

УДК 541.138:547.96

## Исследование механизма антиоксидантной активности альбумина

Г.С. Шаповал, О.С. Кругляк, И.Е. Миронюк

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины  
1, ул. Мурманская, Киев, 02660, Украина

*Методом вольтамперометрии на молекулярном уровне исследовано взаимодействие альбумина и модельных аминокислот с электрохимически генерированными активными формами кислорода – гидроксильными радикалами и перекисью водорода. Показано, что альбумин и ряд аминокислот, моделирующих аминокислотные остатки на поверхности глобулы альбумина, проявляют как антирадикальную, так и антиокислительную активность. Определены относительные величины этой активности для модельных аминокислот. Высказаны предположения об их вкладе в суммарную антиоксидантную активность альбумина.*

**Ключевые слова:** альбумин, аминокислоты, антиоксидантная активность.

В ряду биополимеров, участвующих в жизнедеятельности организма, наиболее многофункциональным является глобулярный белок альбумин. Наряду со способностью связывать эндогенные и экзогенные органические соединения, такие как жирные кислоты, холестерин, лекарственные препараты, различные метаболиты, ионы металлов, альбумин выполняет функции основного антиоксиданта плазмы крови [1–4].

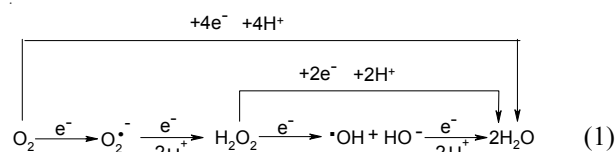
Если антиоксидантная способность альбумина в целом подтверждена многочисленными результатами медицинских исследований, то особенности и механизм его антиоксидантного действия на молекулярном уровне вызывают много вопросов.

Судить о механизме антиоксидантного действия может позволить исследование взаимодействия альбумина и входящих в его полипептидную цепь аминокислот с активными формами кислорода (АФК), в частности – гидроксильными радикалами и перекисью водорода.

Такие реакции позволяет изучать разработанный нами метод [5], в рамках которого исследуемое соединение взаимодействует с гидроксильными радикалами и перекисью водорода, образующимися при электрохимическом восстановлении молекулярного кислорода, исходя из представлений [6].

В дыхательной цепи происходит четырехэлектронное, безопасное для организма, восстановление кислорода до воды (схема 1). Под влиянием различных, в том числе неблагоприятных, факторов происходит одноэлектронное восстановление кислорода, которое приводит к образованию АФК, способных разрушить макромолекулы протеинов, вызывая так называемый кислородный стресс. Последний сопровождается пе-

рекисным окислением липидов и перекисной модификацией белковых макромолекул.



Из представленных на схеме (1) АФК наиболее реакционноспособным является гидроксильный радикал, способный взаимодействовать с молекулами органических соединений  $RH$  с образованием радикала  $R\cdot$ :



Далее такие радикалы взаимодействуют с кислородом, образуя пероксильные радикалы, которые продолжают цепную реакцию, давая начало новым цепям окисления [7].

Антиоксидантная система защиты организма реализуется путем снижения уровня АФК или образовавшихся радикалов, а также путем связывания функциональными группами белка ионов металлов переменной валентности, инициирующих образование АФК.

При одновременном генерировании гидроксильных радикалов и перекиси водорода в процессе электрохимического восстановления кислорода о взаимодействии исследуемых веществ с АФК можно судить по изменениям вольтамперных кривых, происходящих под влиянием этих веществ [5, 8]. Информация о таком взаимодействии позволяет составить достаточно четкое представление об относительной антирадикальной и антиокислительной активности изучаемого соединения.

Исходя из выше изложенного, мы провели электрохимическое исследование механизма антиоксидантного действия альбумина, используя в качестве модельных соединений некоторые аминокислоты, входящие в его полипептидную цепь [9], а также трипептид глутатион.

#### Экспериментальная часть.

Для исследований использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы "Sigma", аминокислоты фирмы "Merck" и глутатион фирмы "Fluka".

Готовили растворы в 0,1М водном NaCl: аминокислот – непосредственно перед экспериментом, альбумина – за сутки до проведения исследований, времени, необходимого для набухания и полного растворения полимера.

