



УДК 577.23+547.962.3.04

МЕХАНИЗМЫ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕКСЕНАЛА И ВИАДРИЛА
СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ*Островский В. Ю., Степура И. И.**Гродненский госмединститут, курс анестезиологии,
Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР, Гродно*

Установлено, что производное барбитуровой кислоты, гексенал, и анестетик стероидной природы, виадрил, связываются ϵ -NH₂-группами лизина, расположенными на поверхности молекулы бычьего сывороточного альбумина. С двумя наиболее доступно расположенными остатками лизина и тремя остатками аргинина связывается 1-анилинонафталин-8-сульфонат, который может быть конкурентно вытеснен с лизиновых остатков гексеналом, виадрилом или монокарбонными жирными кислотами. Эффективность последних линейно возрастает на каждую СН₂-группу вплоть до С₅-С₆. Связанные с аргинином молекулы сульфоната конкурентно вытесняются только высшими (С₈-С₁₂) жирными кислотами.

На отдельных этапах транспорта и действия многих природных биологически активных веществ (гормоны, нейромедиаторы) уже неоднократно демонстрировались их специфические взаимодействия с белками [1] и мембранами [2]. Определенное значение в эффектах различных ксенобиотиков, в том числе отдельных лекарственных средств, также отводится их связыванию белками-рецепторами [3, 4] или белками, выполняющими транспортную функцию [5]. Как правило, в настоящее время лишь констатируется сам факт таких взаимодействий, но их молекулярный механизм остается неизвестным или малоизученным. Вопрос этот имеет принципиальное значение для понимания фармакокинетики и фармакодинамики любого лекарственного препарата [6].

В настоящей работе изучался характер связывания бычьим сывороточным альбумином (далее — альбумин) производного барбитуровой кислоты, гексенала, и анестетика стероидной природы, виадрила, широко используемых в лечебной практике. Сейчас уже известно, что барбитураты транспортируются в крови сывороточным альбумином [5] и в отличие от некоторых анестетиков [4] при взаимодействии с белком не вызывают в молекуле последнего конформационных изменений. Исходя из наличия в гексенале и виадриле электрофильной карбоксильной группировки и выраженных липофильных свойств второго препарата, эксперименты проводились в направлении поисков гидрофобных взаимодействий и проверки наиболее вероятного пути фиксации исследуемых соединений по свободным аминогруппам на белке. Поэтому в качестве модификаторов мы использовали пиридоксаль-Р, ацетальдегид и ацетилацетон, а в качестве молекулы-зонда был применен 1-анилинонафталин-8-сульфонат (ANS).

Флуоресценция ANS, связанного альбумином, частично уменьшается при добавлении к исследуемому раствору гексенала или виадрила (рис. 1), что позволяет предполагать конкуренцию каких-то центров на белке за

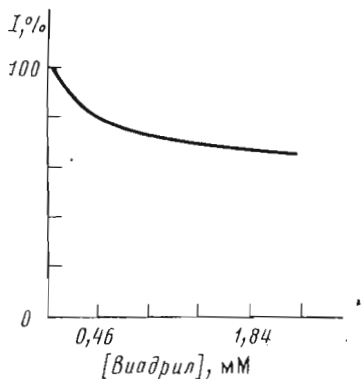


Рис. 1

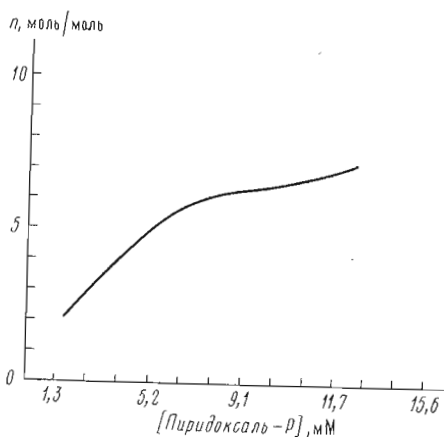


Рис. 2

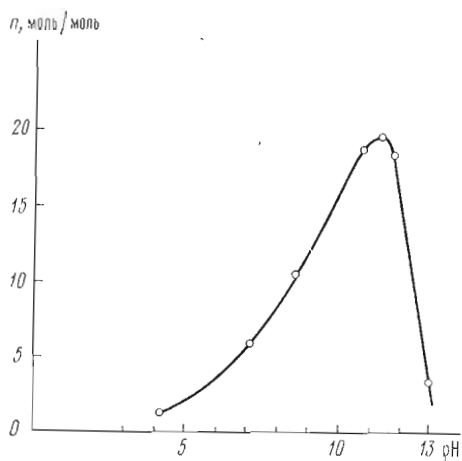


Рис. 3

Рис. 1. Гашение виадрилом флуоресценции (I) ANS, связанного бычьим сывороточным альбумином (концентрация белка $2,25 \cdot 10^{-5}$ M; 0,05 M фосфатный буфер, pH 6,8)

