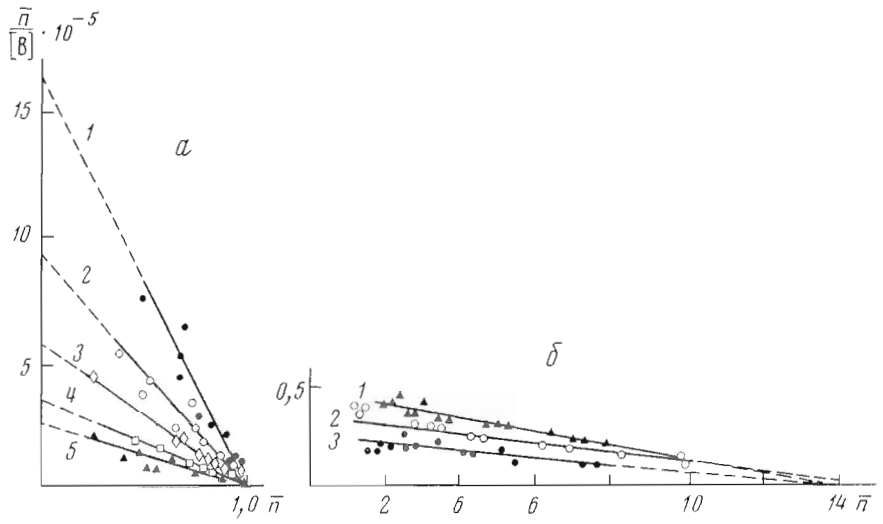


Рис. 5

Рис. 4. Спектры поглощения водных растворов: 1 — билирубина 12 мкМ ($\lambda_{\text{макс}} = 444$ нм, $\epsilon_{444} = 35\,000$); 2 — билирубина 12 мкМ + альбумин ($\lambda_{\text{макс}} = 470$ нм, $\epsilon_{470} = 44\,200$); 3 — билирубина 150 мкМ + альбумин ($\lambda_{\text{макс}} = 444$ нм, $\epsilon_{444} = 38600$)

Рис. 5. Графики Скэтчарда для сильного (а) и слабого (б) взаимодействия при температуре (°C): а — 37 (1), 20 (2), 12 (3), 6 (4), 3 (5), б — 3 (1), 20 (2), 37 (3)

Рис. 6. Зависимость логарифма константы ($\ln K$) от обратной температуры для сильного (1) и слабого (2) взаимодействий

ства наблюдается до рН 7,0, вблизи физиологического значения рН 7,4 происходит падение K_1 , которое компенсируется до рН 8,0 ростом n_1 . Дальнейшее уменьшение K_1 , по-видимому, связано с ростом эффекта электростатического отталкивания одноименно заряженных групп белка и билирубина. рН-Зависимость константы сильного связывания (рис. 3а, участок подъема), очевидно, отражает роль ионизации белка и билирубина при образовании системы альбумин—билирубин, причем ионизация последнего играет большую роль в этом процессе, так как наблюдается хорошая

Термодинамические параметры для двух типов взаимодействия билирубина с альбумином

Тип	Тем-ра, К	$nK \cdot 10^{-5}, M^{-1}$	n	$K \cdot 10^{-5}, M^{-1}$	ΔG°	ΔH°	ΔS°
					ккал/моль		кал/моль·град
1	276	$2,6 \pm 0,3$	1,1	2,4	-6,80	9,0 ± 1,0	57,8 ± 3,6
	279	$3,8 \pm 0,4$	0,9	4,2	-7,15		
	285	$5,9 \pm 0,3$	1,0	5,9	-7,50		
	293	$9,4 \pm 1,1$	1,0	9,4	-8,24		
	310	$16,8 \pm 2,0$	1,0	16,8	-8,81		
2	276	$0,27 \pm 0,01$	11	0,025	-4,28	-2,6 ± 0,5	5,8 ± 1,8
	293	$0,22 \pm 0,02$	13	0,017	-4,32		
	310	$0,16 \pm 0,01$	11	0,015	-4,47		

корреляция между кривой рН-зависимости K_1 и ходом кривой растворимости билирубина в области рН 6,2—7,4. Это позволяет сделать вывод о непосредственном участии в комплексообразовании формы билирубина, ионизированной по NH-группам пиррольных колец А и D, диссоциация которых имеет место в области рН 6,2—7,5.