Фоновый электролит 0,1 М NaCl готовили из дважды перекристаллизованного хлорида натрия марки ХЧ в бидистиллированной воде. Концентрация кислорода в исследуемом растворе отвечала равновесной при атмосферном давлении и температуре 20 °С.

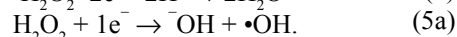
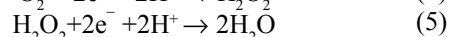
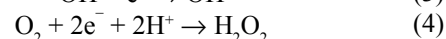
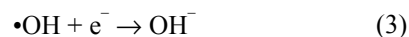
Вольтамперометрические исследования проводили с помощью сопряженного с компьютером полярографа ПУ-1 в трех электродной ячейке [5]. В специальном импульсном режиме на медном катоде снимали дифференциальные вольтамперные кривые восстановления кислорода на фоне 0,1 М NaCl в воде. Потенциал рабочего электрода задавали относительно хлор-серебряного электрода сравнения. Вспомогательным электродом служила платиновая спираль.

Адсорбцию исследуемых соединений на медном катоде изучали методом импедансной спектроскопии [10] с помощью универсальной системы АСМ Instruments Auto по трехэлектродной схеме на фоне 0,1 М NaCl. В качестве рабочего использовали

медный торцевой электрод ( $d=2,5$  мм), вспомогательным электродом служила платиновая пластина (25,0x15,0 мм). Потенциал задавали относительно насыщенного хлор-серебряного электрода сравнения.

#### Результаты исследования и их обсуждение.

На вольтамперных кривых (рис. 1а), полученных на медном катоде в 0,1 М водном NaCl в специальном импульсном режиме, удалось выделить волны восстановления молекулярного кислорода (4), перекиси водорода (5) и гидроксильных радикалов (3) при  $E$ , равном -0,7; -1,1 и -0,2 В соответственно), образующихся в процессе одноэлектронного восстановления перекиси водорода (5а):



Как видно из рис. 1, альбумин до концентрации 0,037 % понижает радикальную и перекисную волны восстановления кислорода. При дальнейшем повышении концентрации альбумина наблюдается рост указанных волн. Кроме того, наблюдается рост II волны, что свидетельствует о влиянии БСА на механизм восстановления молекулярного кислорода.

Следует отметить некоторую невоспроизводимость взаимодействия альбумина с АФК, наблюдаемую в ряде экспериментов, что можно объяснить строением его молекулы и возможностью ее различной ориентации на поверхности электрода.

Дело в том, что БСА представляет собой глобулу, в состав которой входят аминокислотные остатки, большая часть которых находится на поверхности этой глобулы, что дает им возможность участвовать в

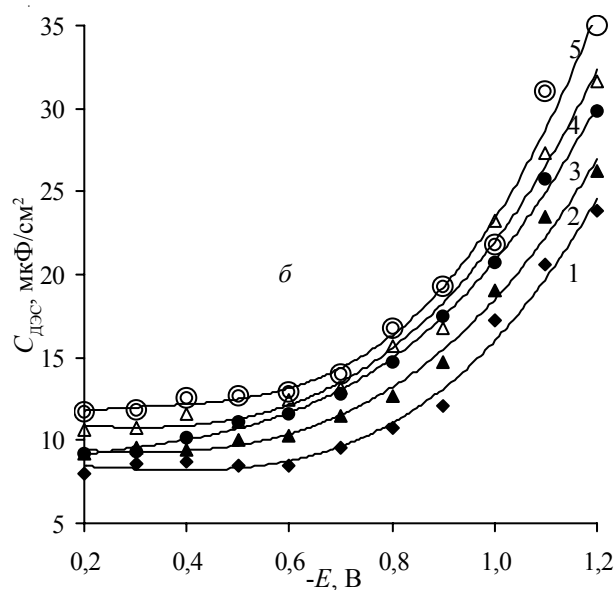
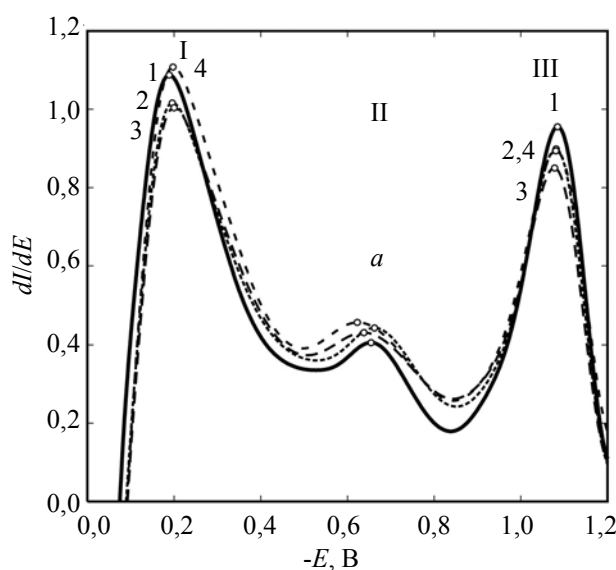