Рис. 2. Зависимость степени модификации альбумина от концентрации пиридоксаль- P ; n — число остатков пиридоксил- P , связанных с 1 моль белка. Время инкубации смеси альбумина (25 мкM) с пиридоксаль- P до добавления NaBH_4 — 5 мин

Рис. 3. Зависимость степени модификации альбумина пиридоксаль- P от pH среды; n — число остатков пиридоксил- P , связанных с 1 моль белка. Время инкубации смеси альбумина (20 мкM) с пиридоксаль- P (6 мM) до добавления NaBH_4 15 мин

связывание с анионной группой ANS или карбонильными группами аневтиков. Действительно, уже есть данные о том, что модификация аминокрупп аргинина [7] или лизина в альбумине [8] существенно ослабляет связывание им ANS и других анионных красителей. Возникла необходимость в связи с этим определить количество и природу свободных аминокрупп белка, участвующих во взаимодействии с изучаемыми соединениями

Меняя концентрацию пиридоксаль- P в смеси с белком, можно показать, что вначале в реакцию вовлекается около шести аминокрупп, а затем при росте концентрации пиридоксаль- P их число существенно возрастает (рис. 2). Однако существование плато позволяет предположить, что шесть аминокрупп наиболее доступны. Количество модифицируемых аминокрупп также зависит и от значения pH (рис. 3).

Все эти данные свидетельствуют, что пиридоксаль- P в больших избытках (100 раз и более по отношению к белку) является эффективным малоспецифическим модификатором $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп альбумина. Специфичность модификации с помощью пиридоксаль- P , обусловленная фиксацией фосфатной группы и расстоянием центра фиксации от соответствующей аминокгруппы, показанная в ряде работ, вероятно, проявляется лишь при малых, например эквивальных по отношению к белку [9], концентрациях. В пользу последнего допущения говорит и тот факт, что в растворе 6 M гуанидина хлоргидрата избытком пиридоксаль- P модифицируются почти все (50 $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп) определяемые в первичной структуре альбумина [10]

Связывание ANS сывороточным альбумином и его производными

Номер опыта	Состав инкубационной смеси	Концентрация лиганда, М **	Стадии последующей обработки смеси	$I_{0\text{тн}}$ в комплексе с ANS, %	Количество флуоресцирующих молекул ANS, связанных с белком	Количество модификатора, связанного с альбумином, моль/моль
1	Альбумин	—	—	100	5 [13]	—
2	Пиридоксаль- <i>P</i> *	$6 \cdot 10^{-3}$	NaBH_4 , G-25	60–70	3	6
3	Ацетальдегид	0,1	NaBH_4 , G-25	60–70	3	6
4	Пиридоксаль- <i>P</i> , гексенал (или виадрил)	$5 \cdot 10^{-3}$	NaBH_4 , G-25	100	5	4
5	Ацетилацетон	$3 \cdot 10^{-2}$	G-25	1–2	0	<i>n</i>
6	»	$3 \cdot 10^{-2}$	NH_2OH , G-25	35–40	2	<i>n</i> –2
7	Нингидрин	10^{-4}	G-25	35–40	2	4
8	Нингидрин и ANS	$2 \cdot 10^{-4}$	G-25	100	5	1
9	Валериановая кислота	10^{-2}	G-25	100	5	—
10	Пиридоксаль- <i>P</i> и валериановая кислота	—	NaBH_4 , G-25	100	5	4

* Здесь и ниже указаны компоненты, присутствующие в смеси помимо сывороточного альбумина ($1,5 \cdot 10^{-5}$ М).

** Приведена концентрация впервые используемого компонента смеси. Концентрации остальных компонентов во всех опытах сохранялись постоянными.

лизинные остатки. По-видимому, фосфатная группировка пиридоксаль-*P* может выполнять лишь фиксирующую функцию при специфических условиях окружения аминокрупп у отдельных белков и только при низких концентрациях модификатора.

В опытах, где мы изучали связывание анестетиков и ANS с альбумином, одинаковые результаты были получены при использовании в качестве конкурентов пиридоксаль-*P* и ацетальдегида (табл. 1), и, таким образом, вклад фосфатной группировки во взаимодействие с белком или в конкуренцию с сульфогруппной полностью исключался (табл. 1, опыты 2 и 3).