Следует отметить еще некоторые особенности сильного связывания: 1) смещение в спектре поглощения билирубина полосы Сорс от 444 до 470 нм (максимальный сдвиг до 477 нм, рН 8—10) с увеличением коэффициента молярного поглощения (рис. 4), 2) появление эффектов Коттона в поляризованном свете в области длин волн 350—500 нм [4—6], 3) появление флуоресценции билирубина в белковом растворе [9]. Спектральные сдвиги могут быть связаны с изменениями в резонансной структуре билирубина, эффекты Коттона свидетельствуют о напряженной нелинейной конформации билирубина в комплексе.

Для слабого взаимодействия характерна большая связывающая способность белка в отношении билирубина с меньшим сродством и менее выраженной рН-зависимостью. В этих условиях максимум спектра поглощения комплексного соединения вновь смещается к полосе свободного билирубина 444 нм (рис. 4). В этом отношении процесс слабого взаимодействия подобен солиubilизации, рассмотренной нами ранее [16].

Для решения вопроса о природе сил и механизмах сильного и слабого взаимодействия проведен анализ температурных зависимостей процесса при рН 6,75, соответствующего области максимального сродства. С увеличением температуры происходит рост первой константы и уменьшение второй без изменения в числе мест (рис. 5). Расчет вкладов энтальпии и энтропии в изменение свободной энергии проводили, используя построения зависимости логарифма константы от обратной температуры по Вант-Гоффу (рис. 6). Результаты расчетов (табл. 2) показывают, что в первом случае уменьшение свободной энергии — это энтропийный процесс, во втором уменьшение свободной энергии определяется выделением небольшого количества тепла при агрегировании молекул билирубина и белка с незначительным ростом энтропии.

Рост энтропии в системе билирубин — альбумин — свидетельство роста разупорядоченности в ней, который может достигаться процессами разрыва внутримолекулярных водородных связей в билирубине и альбумине, дегидратации связывающих зон белка и разрушения структурированной воды, а также конформационными изменениями в белке и билирубине. Определение вклада каждого из этих процессов довольно сложно и представляет предмет отдельного исследования. В частности, в пользу гипотезы о разрыве внутримолекулярных водородных связей говорит тот факт,

что изменение энтальпии взаимодействия сравнимо с величиной энергии водородных связей, при этом знак указывает на направление процесса. По-видимому, это может привести к изменению конформации белковой глобулы в пользу появления большего количества мест с меньшим сродством. Последнее согласуется с гипотезой Каруша [23]. Энтропийная составляющая упругих напряжений в глобуле при поглощении субстрата может быть достаточно велика [24].

Слабое взаимодействие по величине, знаку энтальпии и изменению энтропии соответствует гидрофобному связыванию, обусловленному ван-дер-ваальсовыми силами, и согласуется с величинами, полученными нами ранее [16].

При объяснении молекулярного механизма сильного взаимодействия было замечено, что спектральные характеристики билирубина в белковом комплексе и билирубина в водных растворах некоторых органических растворителей (метанол, этанол, тетрагидрофуран) имеют много общего. Анализ сдвига в спектре поглощения билирубина в органических растворителях показывает, что в этом случае имеет место таутомерный переход лактамной формы билирубина в лактимную, причем величина этого сдвига пропорциональна протоноакцепторной способности растворителя и возрастает в ряду: метанол, этанол, тетрагидрофуран. Последнее соответствует литературным данным для подобных таутомерных переходов [25].