Рис. 1. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на медном катоде (а) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) в присутствии альбумина концентраций: 0,019 (2); 0,037 (3) и 0,049 % (4); дифференциальная емкость ДЭС медного катода (б) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрациях альбумина: 0,0124 (2); 0,0470 (3); 0,8800 (4) и 0,1230 % (5)

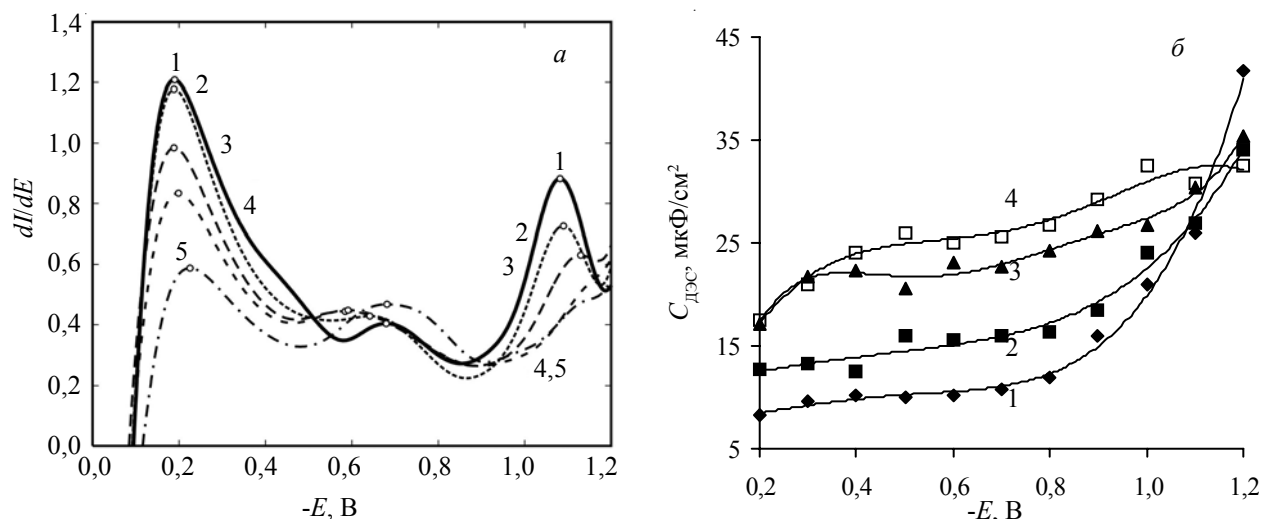


Рис. 2. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на медном катоде (а) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрации цистеина: 0,19 (2); 0,38 (3); 0,57 (4); 0,74 (5) и  $0,91 \cdot 10^{-3}$  моль/л (6); дифференциальная емкость ДЭС медного катода (б) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрации цистеина: 0,19 (2); 0,39 (3); 0,57 (4) и  $0,91 \cdot 10^{-3}$  моль/л (5)

окислительно-восстановительных реакций с кислородом и его активными формами [1, 2]. Исходя из этого, в качестве модельных, для изучения механизма антиоксидантного действия альбумина, выбран следующий ряд аминокислот, свойства которых практически обеспечивают многофункциональность макромолекулы альбумина. Это цистеин (количество в молекуле БСА – 35), метионин (5), гистидин (16), аспарагин (14), аспарагиновая кислота (41), глутамин (21), аланин (48), глицин (17), триптофан (3). Кроме того, исследованы свойства трипептида глутатиона.

