



УДК 547.937 + 547.962.3

О МЕХАНИЗМЕ ГИДРОФОБНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
БИЛУРУБИНА И АЛЬБУМИНА В КИСЛЫХ СРЕДАХ*Колосов И. В., Шаповаленко Е. П.**2-й Московский государственный медицинский институт
им. Н. И. Пирогова*

Изучено гидрофобное взаимодействие билирубина с альбумином в кислых средах при рН 3—6. Показано, что взаимодействие этих веществ в указанных условиях идет за счет механизма солюбилизации с образованием ассоциатов A_2B_x , где максимальное x составляет 80—120. Термодинамические параметры этого процесса находятся в соответствии с указанным механизмом. Предполагается, что механизм гидрофобного взаимодействия может играть значительную роль при связывании билирубина в плазме крови в физиологических условиях.

Гидрофобные взаимодействия имеют большое значение как в стабилизации нативной глобулярной структуры белков [1—3], так и в процессах переноса и обмена неполярных веществ в живом организме [4]. С этой точки зрения представляет интерес расчет параметров и выяснение механизма связывания органических веществ с важнейшим белком плазмы крови — альбумином. Задачей данного исследования была попытка охарактеризовать взаимодействие билирубина с человеческим сывороточным альбумином в кислых и слабокислых средах в связи с важностью этого процесса в ряде патологических состояний организма [5].

Взаимодействие билирубина с человеческим сывороточным альбумином в кислых средах практически не описано. По нашим данным, оно сопровождается увеличением мицеллярной растворимости билирубина, что отличает этот процесс от реакций в щелочных средах [6—10].

В исследуемых нами условиях (рН 3—6, концентрация билирубина $C_B = 5—140$ мкМ, 17°) билирубин имеет тенденцию к образованию коллоидных и пересыщенных метастабильных растворов [11], которые склонны к медленной коагуляции при стоянии во времени и быстрой при интенсивном встряхивании и фильтровании. При этом истинная растворимость (s_0) билирубина составляет $(0,7—6,8) \cdot 10^{-8}$ М (табл. 1). Добавление альбумина уже в концентрациях 0,5—5 мкМ способствует увеличению растворимости билирубина примерно в 10^4 раз и сопровождается связыванием на 1 молекулу альбумина до 40—60 молекул билирубина.

Спектры поглощения билирубина и ассоциата билирубина с альбумином весьма сходны, наблюдается лишь небольшое увеличение поглощения ($\Delta D = 0,05—0,07$ на уровне $D = 0,8—1,0$) без сдвига в максимуме в области 430—460 нм, характерного для спектра поглощения билирубина. Это позволило предположить, что в ассоциате, как и в его метастабильных растворах, билирубин находится в форме молекулярно-дисперсного вещества, а не в форме отдельных молекул.

Физико-химические параметры связывания билирубина с человеческим сывороточным альбумином

Условия: $I = 0,15 \pm 0,02$; 17° ; $C_A = 0,1-2$ мкМ; $C_B = 5-140$ мкМ

pH	$s_0 \cdot 10^3$, М	m	$N_{\text{макс}}$	$\frac{K \cdot 10^{-4}}{\bar{n} = 25}$	pH	$s_0 \cdot 10^3$, М	m	$N_{\text{макс}}$	$\frac{K \cdot 10^{-4}}{\bar{n} = 25}$
3,0	0,80	2,2	57	0,27	5,0	1,00	2,2	55	0,11
4,0	0,80	2,0	52	0,24	6,0	6,7	2,0	68	0,14

Таблица 2

Термодинамические параметры взаимодействия билирубина с человеческим сывороточным альбумином

Условия: $I = 0,15 \pm 0,02$; $5-43^\circ$; $C_A = 1$ мкМ

pH	T, К	lg K, $\bar{n} = 25$	ΔF	ΔH	ΔS , кал/моль·град
			ккал/моль		
6	278	2,97	-3,76	-2,77	3,12
	290	2,80	-3,70		
	298	2,67	-3,63		
	309	2,56	-3,62		
	316	2,63	-3,78		
4	280	3,38	-4,33	-4,60	1,05
	290	3,24	-4,27		
	298	3,14	-4,27		
	309	3,05	-4,30		
	316	2,96	-4,26		