Аналогия в поведении белка и органических растворителей дает основание утверждать, что лактимная форма билирубина должна иметь большее сродство к белку за счет образования межмолекулярных водородных связей с альбумином и стабилизации ее неполярным окружением белка или органического растворителя. Цепь сопряжения в резонансной структуре билирубина при переходе в лактимную форму возрастает. Это объясняет длинноволновый сдвиг в спектре поглощения билирубина при взаимодействии его с альбумином (рис. 4).

В связи с этим интересно было рассмотреть и действие аминокислот, как составляющих белка, на спектр поглощения билирубина. Нами были исследованы спектры смесей билирубина со всеми аминокислотами, входящими в альбумин, однако лишь в присутствии аргинина, лизина, пролина и аспарагина наблюдались небольшие длинноволновые сдвиги до 450—460 нм. Этот факт, с одной стороны, говорит о непосредственном участии указанных аминокислот в связывании (за счет образования водородных связей), с другой — не исключает возможного участия других и однозначно свидетельствует о роли гидрофобных областей полипептидной цепи в связывании билирубина.

Следует подчеркнуть взаимосвязь обоих типов взаимодействия, о чем свидетельствуют термодинамические параметры, и значительную роль сильного взаимодействия в подготовке слабого. Явление слабого взаимодействия, описанное количественно для этой системы впервые, имеет большое физиологическое значение, поскольку в этих условиях процесс переноса и аккумуляции билирубина в органах и тканях будет объясняться скорее всего конкурентной реакцией слабосвязанного билирубина с компонентами плазмы крови, экзогенными веществами и лекарственными препаратами.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты билирубина ТУ 364-69 и человеческого сывороточного альбумина (Reanal, Венгрия). Исследование проводили методом растворимости, описанным в работе [16]. Все процедуры, связанные с отделением несвязавшегося билирубина (встряхивание растворов, центрифугирование, фильтрование), проводили в термостате с водяным обогревом (Венгрия) при постоянной температуре с отклонением $\pm 1^\circ$. Концентрацию связанного билирубина определяли в фильтрате по

диазореакции [26]. Для поддержания постоянного значения рН в области 5—9 использовали универсальные буферные растворы с постоянной ионной силой $0,15 \pm 0,03$. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре SP-700 (Unicam, Англия). Все эксперименты проводили при 20° ; концентрация альбумина в опытах равнялась 20 мкМ; рН, кроме специально оговоренных экспериментов, составлял 6,75.

Для нахождения параметров взаимодействия K_1 , n_1 , n_2 , K_2 , N проводили графические построения Скэтчарда с обработкой прямолинейных участков методом наименьших квадратов. Относительная ошибка в определении полученных величин не превышает 15—20% (для рН-зависимости) и 10—15% (для температурной зависимости). Теоретические кривые были рассчитаны по полученным данным n_1 , K_1 , n_2 , K_2 с использованием уравнения (1) для двух мест связывания. Сопоставление расчетной кривой и экспериментальных значений для рН 7,0 представлено на рис. 7. Средняя квадратичная ошибка эксперимента в целом не превышает $\pm 20\%$.

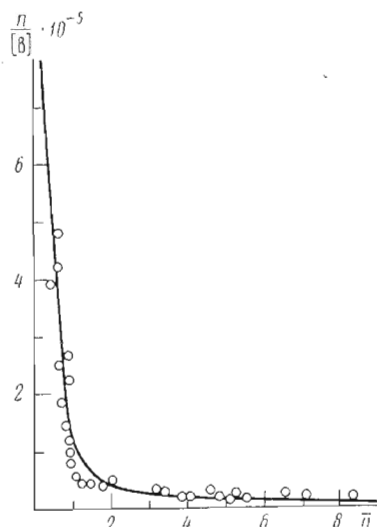


Рис. 7. Сопоставление расчетной кривой Скэтчарда для двух мест связывания с экспериментальными значениями