Поскольку в примененном методе образование АФК, их реакции с альбумином и модельными аминокислотами происходят на поверхности электрода, была исследована адсорбция этих соединений при потенциалах восстановления кислорода.

Исследования показали, что БСА адсорбируется на поверхности медного катода, повышая емкость (рис. 1б) двойного электрического слоя (ДЭС). Такое повышение емкости свидетельствует об увеличении плотности заряда ДЭС. Это, очевидно, связано с ориентацией молекулы альбумина к поверхности электрода свободной сульфгидрильной группой цистеинового остатка. Подобно этому, но значительно сильнее, происходит повышение емкости ДЭС при адсорбции на медном катоде самого цистеина (рис. 2).

Однако, хотя в молекулу альбумина и входит 35 цистеиновых остатков, 34 из них образуют дисульфидные связи, формирующие петли основной цепи и фиксирующие третичную конфигурацию молекулы. И только одна свободная сульфгидрильная группа, обеспечивающая восстановительную способность

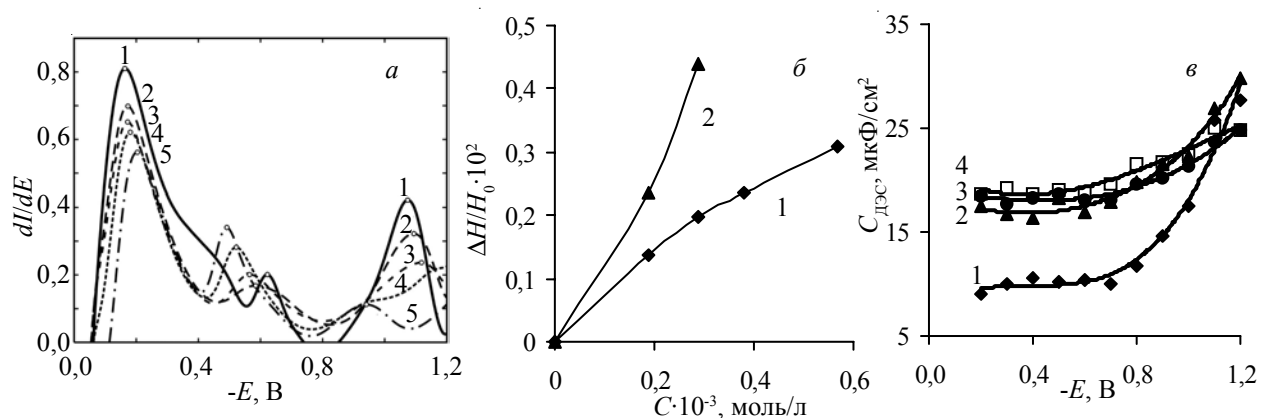


Рис. 3. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на медном катоде (а) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрации глутатиона: 0,099 (2); 0,190 (3); 0,290 (4); 0,380 (5) и  $0,48 \cdot 10^{-3}$  моль/л (6); изменение относительной высоты волн восстановления кислорода на медном катоде (б) в зависимости от концентрации глутатиона: I волна (1), III волна (2); дифференциальная емкость ДЭС медного катода (в) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрации глутатиона: 0,19 (2); 0,38 (3) и  $0,74 \cdot 10^{-3}$  моль/л (4)

Таблица. Относительная антиоксидантная активность аминокислот

№	Исследуемые аминокислоты	Относительная антирадикальная активность ( $A_p$ )	Относительная антиокислительная активность ( $A_o$ )
1	2	3	4
1	Цистеин	18	28
2	Глутатион	19	44
3	Метионин	-	18
4	Гистидин	16	16
5	Аспарагин	13	16
6	Аспарагиновая кислота	15	17
7	Глутамин	13	17
8	$\beta$ -аланин	2	13
9	Глицин	1	14
10	Триптофан	13	3

макромолекулы, скорее всего, ответственна за повышение емкости и взаимодействие с АФК при определенной ориентации молекулы альбумина на поверхности электрода.