Эффект увеличения растворимости и агрегатной устойчивости билирубина наблюдается также в растворах некоторых других глобулярных белков (γ -глобулина, бычьего сывороточного альбумина, желатинина) и не наблюдается для фибриллярных белков, например фибриногена. Эффект растворимости исчезает при добавлении к системе билирубина — альбумин органических растворителей — диметилформамида, диоксиана, изменяющих внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия в белке [12]. Поэтому данное явление можно рассматривать в рамках теории солюбилизации глобулярными белками неполярных веществ [13] и описывать уравнением химической реакции



с константой

$$K = \frac{s}{C_A^m (N - \bar{n})^m m \bar{n}}, \quad (2)$$

где m — число молекул альбумина, участвующих в образовании единичного ассоциата солюбилизации; C_A — концентрация альбумина; $\bar{n} = x/m$ — приведенная солюбилизация, или число молекул билирубина, приходящееся на одну молекулу альбумина в ассоциате; N — предельная приведенная солюбилизация, т. е. максимальное число \bar{n} ; s — концентрация билирубина, связанного в комплексе с альбумином, или его растворимость в присутствии альбумина.

Важным показателем солюбилизации является приведенная солюбилизация \bar{n} и N . Характер зависимости \bar{n} от C_B , полученной нами для ряда значений pH (см., например, рис. 1, а), свидетельствует о наличии максимума (для всех значений pH), обозначающего границу устойчивости ассоциатов $A_m B_x$ в водном растворе, после чего происходит денатурация альбумина

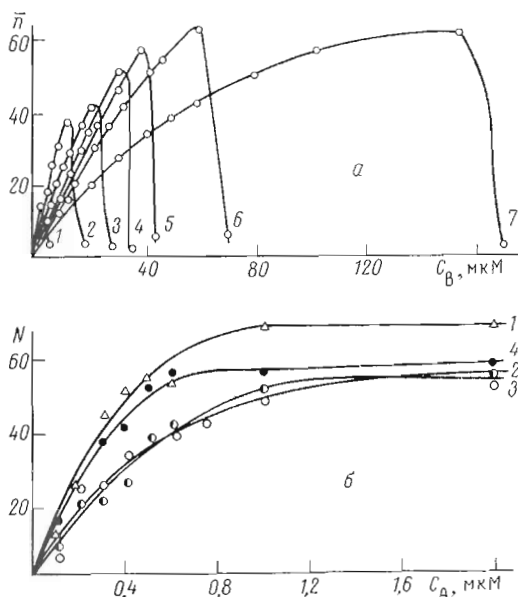


Рис. 1. Зависимость приведенной солюбилизации \bar{n} от C_B (а) и N от C_A (б). Условия: $I = 0,15 \pm 0,02$; 17° , а — рН 3,0, концентрация альбумина, мкМ: 0,1 (1); 0,3 (2); 0,4 (3); 0,5 (4); 0,6 (5); 1,0 (6); 2,0 (7); б — рН 6,0 (1); 5,0 (2); 4,0 (3); 3,0 (4)

билирубином с захватом альбумина в твердую фазу. Поэтому при рассмотрении явления солюбилизации ограничивались областью концентраций до максимума (рис. 1, а). Из рис. 1 следует, что N зависит от C_A вплоть до концентраций билирубина и альбумина, соответствующих границам денатурации альбумина. Поэтому предельное значение N означает максимальное число молей билирубина, которое может быть связано с альбумином в растворе (при данном рН) без потери его устойчивости. Это значение вводили в уравнение (2) для расчета параметров m и K . Графическое решение этого уравнения проводили в логарифмическом виде:

$$\lg s = m \lg C_A + m \lg (N - \bar{n}) + \lg \bar{n} + \lg Km \quad (3)$$

построением функций $\lg s$ (I), $\lg (N - \bar{n})$ (II) и $\lg \bar{n}$ (III) от $\lg C_A$. Ограничиваясь линейными участками этих зависимостей (для $\bar{n} \leq 40-50$), имеем

$$\frac{d \lg s}{d \lg C_A} = m + m \frac{d \lg (N - \bar{n})}{d \lg C_A} + \frac{d \lg \bar{n}}{d \lg C_A} \quad (4)$$