Все описываемые далее эксперименты выполнены в условиях, когда молекула альбумина связывает только 6 остатков пиридоксаль-*P* (плато на рис. 2), т. е. находится в определенной, достаточно стабильной конформации. Флуоресценция ANS при этом (табл. 1, опыт 2) уменьшается только на 30% и уже не изменяется при внесении в тот же раствор виадрила или гексенала. С другой стороны, предварительное добавление к раствору белка виадрила или гексенала (табл. 1, опыт 4) уменьшает число аминокрупп, модифицируемых с помощью пиридоксаль-*P*, до четырех. Количество связанных с альбумином молекул пиридоксаль-*P* также уменьшается до 4 в присутствии ANS ($1 \cdot 10^{-4}$ М), т. е. конкуренция ANS с пиридоксаль-*P* наблюдается только для двух из шести остатков лизина.

Флуоресценция красителя, добавленного к альбумину, модифицированному в присутствии гексенала или виадрила (табл. 1, опыт 4), или к белку, модифицированному пиридоксаль-*P* в присутствии ANS, совпадает с флуоресценцией зонда в комплексе с исходным альбумином. Полученный результат позволяет заключить, что с ANS, гексеналом и виадрилом способны активно взаимодействовать одни и те же две $\epsilon\text{-NH}_2$ -группы белка.

Другие аминокруппы, расположенные на поверхности молекулы альбумина и легко модифицируемые при данной концентрации пиридоксаль-*P*, с ANS практически не взаимодействуют.

Можно полагать, что из 6 упоминавшихся аминокрупп 5 являются $\epsilon\text{-NH}_2$ -группами лизина, а одна — $\alpha\text{-NH}_2$ -группой полипептидной цепи.

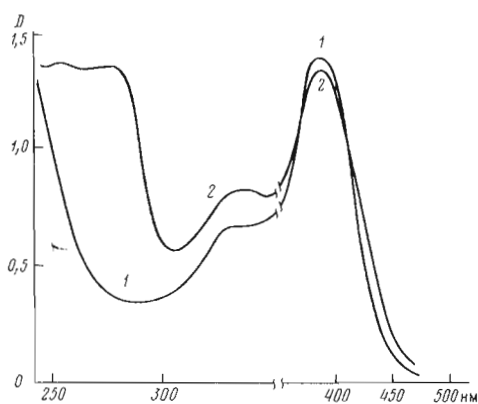


Рис. 4

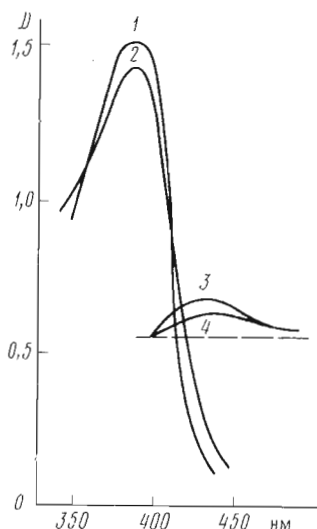


Рис. 5

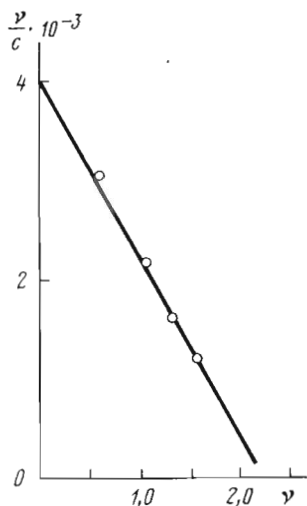


Рис. 6

Рис. 4. Спектры поглощения 0,25 мМ пиридоксаль-*P* (1) и смеси 0,25 мМ пиридоксаль-*P* и 85 мкМ альбумина (2)

Рис. 5. Длинноволновые полосы поглощения в УФ-спектрах смеси пиридоксаль-*P* и виадрила (1), пиридоксаль-*P*, виадрила и альбумина (2) и разностные спектры поглощения смеси пиридоксаль-*P* и альбумина относительно раствора пиридоксаль-*P* (3) и смеси пиридоксаль-*P*, виадрила и альбумина относительно раствора пиридоксаль-*P* и виадрила (4). Концентрации пиридоксаль-*P*, виадрила и альбумина 0,25 мМ; 2,3 мМ и 85 мкМ соответственно

Рис. 6. Связывание виадрила с альбумином в координатах Скэтчарда; ν — число молей лиганда, связавшихся с 1 моль белка, c — концентрация свободного лиганда

Опыт с дансилированием бычьего сывороточного альбумина при pH 7,0, последующим гидролизом белка и выделением модифицированных аминокислот тонкослойной хроматографией на силикагеле дает аналогичный ответ: 5 лизиновых и N-концевой аминокислотный остаток (концевая α -аминогруппа) взаимодействовали с дансилхлоридом.