ЛИТЕРАТУРА

1. With T. K. (1968) Bile Pigments, p. 5—30, Acad. Press, N. Y.
2. Diamond J. (1969) in Advances in Pediatrics, 16, 99—110.
3. Ogasawara N., Watanabe T., Goto H. (1973) Biochim. et biophys. acta, 327, 233—237.
4. Blauer G., King T. E. (1970) J. Biol. Chem., 245, 372—381.
5. Blauer G., King T. E. (1968) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 31, 678—684.
6. Beaven G. H., D'Albis A., Gratzner W. B. (1973) Eur. J. Biochem., 33, 500—510.
7. Jacobsen C. (1969) FEBS Lett., 5, 112—114.
8. Faerch T., Jacobsen J. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 168, 351—357.
9. Chen R. F. (1973) Fluorescence Techn. Cell. Biol., pp. 273—282, Berlin.
10. Sholtan W., Gloxhuber C. (1966) Arzneimittel-Forsch., 16, 520—528.
11. Krasner J., Giacoia G. P., Yaffe S. J. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci., 226, 101—114.
12. Tuilie M., Lardinous R. (1972) Biol. Neonate, 21, 447—462.
13. Kucerova L., Jirsa M. (1969) Sb. Lecar., 71, 114—118.
14. Jacobsen C. (1972) Eur. J. Biochem., 27, 513—519.
15. Brodersen R., Funding L., Pedersen A. O., Røigaard-Petersen H. (1972) Scand. J. Clin. and Lab. Invest., 29, 433—446.
16. Колосов И. В., Шаповаленко Е. П. (1976) Биоорг. химия, 2, 1660—1664.
17. Колосов И. В., Шаповаленко Е. П. (1977) Ж. общ. химии, 47, 2163—2164.
18. Falk H., Gergely S., Grybmayr K. (1976) Monatsch. Chem., 107, 827—830.
19. Kuenzle C. C., Weibel M. H., Pelloni R. R., Hemmerich P. (1973) Biochem. J., 133, 364—368.
20. Bonnet R., Davies J. E., Hursthouse M. B. (1976) Nature, 262, 326—328.
21. Manitto P., Monti D. (1976) J. Clin. Soc. Chem. Commun., № 4, 122—123.
22. Schatchard G., Colemann J. S., Shen J. (1957) J. Amer. Chem. Soc., 79, 12—21.
23. Karush F. (1950) J. Amer. Chem. Soc., 72, 2705—2713.
24. Гросберг А. Ю., Либероль В. Д. (1977) Биофизика, 21, 610—614.
25. Пои Р. С., Закжевски Я. А., Ершов Б. А., Кольцов А. И. (1975) Ж. орган. химии, 11, 1590—1594.
26. Колосов И. В., Шаповаленко Е. П. (1976) Лабор. дело, 7, 419—422.

Поступила в редакцию
15.VII.1977
После доработки
29.IX.1977

**A STUDY OF THERMODYNAMICS AND MECHANISM OF BILIRUBIN
AND SERUM ALBUMIN INTERACTION IN NEUTRAL AND WEAKLY
ALKALINE MEDIA**

SHAPOVALENKO E. P., KOLOSOV I. V.

N. I. Pirogov 2nd Medical State Institute, Moscow

The interaction between bilirubin and albumin has been studied relying upon solubility determination over neutral and weakly alkaline pH range (pH 5-9). It is inferred from the Scatchard plots that there are bilirubin binding sites of two types in albumin: tight binding of 1-2 bilirubin molecules and poor one for 10-14 molecules. The pH and temperature dependences of the constants relevant to the interactions of both kinds have been determined. Based on the analysis of entropy and enthalpy contributions to the free energy change under the conditions of equilibrium binding, an assumption has been made on the mechanism of bilirubin-albumin interaction. It is emphasized that weak interactions may play the role of a main reserve in bilirubin absorption by plasma albumin, as well as a source of free bilirubin when it is displaced by medicines or plasma components.