Вольтамперометрические исследования показали, что цистеин обладает гораздо более высокой антирадикальной и антиокислительной активностью, чем альбумин. Его присутствие в электролизере приводит к значительно большему снижению волны как гидроксильных радикалов, так и перекиси водорода (рис. 2а).

Еще более значительной антирадикальной и антиокислительной активностью обладает трипептид глутатион, молекула которого также содержит сульфгидрильную группу, но является менее громоздкой чем альбумин, и которая также повышает емкость ДЭС при адсорбции на медном катоде (рис. 3 а, в).

В организме антирадикальная и антиокислитель-

ная активность альбумина определяются также взаимодействием с АФК других, находящихся на его поверхности, аминокислотных остатков. Такое взаимодействие может быть смоделировано участием в реакциях с гидроксильными радикалами и перекисью водорода соответствующих аминокислот.

Для получения представлений о вкладе аминокислотных остатков в общую антиоксидантную активность альбумина сняты вольтамперограммы соответствующих аминокислот, построены зависимости разности высот пиков волн в присутствии и в отсутствие каждой аминокислоты от концентрации последней. Далее использована величина относительной антирадикальной ( $A_p$ ) и антиокислительной ( $A_o$ ) активности исследованных веществ – пропорциональная величине тока разность высот волн гидроксильных радикалов и перекиси водорода в отсутствие и в

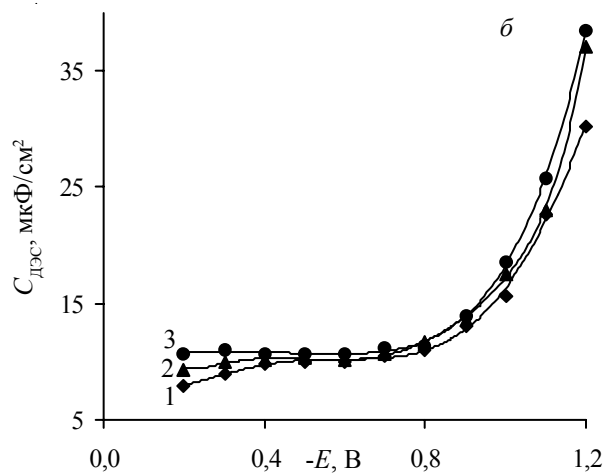
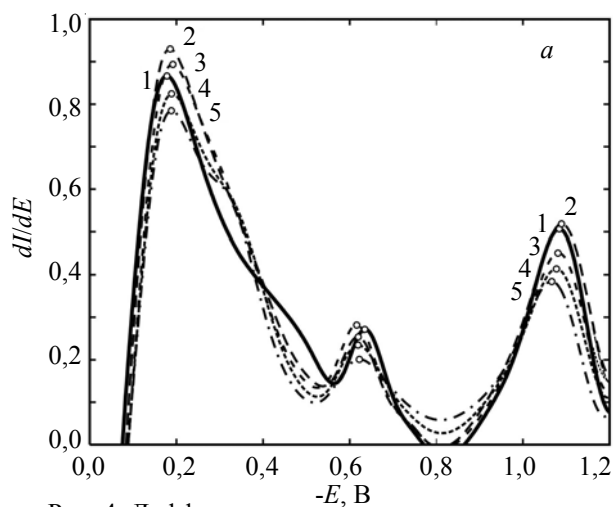


Рис. 4. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на медном катоде (а) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрации метионина: 0,38 (2); 0,57 (3); 0,91 (4) и  $1,07 \cdot 10^{-3}$  моль/л (5); дифференциальная емкость ДЭС медного катода (б) на фоне 0,1 М NaCl в воде (1) при концентрации метионина: 0,38 (2) и  $0,91 \cdot 10^{-3}$  моль/л (3)

присутствии исследуемого вещества определенной концентрации, деленная на высоту волны исходной фоновой кривой,  $\Delta H/H_0$  (например, рис. 3б).

Результаты экспериментов в виде величин  $A_p$  и  $A_o$  активности аминокислот приведены в таблице.

Как видно из таблицы, максимальной антирадикальной и антиокислительной активностью обладает глутатион, который может служить моделью цистеинового остатка альбумина. Достаточно высока антиоксидантная активность аспарагиновой кислоты. С учетом того, что альбумин содержит 41 остаток этой кислоты, можно полагать, что эти остатки в большей степени ответственны за антиоксидантную активность альбумина. В меньшей степени определяют антиоксидантную активность альбумина аспарагин и глутамин, еще в меньшей степени –  $\beta$ -аланин, глицин и триптофан.