Нами получены и другие доказательства взаимодействия виадрила и гексенала с ϵ -NH₂-группами лизина. На рис. 4 приведены спектры поглощения пиридоксаль-*P* и его комплекса с альбумином. Оба анестетика влияют на величину длинноволнового сдвига спектра поглощения, происходящего в результате образования шиффовых оснований между пиридоксаль-*P* и ϵ -NH₂-группами остатков лизина, что особенно четко видно на разностных спектрах поглощения (рис. 5). Результаты анализа УФ-спектров не исключают и других типов взаимодействия виадрила и гексенала с белком, но по крайней мере не менее двух остатков лизина способны связать оба анестетика. Опыты с гель-фильтрацией также свидетельствуют, что не менее двух молекул анестетика связываются с белком (рис. 6). После пред-

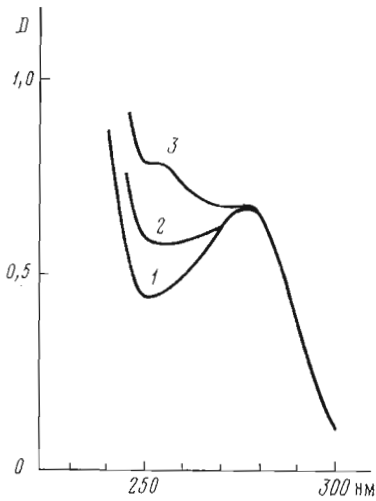


Рис. 7

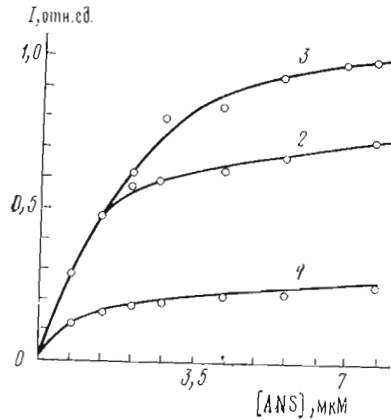


Рис. 8

Рис. 7. Спектры поглощения альбумина (1), белка, модифицированного 10-кратным молярным избытком нингидрина в присутствии 10-кратного избытка ANS (2), и альбумина, модифицированного 10-кратным молярным избытком нингидрина (3). Спектры поглощения (2, 3) записаны после отделения низкомолекулярных соединений на колонке с сефадексом G-25; 0,05 М фосфатный буфер, pH 6,8

Рис. 8. Флуоресцентное титрование с помощью ANS альбумина, модифицированного нингидрином (1), модифицированного 6 остатками пиридоксаль-*P* (2), и исходного свободного белка (3). Концентрация альбумина 10 мкМ, фосфатный буфер, pH 6,8

варительной обработки белка с помощью пиридоксаль-*P* или ацетальдегида и восстановления альдиминных связей боргидридом натрия анестетики комплекс с альбумином не образовывали.

Таким образом, из шести аминогрупп, связывающих пиридоксаль-*P*, и из пяти, связывающих ANS, только две общие ответственные за флуоресценцию зонда. Поскольку флуоресценция ANS, фиксированного белком, не устранялась полностью анестетиками, конкурирующими за места связывания, следовало решить вопрос о природе других трех центров, взаимодействующих с гидрофобным зондом.

По имеющимся уже данным [7], ANS может связываться остатками аргинина. Обработка сывороточного альбумина ацетилацетоном (табл. 1, опыт 5), блокирующим все доступные лизиновые и аргининовые остатки, действительно полностью гасит «гидрофобную» флуоресценцию ANS. Снятие блокады с лизиновых остатков гидроксиламином в кислой среде [11] привело в наших опытах к частичному восстановлению флуоресценции ANS, которая в относительных величинах почти полностью соответствовала ранее зафиксированному гашению флуоресценции для белка, модифицированного с помощью пиридоксаль-*P* (табл. 1, опыт 6), т. е. можно допустить, что в обоих опытах речь, по-видимому, идет об одних и тех же ϵ -NH₂-группах двух остатков лизина, способных связывать ANS.

Подтверждение роли аргининовых остатков в связывании ANS получено нами с применением также другого модификатора — нингидрина [12].

На поверхности молекулы альбумина с помощью нингидрина выявляются 4 остатка аргинина (рис. 7, 3). Интенсивность флуоресценции ANS, связанного с модифицированным нингидрином белком, уменьшается (табл. 1, опыт 7) на 60%. Предварительное добавление ANS в концентрации 10^{-4} М к раствору белка с нингидрином приводит к модификации нингидрином только одного остатка аргинина (рис. 7, 2). Увеличение концентрации ANS вплоть до $5 \cdot 10^{-4}$ М дает аналогичные результаты. Только при больших избытках ANS (10^{-3} М) начинается защита последнего, чет-

вертого остатка аргинина. Следовательно, можно полагать, что наиболее эффективно ANS связывается с тремя остатками аргинина и в этом состоянии обладает флуоресценцией (табл. 1, опыт 8), совпадающей с интенсивностью флуоресценции ANS в смеси с исходным белком. Необходимо отметить, что два модификатора очень различной природы (ацетил-ацетон, нингидрин) позволяют получить сопоставимые результаты. На основании этого можно утверждать, что решающим фактором является прямое исключение гуанидиновых группировок из взаимодействия с ANS и маловероятно, что в обоих случаях имели место одинаковые конформационные перестройки белковой молекулы, сходно изменившие окружение фиксированной молекулы гидрофобного зонда.