или

$$\text{tg } \varphi_I = m + m \text{tg } \varphi_{II} + \text{tg } \varphi_{III} \quad (5)$$

Рассчитанный таким образом параметр m равен 2,0—2,2 для всех рН, т. е. в растворах образуются ассоциаты солюбилизации с участием двух молекул альбумина состава A_2B_x , где максимальное x достигает 80—120. Константа солюбилизации, рассчитанная по уравнению (2), оказалась равной постоянной величине для концентраций билирубина, соответствующих $\bar{n} = 10-35$ (рис. 2), т. е. присоединение данного количества билирубина в расчете на одну молекулу белка происходит без значительного изменения в конформации альбумина. Присоединение большего количества билирубина ведет к резкому увеличению K (рис. 2) с последующей денатурацией белка. Процесс солюбилизации для этих условий, очевидно, необратим и не может быть описан константой, не зависящей от \bar{n} .

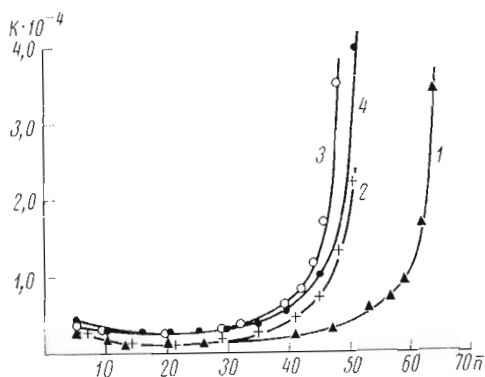


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость K от \bar{n} для рН 6,0 (1); 5,0 (2); 4,0 (3); 3,0 (4)

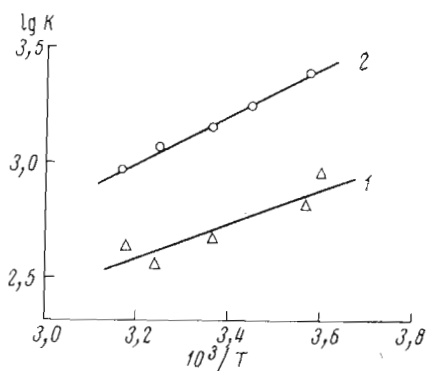


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $\lg K$ от обратной температуры для рН 6,0 (1) и 4,0 (2)

Дополнительно в пользу гидрофобного механизма взаимодействия исследуемых веществ свидетельствует факт связывания в области рН 3—4, где билирубин недиссоциирован, и в изоэлектрической точке, рН 4,9, причем в последнем случае наблюдается минимум солиubilизации (табл. 1).

Для данного процесса был проведен расчет термодинамических параметров для рН 4,0 и 6,0, $C_A = 1$ мкМ, $5-43^\circ$, $\bar{n} = 25$. Результаты расчетов (рис. 3, табл. 2) свидетельствуют об отрицательных изменениях свободной энергии и энтальпии и небольших положительных изменениях энтропии, что, по-видимому, не противоречит механизму гидрофобного связывания, если принять во внимание следующие факторы: 1) гидрофобные взаимодействия в альбумине приводят к образованию неполярного ядра глобулы [2]; 2) в нативной конформации компактной глобуле соответствует минимальная энергия и энтропия (как в кристалле) [14]; 3) взаимодействие с билирубином сопровождается проникновением мицелл билирубина в неполярное ядро глобулы, что ведет, с одной стороны, к ослаблению внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий, разрыхлению глобулы, с другой — к увеличению общей доли гидрофобных остатков в молекуле альбумина, т. е. его гидрофобизации. Общая тенденция этого процесса по мере насыщения белка билирубином — денатурация альбумина билирубином — аналогична действию органических растворителей на структуру альбумина [12]. Тогда справедлива следующая схема процесса: гидрофобное связывание, переход глобула \rightarrow клубок с дегидратацией альбумина и денатурацией. Такой процесс может, по-видимому, протекать с небольшим изменением энтропии и отрицательным тепловым эффектом (учитывая фазовый переход глобула \rightarrow клубок).