Особенно следует остановиться на антиоксидантных свойствах метионина.

При малых концентрациях метионин не влияет на волну гидроксильных радикалов, практически не

проявляя антирадикальной активности. В то же время он понижает волну перекиси водорода, проявляя антиокислительную активность, и оказывает влияние на волну кислорода, сдвигая потенциал его восстановления в положительную область. Последнее, очевидно, связано со способностью метионина образовывать комплексы (рис. 4а). Это согласуется с представлениями об участии метиониновых остатков макромолекулы в детоксикационной функции альбумина [1, 4]. При этом, как видно из рис. 4б, метионин слабо адсорбируется на медном электроде в отрицательной области потенциалов, практически не оказывая влияния на емкость ДЭС.

Анализ представленных данных исследований реакций активных форм кислорода с БСА и рядом входящих в его состав аминокислот позволил составить на молекулярном уровне определенное представление о механизме антирадикального и антиокислительного действия остатков аминокислот и об относительной величине их вклада в суммарную антиоксидантную активность макромолекулы альбумина.

## Литература

1. Roche M., Rondeau Ph., Singh N.R., Tarnus E. // FEBS Letters. – 2008. – 582, N. 13. – P. 1783-1787.
2. Quinlan G. J., Martin G. S., Evans T. W. // Hepatology. – 2005. – 41, N 6. – P. 1211-1219.
3. Taverna M., Marie A.-L., Mira J.-P., Guidet B. // Springer Open J. – February. – 2013, 3:4.
4. Луйк А.И., Лукьянчук В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. – М.: Медицина, 1984. – 224 с.
5. Громовая В.Ф., Шаповал Г.С., Миронюк И.Е. // Журн. общ. химии. – 2002. – 72, Вып.5. – С. 828–831.
6. Андреев А.Ю., Кушнарёва Ю.Е., Старков А.А. // Биохимия. – 2005. – 70, № 2. – С. 246-264.
7. Луцак В.И. // Биохимия. – 2007. – 72, № 8. – С. 995-1017.
8. Шаповал Г.С., Кругляк О.С. // Журн. общ. химии. – 2011. – 81, Вып.7. – С. 1092-1099.
9. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1974. – 957 с.
10. Миронюк И.Е., Шаповал Г.С., Громовая В.Ф., Кухарь В.П. // Теорет. и эксперим. химия. – 2001. – 37, №2. – С. 105–108.

Поступила в редакцию 10 апреля 2014 г.

## Дослідження механізму антиоксидантної активності альбуміну

Г.С. Шаповал, О.С. Кругляк, І.Е. Миронюк

Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України  
1, вул. Мурманська, Київ, 02660, Україна

*Методом вольтамперометрії досліджена на молекулярному рівні взаємодія альбуміну і модельних амінокислот з електрохімічно генерованими активними формами кисню – гідроксильними радикалами і пероксидом водню. Показано, що альбумін і ряд амінокислот, моделюючих амінокислотні залишки на поверхні глобули альбуміну, проявляють як антирадикальну, так і антиокиснювальну активність. Визначені відносні величини цієї активності для модельних амінокислот. Висловлені припущення про їх вклад у сумарну антиоксидантну активність альбуміну.*

**Ключові слова:** альбумін, амінокислоти, антиоксидантна активність.

## Investigation of mechanism of antioxidant activity of albumin

G.S. Shapoval, O.S. Kruglyak, I.Ye. Myronyuk

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine  
1, Murmanska str, Kyiv 02094, Ukraine

*Interaction of albumin and model amino acids with the electrochemically generated active forms of oxygen – hydroxylic radicals and peroxigen is investigated by the voltammetry method at molecular level. It is shown that albumin and number of amino acids, simulating amino acid residues on the surface of albumin globule, displays both antiradical and antioxidant activities. The relative values of this activity are determined for the model amino acid. The assumptions about their contribution to total antioxidant activity of albumin are suggested.*

**Keywords:** albumin, amino acids, antioxidant activity.