Суммирование всех приведенных выше результатов дает право на допущение, что основными центрами связывания молекул ANS, обладающих флуоресценцией, на бычьем сывороточном альбумине служат 3 остатка аргинина и 2 остатка лизина. Именно такое распределение красителя согласуется с зарегистрированными нами выходами флуоресценции ANS: связанного с лизином — 40%, связанного с аргинином — 60%.

Наши результаты также хорошо согласуются с данными, полученными другими авторами, о наличии 5 центров связывания ANS с бычьим сывороточным альбумином [13]. Конечно, это не исключает связывания флуоресцентного зонда и по другим центрам на белке, но в этом случае ANS практически не флуоресцирует.

Полученные в работе данные на первый взгляд противоречат известному мнению, что модификация только аргининовых остатков уменьшает интенсивность флуоресценции ANS приблизительно на порядок. По-видимому, возражение легко снимается, если учесть различия в силе связывания красителя аргининовыми и лизиновыми остатками. Константы связывания, определенные нами по изменению интенсивности флуоресценции ANS, равны $\sim 3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для аргинина и $\sim 4,0 - 4,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ для лизина. Первая величина соответствует имеющимся данным [14]. Различие в величине констант связывания для аргинина и лизина проявляется в интенсивности флуоресценции при низких концентрациях ANS (рис. 8), поскольку модифицированный по аргинину белок слабо связывает индикатор. При больших концентрациях ANS удается достичь большего связывания, и в этом случае выход флуоресценции составляет 40% от интенсивности флуоресценции исходного белка. Следовательно, как лизиновые, так и аргининовые остатки участвуют в связывании ANS на молекуле альбумина.

В связи с тем что ANS повсеместно применяется как гидрофобный зонд при изучении структуры белков, найденные различия в связывающей способности $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп лизина по отношению к флуоресцентному зонду (из шести лизиновых остатков только два связывают ANS) уместно рассмотреть более детально. Очевидно, что важную роль в комплексообразовании играют ионные взаимодействия. По-видимому, определенный вклад в фиксацию ANS вносят также и гидрофобные взаимодействия. Проверка этого допущения выполнена двояким образом. В качестве гидрофобных конкурентов ANS использовали спирты ($1,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$), не способные фиксироваться по $\epsilon\text{-NH}_2$ -группе, или органические кислоты, несущие наряду с липофильной целью полярную карбоксильную группу. Метанол, этанол и бутанол не меняли характера связывания ANS с белком. В присутствии монокарбоновых кислот гашение флуоресценции ANS возрастает пропорционально длине углеводородной цепи (рис. 9) вплоть до пяти углеродов в составе конкурирующего агента. Дальнейшее наращивание гидрофобных свойств у высших жирных кислот уже неэффективно. Из результатов опыта можно сделать вывод, что только одновременное наличие у конкурирующей молекулы средства к аминогруппе и к гидрофобному окружению является достаточным, чтобы воспрепятствовать связыванию ANS. Последний, таким образом, фиксируется на белке двояко: по $\epsilon\text{-NH}_2$ -

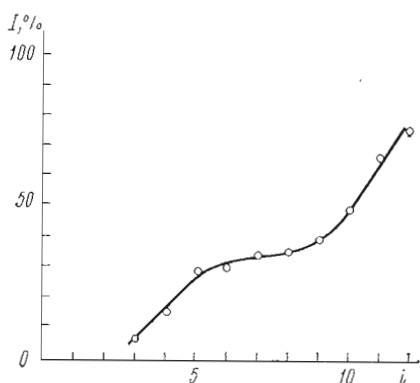


Рис. 9

Рис. 9. Гашение интенсивности флуоресценции ANS, связанного с альбумином, в присутствии 12 мМ жирных кислот с i углеродных атомов, pH 6,8