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты билирубина ТУ 364-69 и человеческого сывороточного альбумина (Reanal, ВНР). Исследование проводили методом растворимости со спектрофотометрическим контролем концентраций билирубина и человеческого сывороточного альбумина на спектрофотометре Hitachi-124 (Япония). Очистку препаратов билирубина, приготовление рабочих растворов и определение концентрации диазометодом проводили, как описано в работе [15]. Буферные растворы готовили из универсальной буферной смеси 0,04 М (H_3BO_3 , H_3PO_4 , CH_3COOH) добавлением 0,1 М NaOH. Постоянную ионную силу $0,15 \pm 0,02$ поддерживали при помощи NaCl.

Методика эксперимента: в пенициллиновые флаконы приливали буферный раствор, раствор человеческого сывороточного альбумина и билирубина (общий объем 10 мл) и встряхивали на механической мешалке с воздушным термостатом в течение 2 ч для достижения равновесий связывания с белком и осаждения твердой фазы билирубина. После фильтрования через слой ваты в микроворонке спектрофотометрировали в растворе связанный с белком билирубин в области длин волн 430—460 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С. Е. (1949) Биохимия, **14**, 180—189.
2. Flory P. (1956) Proc. Roy. Soc., Ser. A234, 60—73.
3. Кузнецов А. Н., Эберт Б. (1975) Молекулярн. биология, **9**, 407—414.
4. Пчелин В. А., Измайлова В. Н., Большова Г. П. (1962) Высокомоле. соед., **4**, 938—943.
5. Таболин В. А. (1967) Билирубиновый обмен и желтухи новорожденных, с. 6—49, «Медицина», М.
6. Jacobsen J. (1969) FEBS Lett., **5**, 112—114.
7. Leim H. H., Müller-Eberhard U. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **42**, 634—639.
8. Jacobsen C. (1972) Eur. J. Biochem., **27**, 513—519.
9. Blaue G., Harmatz D. (1972) Biochim. et biophys. acta, **278**, 89—100.
10. Beaven G. H., d'Albis A., Gratzner W. B. (1973) Eur. J. Biochem., **33**, 500—510.
11. Fog J., Bakken A. F. (1967) Scand. J. Clin. and Lab. Invest., **20**, 70—72.
12. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. (1964) Структура макромолекул в растворах, с. 76—86, «Наука», М.
13. Ямпольская Г. П., Измайлова В. Н., Пчелин В. А. (1970) Высокомоле. соед., **12**, 1923—1927.
14. Волькенштейн М. В. (1975) Молекулярн. биофизика, с. 219—242, «Наука», М.
15. Колосов И. В., Шаповаленко Е. П. (1976) Лабор. дело, **7**, 419—422.

Поступила в редакцию
27.V.1976

ON THE MECHANISM OF HYDROPHOBIC INTERACTION OF BILIRUBIN WITH ALBUMIN IN ACID SOLUTIONS

KOLOSOV I. V., SHAPOVALENKO E. P.

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

A study was undertaken to elucidate the nature of hydrophobic interaction between bilirubin and albumin. It is shown that in acidic media (pH 3—6) the above process proceeds by a mechanism which involves a solubilization and the formation of A_2B_x associates, where X_{\max} ranges between 80—120. The thermodynamic parameters of the process are in accord with the proposed mechanism. A mechanism of hydrophobic interaction is assumed to play an important role in bilirubin binding in blood plasma under physiological conditions.