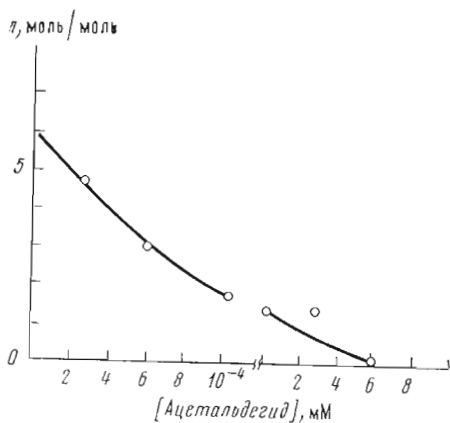


Рис. 10

Рис. 10. Зависимость числа молекул пиридоксаль-Р, ковалентно связанных с молекулой альбумина после предварительной обработки белка NaBH_4 , от концентрации ацетальдегида. Концентрация альбумина 25 мкМ, пиридоксаль-Р — 5,2 мМ. Белок в смеси с ацетальдегидом (pH 6,0) обрабатывали NaBH_4 , затем через 30 мин добавляли пиридоксаль-Р и повторно обрабатывали NaBH_4 .

группе и по какому-то гидрофобному участку, расположенному тут же рядом. Интересно, что наибольшая конкурентная эффективность отмечена для валериановой кислоты, которая по длине углеводородного скелета соответствует лизину. Таким образом, можно предположить, что ANS способен взаимодействовать непосредственно с доступным углеводородным скелетом самого лизина. Если углеводородный скелет последнего «утоплен» в гидрофобное ядро белковой молекулы, а на ее поверхность выходит лишь $\epsilon\text{-NH}_2$ -группа, то, хотя и наблюдается слабое связывание ANS за счет электростатического взаимодействия, индикатор не флуоресцирует, так как находится в полярном окружении. Высказанное предположение не исключает альтернативного решения — рядом с аминогруппой, фиксирующей ANS, расположены гидрофобные участки соседствующих структур полипептидной цепи.

Исходя из этих соображений, можно заключить, что на поверхности молекулы альбумина 3 остатка лизина, по-видимому, имеют недоступную для связывания ANS углеводородную цепь или не соседствуют с другим по природе гидрофобным участком. Это подтверждается анализом представленных данных, а также тем обстоятельством, что начиная с валериановой кислоты жирные кислоты ($1,2 \cdot 10^{-2}$ М) защищают от модификации пиридоксаль-Р только два остатка лизина (табл. 1, опыт 10), которые, по-видимому, связывают и ANS.

Эффективность защиты этих двух остатков растет с увеличением не только концентрации жирных кислот, но и длины их углеводородной цепочки вплоть до C_5 . Флуоресценция ANS, добавленного к модифицированному белку (табл. 1, опыт 10) (предварительно отделенному от низкомолекулярных продуктов реакции), совпадает с интенсивностью флуоресценции ANS в смеси с исходным белком (табл. 1, опыт 1), т. е. эти два остатка расположены вблизи гидрофобной области. Три других остатка лизина, легко модифицируемые пиридоксаль-Р, имеют на поверхности только $\epsilon\text{-NH}_2$ -группы, и поэтому конкуренция жирных кислот, осуществляемая лишь за счет полярного взаимодействия карбоксильных групп, малоэффективна при используемой концентрации ($1,2 \cdot 10^{-2}$ М) лиганда.

Константы связывания соединений с первичными
аминогруппами (ϵ -NH₂, α -NH₂) альбумина
рН 6,8, фосфатный буфер

Соединение	$K \cdot 10^{-3}, M^{-1}$	Соединение	$K \cdot 10^{-3}, M^{-1}$
Ацетальдегид	0,070	Гексенал	1,1
Пиридоксаль- <i>P</i>	0,48	Виадрил	2,0

Взаимодействие ANS с аргинином, вероятно, имеет более сложную природу, поскольку заметное гашение флуоресценции достигается лишь при использовании в качестве конкурентов высших (C₈—C₁₂) монокарбоновых жирных кислот. Можно предположить более сильные гидрофобные связи, стерические препятствия для гидрофобного взаимодействия. Этим, по-видимому, и объясняется тот факт, что гексенал и виадрил вытесняют ANS, связанный с лизином, и не могут этого сделать, когда фиксация флуоресцентного зонда идет по остаткам аргинина.

Из приведенных результатов (табл. 1, рис. 6) можно сделать вывод, что гексенал и виадрил связываются с двумя лизиновыми остатками, имеющими доступную, рядом расположенную гидрофобную зону. Кроме того, виадрил и гексенал фиксируются по остаткам лизина, по-видимому, как за счет ионных, так и за счет гидрофобных взаимодействий. Вклад последних в связывание виадрила и гексенала, однако, весьма невелик, поскольку предварительная обработка белка ацетальдегидом и восстановление альдиминных связей боргидридом натрия прекращает связывание анестетиков с альбумином. Приведенные доказательства того, что флуоресценцией обладают только молекулы ANS, связанные с ϵ -NH₂-группой лизина и соседствующей гидрофобной зоной (возможно, углеводородной цепью самой аминокислоты), не противоречат литературным данным, предполагающим фиксацию ANS в гидрофобной «щели» или «впадине» [15]. Энергетически одинаково выгодные состояния могут быть реализованы и в других условиях, когда лизиновые остатки стабилизированы положительными зарядами в виде «антенны» и когда полностью доступна углеводородная цепь, расположенная на поверхности молекулы альбумина. Эти три состояния будут совершенно эквивалентными по проявлению в флуоресценции ANS. Лизиновые и аргининовые остатки или входят в состав гидрофобной зоны, или только ее формируют. Мы не отрицаем участия в образовании гидрофобных зон и других аминокислот.

Степень родства исследуемых нами соединений, взаимодействующих с доступными свободными аминогруппами бычьего сывороточного альбумина, может быть охарактеризована соответствующими константами ассоциации (табл. 2).

Расчет констант проводили двумя способами: по методу Скэтчарда, а для пиридоксаль-*P* и ацетальдегида прямым расчетом по уравнению

$$K = \frac{a}{c(N - a)},$$

где a — концентрация связанного с белком лиганда, c — концентрация свободного лиганда и N — концентрация связывающих центров, рассчитанная из концентрации белка (c) и количества связывающих центров (n) как $N = nc$. Количество последних легко находится спектрофотометрически по насыщающим концентрациям для пиридоксаль-*P* (рис. 2), а промежуточные ситуации моделировали меньшими количествами лиганда, фиксируемого каждый раз на белке с помощью боргидрида натрия. Для ацетальдегида весь опыт проводили в обратном порядке: находили

концентрацию лиганда, полностью блокирующую все доступные аминокислотные группы, а количество незанятых точек фиксации при меньших концентрациях ацетальдегида оттитровывали с помощью пиридоксаль-*P* и боргидрида натрия (рис. 10). Величины констант для гексенала и виадрила, найденные прямым методом и по координатам Скэтчарда, удовлетворительно согласуются друг с другом. Как нами было показано выше, пиридоксаль-*P* и ацетальдегид связываются в избранных условиях опыта с тремя различными по природе аминокислотными группами. Найденные для них константы связывания, рассчитанные прямыми методами, по существу интегральны и должны рассматриваться как кажущиеся. Погрешность, по видимому, при этом невелика, так как решающим в связывании пиридоксаль-*P* и ацетальдегида было взаимодействие за счет альдегидной группы с весьма незначительным вкладом других сил.

Экспериментальная часть

В работе использованы препараты отечественного производства: бычий сывороточный альбумин лиофилизированный, очищенный от жирных кислот и других примесей [19]; пропионовая, масляная, валериановая, капроновая, энантовая, каприловая, пеларгоновая, каприновая, ундекановая и лауриновая кислоты (ч.), очищенные дополнительно дистилляцией (C_3 — C_9) или перекристаллизацией (C_{10} — C_{12}); калий иодистый (х.ч.); ацетилацетон, дважды перегнанный; спирты, метиловый, пропиловый и бутиловый (ч.д.а.); гексенал и виадрин (фармакопейные препараты), пиридоксаль-*P* (Reanal), ANS и дансилхлорид (Serva), нингидрин (х.ч., СССР).

Связывание пиридоксаль-*P* или ацетальдегида с аминокислотными группами белка осуществляли в фосфатном (рН 6—8) или бикарбонатном (рН 8—11,3) буфере при 2000-кратном молярном избытке лиганда с последующим восстановлением возникших связей 3000-кратным молярным избытком боргидрида натрия. Через 10 мин белок отделяли от низкомолекулярных соединений на колонке с сефадексом G-25, а количество связавшегося пиридоксаль-*P* рассчитывали по молярной экстинкции пиридоксамин-5'-фосфата (ϵ 7300 $M^{-1} \text{ см}^{-1}$ [16]). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически с внесением поправки, если это было необходимо, на поглощение пиридоксамин-*P* при 280 нм.

Модификация остатков лизина и аргинина ацетилацетоном достигалась длительной (5—20 ч) обработкой проб 2000-кратным молярным избытком реагента в бикарбонатном буфере, рН 8,9. Удаление модификатора с остатков лизина проводили подкислением проб до рН 6,0, а в ряде случаев добавлением гидроксилamina [11].

Модификацию остатков аргинина нингидридом [12] проводили при рН 9,1—9,2. Как правило, использовали 10-кратные молярные избытки модификатора по отношению к белку. Пробы выдерживали при 37°C в течение 2 ч, затем наносили на колонку с сефадексом G-25 и промывали 0,05 *M* фосфатным буфером, рН 6,8. Количество связавшихся молекул нингидрина рассчитывали по поглощению в области 250 нм, используя калибровочный график для поглощения чистого нингидрина в этой же области.

Количество молекул гексенала или виадрила, связывающихся белком, находили методом гель-фильтрации [17], уравнивая колонку с сефадексом G-25 растворами с известной концентрацией изучаемых соединений при рН 6—7. На колонку наносили 3 мл уравнивающего раствора, содержащего 5 мг альбумина, который затем элюировали, и измеряли объем элюата с уменьшенной по сравнению с уравнивающей концентрацией анестетика (определяли спектрофотометрически при 250—300 нм). Для расчетов количества связавшегося анестетика опыт ставили не менее чем с тремя различными концентрациями препарата при фиксированном количестве белка.

Флуоресценцию ANS, связанного альбумином, исследовали при возбуждении 360 нм и регистрации 490–500 нм на флуориметрах Spexol или Эф-3. Константы связывания ANS для лизина и аргинина рассчитывали в координатах Скэтчарда по интенсивности флуоресценции ANS, связанного с белком модифицированным пиридоксаль-*P* или нингидрином. Возбуждение флуоресценции проводили светом с длинами волн 385–390 нм, измерение — при 470 нм на спектрофлуориметре Aminco-Bowman. При данном выборе длин волн возбуждения практически исключается эффект внутреннего фильтра для ANS и нет необходимости вводить поправки на поглощение в области длин волн возбуждения для модифицированного пиридоксаль-*P* белка. Концентрации свободного и связанного белком зонда рассчитывали по интенсивности флуоресценции, используя метод [14].

Дансирование альбумина и его гидролиз вели по методу [18] с последующим разделением модифицированных аминокислот тонкослойной хроматографией на силикагеле КСК в системе растворителей: ацетон — изопропанол — 25% аммиак, 9 : 7 : 0,5. Все спектрофотометрические определения выполнены на регистрирующем двухлучевом спектрофотометре Perkin-Elmer, модель 402.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wrange O., Gustafsson J. A. (1918) *J. Biol. Chem.*, **253**, 856–865.
2. Litwack G., Cake M. H., Filler R., Taylor K. (1978) *Biochem. J.*, **169**, 445–448.
3. Glauber H. S. (1976) *S. Afr. J. Med. Sci.*, **41**, 305–306.
4. Ульянкина Т. И., Шамаповский Н. Л. (1976) *Фармакология и токсикология*, **747–775**.
5. Череп С. И. (1975) Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест.
6. Eyring H., Woodbury J. W., D'Arrigo J. (1973) *Anesthesiology*, **38**, 415–424.
7. Jonas A., Weber G. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4729.
8. Klotz I., Burkhard R., Uguhart J. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 202–204.
9. Карпейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. (1974) в сб.: Структура и функция ферментов, с. 183–203, «Наука», М.
10. Brown J. R. (1976) *Fed. Proc.*, **35**, 2141–2144.
11. Гаврилова Л. А., Антонов В. К. (1977) IV Всес. симпозиум по химии белков и пептидов, Минск, с. 90.
12. Chaplin M. F. (1976) *Biochem. J.*, **155**, 457–459.
13. Daniel E., Weber G. (1966) *Biochemistry*, **5**, 1893–1900.
14. Добрецов Г. Е. (1975) в сб.: ВИНТИ «Молекулярная биология», т. 6, с. 34–104.
15. Данилов В. С., Шевченко А. С., Ребров В. Г., Орлов С. Н. (1975) *Биофизика*, **20**, 822–826.
16. Peterson E. A., Sober H. A. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 169.
17. Faiclough G. F., Fruton J. S. (1966) *Biochemistry*, **5**, 673.
18. Дэвни Т., Гергей Я. (1976) *Аминокислоты, пептиды и белки*. «Мир», М.
19. Звидьяльская Р. А., Коростелева Н. Л. (1975) *Методы современной биохимии*, с. 21–23, «Наука», М.

Поступила в редакцию
31.X.1978

После доработки
16.II.1979

MECHANISMS OF HEXENAL AND VIADRIL BINDING BY BOVINE SERUM ALBUMIN

OSTROVSKY V. Yu., STEPURO I. I.

*State Medical Institute, Grodno: Metabolism Regulation Division,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno*

A barbituric acid derivative, hexenal, and an anesthetic of steroid nature, viadril, are bound by ϵ -NH₂-groups of lysine residues situated on the surface of the molecule of bovine albumin. 8-Anilinonaphthalene-1-sulfonate (ANS) binds with the two most accessible lysine and three arginine residues and may be displaced competitively from lysine residues by hexenal, viadril, and monocarboxylic fatty acids. The efficiency of the latter increases linearly for each CH₂-group up to C₅-C₆. From the arginine residues ANS may be displaced only by higher (C₈-C₁₂) fatty acids. The binding constants are determined describing the pyridoxal phosphate, acetaldehyde, hexenal and viadril association with lysine residues of the protein.